

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Плеханова Наталья Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ N_ε-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ НА
РЕГУЛЯЦИЮ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОТОКОВ В *ESCHERICHIA COLI*
ШТАММАХ-ПРОДУЦЕНТАХ АМИНОКИСЛОТ**

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
1.5.6. – Биотехнология

Научный руководитель:
Федоров Алексей Николаевич
доктор биологических наук

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность работы.....	5
Цель и задачи исследования.....	6
Положения выносимые на защиту.....	7
Научная новизна и теоретическая значимость работы.....	7
Практическая значимость.....	8
Апробация работы.....	8
Публикации.....	9
Объем и структура диссертационной работы.....	11
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
ГЛАВА I. АМИНОКИСЛОТЫ. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ, СПОСОБЫ И ОБЪЕМ ПРОИЗВОДСТВА.....	12
1.1 История производства аминокислот.....	12
1.2 Состояние рынка аминокислот.....	13
1.3 Стратегии системной метаболической инженерии микроорганизмов для производства аминокислот.....	14
1.4 Методы создания штаммов-продуцентов аминокислот, сосредоточенные на анализе метаболических путей.....	15
1.5 Инженерия использования источника углерода.....	15
1.6 Обогащение предшественников, устранение побочных продуктов и блокирование деградации продуктов.....	17
1.7 Усиление экспорта целевой аминокислоты в культуральную среду.....	18
1.8 Обеспечение необходимого пула кофакторов.....	19
1.9 Подходы, основанные на системной биологии.....	19
ГЛАВА II. ШТАММЫ <i>ESCHERICHIA COLI</i> ЛИНИИ В И <i>ESCHERICHIA COLI</i> ЛИНИИ К12.....	23
ГЛАВА III. АЦЕТИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ У БАКТЕРИЙ КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА.....	28
3.1. История открытия и изучения процесса ацетилирования.....	30
3.2 Влияние процесса ацетилирования на клеточный метаболизм.....	31
3.3 Изменение метаболизма бактериальных клеток путем ацетилирования ферментов центрального метаболизма.....	32
3.4 Механизмы ацетилирования.....	34
3.5 Доменная организация бактериальных протеинацетилтрансфераз.....	38
3.6 Ацетилирование и устойчивость к антибиотикам.....	39
3.7 Практическое применение.....	41

ГЛАВА IV. МИНИМИЗАЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АЦЕТАТА ПРИ ФЕРМЕНТАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ У <i>ESCHERICHIA COLI</i>	43
4.1 Подходы на уровне биопроцессов для минимизации образования ацетата.	45
4.2 Генетические подходы к минимизации образования ацетата.....	47
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	49
ГЛАВА V. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	49
5.1 Работа с бактериальными культурами.....	49
5.2 Бактериальные штаммы и плазмиды.....	50
5.3 Олигонуклеотиды, использованные в работе.....	52
5.4 Конструирование плазмиды, несущей ген, кодирующий деацетилазу CobB для коэкспрессии.....	54
5.5 Электротрансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	54
5.6 Получение тест-культуры.....	55
5.7 Получение препарата фага P1 _{vir} для трансдукции в клетки <i>E. coli</i>	55
5.8 Интеграция фрагментов ДНК в бактериальную хромосому, с использованием Red-зависимой системы рекомбинации бактериофага λ.....	56
5.9 Оценка накопления L-аминокислот в культуральной среде.....	57
5.10 Идентификация ацетилированных аминокислотных остатков лизина в белках.....	58
5.11 Клонирование генов <i>patZ</i> и <i>cobB</i>	59
5.12 Очистка ферментов CobB и PatZ.....	60
5.13 Ацетилирование ε-аминогрупп остатков лизина в целевых белках <i>in vitro</i>	60
5.14 Деацетилирование ε-аминогрупп остатков лизина в целевых белках <i>in vitro</i>	61
5.15 Построение 3D-структур белков с аминокислотными заменами.....	61
5.16 Молекулярный докинг.....	61
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	62
ГЛАВА VI. ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАТИВНОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ L-ТРЕОНИНА ШТАММОМ-ПРОДУЦЕНТОМ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	62
ГЛАВА VII. ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ L-ТРЕОНИНА ШТАММОМ-ПРОДУЦЕНТОМ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	66
ГЛАВА VIII. ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССАХ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА КЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И ПРОДУКЦИЮ АМИНОКИСЛОТ.....	77
ГЛАВА IX. ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО НЕ-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	81
ГЛАВА X. ВЛИЯНИЕ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО НЕ-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ	

НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	91
ГЛАВА XI. СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ШТАММАХ MG1655 И BL21(DE3).....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	103
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

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

Получение аминокислот микробиологическим способом с высоким выходом удалось достичь только с помощью специально полученных штаммов, первоначально отобранных методами мутагенеза и селекции, позже с помощью генно-инженерных подходов. 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 некоторых продуцентов использовались устойчивые к ретроингибированию формы ключевых ферментов биосинтеза.

Не секрет, что коммерчески успешные штаммы-продуценты аминокислот по своей производительности способны приближаться к теоретически возможному выходу продукта. Для поиска новых способов повышения эффективности таких штаммов-продуцентов необходимо искать новые универсальные подходы, способные регулировать пути метаболизма, повышая выход аминокислот.

Одним из таких новых подходов – использование посттрансляционных модификаций, в частности ацетилирования. Как и все существующие посттрансляционные модификации, ацетилирование воздействует на уже синтезированные белки, модулируя и расширяя их функции. Диапазон клеточных процессов, регулируемых таким образом очень широк, и включает в себя межбелковые взаимодействия, фолдинг, локализацию белков и их активность.

Обнаруженный способ влияния на ферментативную активность представляет собой потенциальный механизм регулирования энергетического статуса клетки, так как в процессе ацетилирования задействованы ацетил-КоА и НАД⁺, две молекулы, которые непосредственно участвуют в метаболических процессах. Такого рода метаболическая регуляция посредством ацетилирования может быть консервативным механизмом у разных организмов.

Цель и задачи исследования

Цель работы:

Изучение влияния процессов N_ε-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи** исследования:

1. Оценить влияние ферментативного ацетилирования на метаболизм штаммов *E. coli*, а также на продукцию аминокислоты треонина штаммом-продуцентом *E. coli*
2. Оценить влияние деацетилирования на метаболизм штаммов *E. coli*, а также на продукцию аминокислоты треонина штаммом-продуцентом *E. coli*
3. Изучить влияние ферментативного ацетилирования (ацетилтрансферазы *E.coli* PatZ) на ферментативную активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, а также влияние на этот процесс неспецифичной к механизму ацетилирования деацетилазы CobB.
4. Изучить влияние неферментативного ацетилирования на ферментативную активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и роль в этом процессе ацетилфосфатсинтазы *E.coli* AskA.
5. Определить влияние N_ε-ацетилирования различных аминокислотных остатков лизина глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на активность фермента в штаммах *E. coli* MG1655 и BL21(DE3).

Положения выносимые на защиту

1. Усиление уровня ферментативного ацетилирования в начальной фазе ферментации позволяет добиться повышения продукции L-треонина в штамме-продуcente *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода.

2. Усиление процесса деацетилирования в поздней стадии ферментационного процесса, особенно в штаммах с повышенной устойчивостью к ацетату, позволяет добиться повышения продукции L-треонина в штамме-продуcente *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода.

3. Процесс ферментативного ацетилирования повышает активность ключевого фермента центрального метаболизма ГАФД *E. coli in vivo* и *in vitro*.

4. Уровень активности ГАФД определяется как метаболическими параметрами самого штамма, так и функционированием процессов ацетилирования в клетках.

5. Делеция генов, участвующих в процессах ацетилирования (*patZ*, *cobB*, *ackA*) оказывает влияние как на метаболизм штамма *E. coli* MG1655, так и на продуктивность штаммов-продуцентов аминокислот.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Расширены представления о механизмах ацетилирования и деацетилирования аминокислотных остатков лизина в белках *E. coli*.

Показано, что профиль ацетилирования одного из ключевых ферментов гликолиза — ГАФД — зависит от штамма, в котором данный белок был синтезирован.

Обнаружено, что удаление генов, участвующих в метаболизме ацетата и ацетилировании ϵ -аминогруппы лизина белков влияет на метаболизм штаммов-продуцентов и на продуктивность целевых аминокислот.

Описан комплексный подход к изменению метаболизма *E. coli* штамма-продуцента L-треонина при его росте на различных углеродных субстратах, в результате чего получено значительное увеличение продукции L-треонина.

Практическая значимость

Повышение способности *E. coli* ассимилировать ацетат, достигнутое с помощью адаптивной лабораторной эволюции, позволило снизить негативное влияние ацетата на ферментационный процесс и продукцию L-треонина. Усиление процесса деацетилирования на поздних стадиях ферментационного процесса позволило добиться существенного повышения продуктивности штаммов на различных источниках углерода. Полученный штамм *E. coli* способен использовать разные источники углерода, не теряя своей эффективности, ведь себестоимость целевого продукта, получаемого с помощью микробного синтеза, в большой степени определяется стоимостью основного субстрата — источника углерода. Создание универсальных по потреблению источников углерода штаммов-продуцентов позволит производить целевой продукт, независимо от постоянного изменения цен на углеродные субстраты и невзирая на их локальную доступность.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на следующих конференциях, форумах, конкурсах и конгрессах: XI Международная научно-практическая конференция Биотехнология: наука и практика (2023 г., п. Новомихайловский, Россия); XIII Международная научная конференция Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные

аспекты (2023, Минск, Беларусь); Международная научная конференция молодых ученых Наука и инновации (2023, Ташкент, Узбекистан).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ. Опубликовано 4 экспериментальные статьи и 1 обзорная статья в научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в иностранном научном журнале, входящих в реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science, Scopus, а также тезисы конференций.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Экспериментальные статьи:

1. Slivinskaya E.A., Plekhanova N.S., Altman I.B., Yampolskaya T.A. Engineering of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with dual NAD⁺/NADP⁺ cofactor specificity for improving amino acid production // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10. – №. 5. – P. 976.
2. Plekhanova N.S., Altman I.B., Yurkova M.S., Fedorov A.N. The effects of Nε-acetylation on the enzymatic activity of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2023. – V. 59. – №. 6. – P. 778-785.
3. **Плеханова Н.С.**, Лившиц В.А., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние ацетилирования и деацетилирования белков на метаболизм штаммов *Escherichia coli* // *Биотехнология*. – 2024. – Т.40. – № 3. – С. 36-46.
4. **Плеханова Н.С.**, Лившиц В.А., Хижняк Т.В., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние процесса деацетилирования на продукцию треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli* // *Биотехнология*. – 2024. – Т.40. – № 4. – С. 1-11.

Обзорные статьи:

5. **Плеханова Н.С.**, Альтман И.Б., Лившиц В.А., Юркова М.С., Федоров А.Н. Ацетилирование белков у бактерий как способ регуляции метаболизма клетки // Биотехнология. – 2023. – Т.39. – № 5. – С. 14-23.

Тезисы конференций:

6. Сливинская Е.А., **Плеханова Н.С.**, Альтман И.Б., Ямпольская Т.А. Изучение свойств мутантной глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Escherichia coli* с двойной кофакторной специфичностью // 3-й Российский микробиологический конгресс. Псков, Россия.

7. **Плеханова Н.С.**, Соловьева И.Н., Липкин А.В. Разработка подхода к выбору промышленных штаммов *Escherichia coli* К и В для получения ферментов в промышленных масштабах. XI Международная научно-практическая конференция "Биотехнология: наука и практика", 2023 г., п. Новомихайловский, Россия.

8. **Плеханова Н.С.**, Шитенкова Е.В., Липкин А.В. Влияние Nε-ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Escherichia coli*. XIII Международная научно-практическая конференция Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты, 2023 г. Минск, Республика Беларусь.

9. Никандров Н.А., **Плеханова Н.С.**, Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние ферментативного Nε-ацетилирования *in vitro* на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Escherichia coli* Международная научная конференция молодых учёных Наука и инновации, 2023 г. Ташкент, Узбекистан.

10. **Плеханова Н.С.**, Лившиц В.А., Хижняк Т.В., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние процесса деацетилирования на продукцию треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli*. XII международная научно-практическая конференция Биотехнология: наука и практика, 2024 г. п. Новомихайловский, Россия.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и включает 15 рисунков и 14 таблиц. Работа состоит из введения, 11-ти глав (обзор литературы, материалы и методы, экспериментальная часть – результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 220 наименований.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА I. АМИНОКИСЛОТЫ. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ, СПОСОБЫ И ОБЪЕМ ПРОИЗВОДСТВА

1.1 История производства аминокислот

С тех пор как О. Нойбауэр в 1909 г. предположил, что фенилаланин у животных превращается в тирозин, исследования метаболизма аминокислот продолжаются более века. Аминокислоты являются важными соединениями для человека, которые он получает с пищевыми продуктами. Из-за различий в своих структурах аминокислоты обладают совершенно разными биохимическими свойствами и функциями в человеческом организме (Brosnan et al., 2001; Suenaga et al., 2008; Wu et al., 2007). Дефицит некоторых аминокислот может приводить к серьезным заболеваниям, поэтому аминокислоты нашли широкое применение в пищевой промышленности, а их производство растет с каждым годом.

Аминокислоты играют важную роль в клеточном метаболизме, и организму необходимо синтезировать большую их часть. На сегодняшний день ученые обнаружили в природе более пятисот аминокислот, но в процессе синтеза белков участвуют только двадцать две. В 1943 году Гордон, Мартин и Синг использовали распределительную хроматографию для разделения и изучения компонентов белков (Gordon et al., 1943). Это был крупный прорыв, который способствовал быстрой идентификации двадцати аминокислот, используемых в белках всех живых организмов. После этого первоначального всплеска открытий к списку были добавлены две дополнительные аминокислоты, которые используются не всеми организмами: селеноцистеин (Bock, 2000) и пирролизин (Srinivasan et al., 2002).

Помимо роли в составе белков, аминокислоты выполняют множество биологически важных функций. Они также участвуют в энергетическом метаболизме клеток, и многие из них являются важными питательными

веществами. Аминокислоты часто могут выступать в качестве химических соединений при межклеточном взаимодействии. Например, Арвид Карлссон в 1957 году обнаружил, что амин-3-гидрокситирамин (дофамин) является не только предшественником синтеза адреналина из тирозина, но также является ключевым нейромедиатором.

Интерес к производству аминокислот рос с каждым годом, что привело к развитию множества технологий. В 1907 году Кикунэ Икеда из Токийского императорского университета начал свои эксперименты с целью выявления и очистки компонента, усиливающего вкус, из морских водорослей конбу (*Laminaria japonica*). После года исследований он обнаружил, что экстракт состоит из глутамата натрия (Kurihara, 2009). Вскоре после его открытия компания Ajinomoto начала извлекать глутамат натрия из кислотно-гидролизованного пшеничного глютена или обезжиренных соевых бобов и продавать его в качестве усилителя вкуса (Sano, 2009). Своими работами Кикунэ Икеда заложил основу для индустрии производства аминокислот. Впоследствии производство этой аминокислоты стало исключительно микробиологическим.

1.2 Состояние рынка аминокислот

Микробиологическое производство аминокислот — это большая область, где стратегии системной метаболической инженерии были успешно применены, в основном в двух важных платформенных микроорганизмах: *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*. С момента первого открытия штамма *C. glutamicum*, продуцирующего L-глутамат, в 1957 году селекция штаммов стала местом жесткой конкуренции ведущих предприятий по производству аминокислот с растущим рыночным спросом на аминокислоты. L-глутамат является основной производимой аминокислотой, которая покрывает почти две трети рынка аминокислот. Рыночный спрос на L-лизин стоит сразу за L-глутаматом, с текущим годовым производством более 2200000 тонн (Eggeling et al., 2015). Были разработаны различные подходы к селекции штаммов, в то время как генетически

направленные метаболические стратегии постепенно заняли место привычного метода случайного мутагенеза и селекции и стали основным экономически оправданным подходом к созданию штаммов-продуцентов аминокислот. В то время как локальная метаболическая инженерия микроорганизмов, которая фокусируется на инженерии одного или нескольких конкретных генов или метаболических путей, как правило, имеет ограничение, заключающееся в том, что она не может учитывать весь процесс биосинтеза. Системная метаболическая инженерия пытается преодолеть это ограничение с помощью комбинированных подходов для получения рационально спроектированных штаммов.

1.3 Стратегии системной метаболической инженерии микроорганизмов для производства аминокислот

Согласно исследованиям, проведённым Ли и соавторами (Lee et al., 2012), стратегии системной метаболической инженерии можно классифицировать на две основные группы: рационально-интуитивные подходы и систематически-рационально-случайные подходы. Первая группа охватывает традиционный процесс метаболической инженерии для синтеза определенных продуктов, который включает такие этапы, как поглощение источника углерода, устранение побочных продуктов, обогащение предшественников и реконструкция связанных метаболических путей, а также обеспечения необходимого количества значимых кофакторов, когда целевые гены, подлежащие модификации, уже очевидны. Вторая группа, напротив, в первую очередь включает методы метаболической инженерии, основанные на омиковых подходах и эволюционных стратегиях, когда целевые гены остаются неясными. В последнее время наблюдается увеличенное применение системной метаболической инженерии микроорганизмов для производства аминокислот.

1.4 Методы создания штаммов-продуцентов аминокислот, сосредоточенные на анализе метаболических путей

Подходы, ориентированные на метаболические пути, как правило, направлены на оптимизацию производственной способности специфических продуктов путем интеграции локальных методов метаболической инженерии. Эти методы могут включать улучшение эффективности использования углеродных источников, оптимизацию экспрессии критически важных ферментов, устранение ингибирования ферментов по методу обратной связи конечным продуктом, ингибирующей биосинтетические процессы, а также подавление альтернативных метаболических путей. В последние годы было сделано значительное количество исследований в области инженерии микроорганизмов, ориентированной на оптимизацию путей биосинтеза, с целью повышения выхода аминокислот.

1.5 Инженерия использования источника углерода

Процесс оптимизации поглощения и усвоения источников углерода представляет собой важный этап в создании штаммов-продуцентов аминокислот. Усиление поглощения и использования углеродных источников способствует увеличению потока углерода, необходимого для синтеза аминокислот. Выделяются два основных типа транспортных систем источников углерода: система фосфотрансферазы (PTS) и нефосфотрансферная система. PTS требует наличия фосфоенолпирувата (PEP), который служит фосфорилирующим агентом для углеродных субстратов и представляет собой значимый промежуточный продукт в метаболических путях синтеза некоторых аминокислот. В данном контексте замена PTS на нефосфотрансферную систему может позволить сэкономить больше PEP для дальнейших этапов биосинтетических процессов аминокислот (Lindner et al., 2011; Chen et al., 1997). Также были протестированы альтернативные стратегии для повышения внутренних уровней PEP. Например, Татарко и коллеги (Tatarko et al., 2001) осуществили модификацию глобального

регуляторного гена *csrA*, кодирующего регулятор Csr, что привело к увеличению потока глюконеогенеза и снижению активности гликолиза, в результате чего повысился уровень PEP внутри клетки, что, в свою очередь, способствовало синтезу фенилаланина.

Увеличение уровня экспрессии гена *ptsG*, который кодирует специфическую для глюкозы пермеазу ЕП PTS, может способствовать более эффективной утилизации глюкозы в таких микроорганизмах, как *C. glutamicum* и *E. coli*. Важно отметить, что экспрессия *ptsG* может варьироваться не только в результате прямых генетических манипуляций, но и под влиянием других углеродных источников. Например, присутствие ацетата может снизить экспрессию гена *ptsG* на 45% за счет воздействия белка-репрессора SugR. И, напротив, добавление мальтозы может увеличить экспрессию *ptsG*, нейтрализуя репрессивный эффект SugR даже в условиях присутствия ацетата (Engels et al., 2007). Существуют данные о том, что добавление мальтозы ведет к повышению утилизации глюкозы у штаммов *C. glutamicum*, обладающих дефицитом пируватдегидрогеназного комплекса, что, в свою очередь, способствует повышению выхода L-валина (Krause et al., 2010). Недавние исследования Хенриха и коллег (Henrich et al., 2013) показали, что поглощение мальтозы через новую систему ABC-транспортера MusEFGK2I является причиной повышения экспрессии гена *ptsG* в *C. glutamicum*, что подтверждает важность взаимодействия различных углеродных источников для регуляции метаболических путей.

Кроме того, чтобы справиться с продовольственным кризисом во всем мире, использование сахаров, полученных из целлюлозы и гемицеллюлозы, таких как ксилоза и арабиноза, для производства аминокислот становится все более и более актуальным. *E. coli* может эффективно расти на широком спектре углеродных субстратов, включая различные пентозы, такие как ксилоза, манноза, арабиноза и т. д. (Aristidou et al., 2000). Сообщалось об одновременном поглощении моносахаридов на основе лигноцеллюлозы в *E. coli* (Hallström, 2014). В природе *C. glutamicum* не способен использовать ксилозу в качестве источника углерода из-за отсутствия у него гена, кодирующего фермент ксилозоизомеразу

необходимого для метаболизма ксилозы (Kawaguchi et al., 2006). Учитывая важность *C. glutamicum* в промышленной сфере, использование ксилозы привлекло внимание многих исследователей. Введением гетерогенной ксилозоизомеразы в *C. glutamicum* можно было бы производить аминокислоты и их производные на ферментационной среде с использованием ксилозы в качестве источника углерода (Meiswinkel et al., 2013; Kang et al., 2014; Jo et al., 2017). Несмотря на то, что транспортная система ксилозы в *C. glutamicum* все еще нуждается в дополнительных исследованиях, уже полученные результаты имеют значение для дальнейшего улучшения использования ксилозы для этого микроорганизма.

1.6 Обогащение предшественников, устранение побочных продуктов и блокирование деградации продуктов

Процесс биосинтеза аминокислоты в бактериальной клетке обычно представляет собой несколько последовательных реакций, которые катализируются специальными ферментами, преобразовывая источник углерода в желаемый продукт – целевую аминокислоту. Наиболее часто используемая стратегия метаболической инженерии заключается в усилении экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты для получения максимального количества предшественников целевого продукта (Qin et al., 2015), и, в то же время, устранении ненужного образования побочных продуктов путем блокирования или ослабления конкурирующих путей (Hasegawa et al., 2013; Dong et al., 2016). А также для прекращения дальнейшей деградации целевой аминокислоты. Устранение ингибирования по принципу обратной связи ключевого фермента в метаболическом пути часто является первым и самым важным шагом для разработки высокопродуктивного штамма-производителя (Vogt et al., 2015; Guo et al., 2015). Обычно ферменты, устойчивые к такому виду ингибирования, можно получить путем введения замен методом сайт-направленного мутагенеза (Chen et al., 2014). Кроме того, регуляция транскрипции с помощью связывания ДНК

является еще одним важным подходом, который можно использовать для достижения обогащения пула предшественников. Транскрипционную репрессию можно устранить путем удаления транскрипционного репрессора (Vogt et al., 2014) или путем изменения мотива связывания ДНК. Поскольку устранение побочных продуктов обычно достигается путем удаления конкурирующих генов или вмешательства в экспрессию генов, что иногда может вызывать неблагоприятные эффекты для нормального роста и метаболизма клеток. Поэтому основной проблемой при применении этой стратегии в селекции штаммов-продуцентов является баланс роста клеток, их метаболизм и синтеза целевого продукта.

1.7 Усиление экспорта целевой аминокислоты в культуральную среду

Конечное количество целевой аминокислоты зависит не только от уровня ее внутриклеточного синтеза, но также определяется эффективностью экспорта в культуральную среду. С открытием различных аминокислотных транспортеров для аминокислот (Kalinowski et al., 2003), таких как BrnFE для экспорта аминокислот с разветвленной цепью и L-метионина (Qin et al., 2015), ThrE для экспорта L-треонина (Simic et al., 2001), LysE для экспорта L-лизина и L-аргинина (Lubitz et al., 2016) и т. д. Оптимизация уровня экспрессии транспортеров все чаще используется для значимого повышения выхода аминокислот. В настоящее время инженерия транспортеров проводится в основном путем их усиления для выделения желаемой аминокислоты и одновременного блокирования обратного импорта выделенного продукта. Например, производство аминокислот с разветвленной цепью может быть увеличено путем сверхэкспрессии глобального регулятора Lrp и двухкомпонентной экспортной системы BrnFE (Vogt et al., 2014), и удаления импортера BenQ (Xie et al., 2012).

1.8 Обеспечение необходимого пула кофакторов

Кофакторы требуются во многих биохимических реакциях внутри микробных клеток (Huang et al., 2017), из которых НАДФН и НАДН являются основными восстанавливающими силами для микроорганизмов (Li et al., 2016; Xu et al., 2016). Их рециркуляция и соответствующее равновесие жизненно важны для роста клеток и внутриклеточного метаболизма. Были разработаны различные методы генерации НАДФН или НАДН (Wang et al., 2016). Боммаредди и др. (Bommareddy et al., 2014) сконструировали новый путь генерации НАДФН, изменив кофакторную специфичность нативной НАД⁺-зависимой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) на НАДФ, в результате чего был получен дополнительный запас НАДФН через гликолитический путь. Они систематически манипулировали кофакторной специфичностью ГАФД с помощью рационального проектирования белков и оценили полученное производство L-лизина. Результаты показали, что достаточное количество НАДФН приводит к увеличению продукции L-лизина, при этом максимальная прибавка к выходу аминокислоты приближается к 60%, что подчеркивает важность поддержания необходимого пула кофакторов для сверхпродукции желаемых аминокислот.

1.9 Подходы, основанные на системной биологии

Ограниченность нашего понимания микробного метаболизма часто приводит к недостаточной эффективности инженерных подходов, ориентированных на метаболические пути. В отличие от них, методы системной биологии и эволюционные подходы могут предложить более комплексное понимание, что позволит целенаправленно воздействовать на ключевые гены для дальнейшей метаболической инженерии. Это, в свою очередь, поможет преодолеть скрытые метаболические узкие места и улучшить характеристики штаммов-продуцентов аминокислот.

1.9.1 Подходы, основанные на омике

Системная биология представляет собой быстроразвивающуюся дисциплину, значительно расширившую наше понимание о живых организмах с различных точек зрения. Применение системной биологии, в частности омиксных подходов, существенно ускорило внедрение процессов метаболической инженерии при создании промышленных штаммов, включая сверхпродуцентов аминокислот (Park et al., 2007; Lee et al., 2007). В процессе конструирования штаммов с высокой продукцией аминокислот неизбежно возникают “узкие места” после применения базовых рациональных инженерных подходов. Эти проблемы в значительной степени обусловлены сложностью метаболических путей и неопределенными последствиями внесенных изменений методами генной инженерии. Например, улучшение пути синтеза определенного продукта может привести к дисбалансу восстановительной силы, энергетических ресурсов или распределения углеродного потока (Park et al., 2007), что, в свою очередь, может негативно влиять на рост клеток или выход целевого продукта. Поэтому точная оценка последствий инженерии, ориентированной на базовые метаболические пути, с системной точки зрения имеет решающее значение для метаболической инженерии промышленных штаммов-продуцентов. Омиксные подходы, включая геномику, транскриптомику, протеомику, метаболомику, флюксомику и особенно их комбинация (Kromer et al., 2004; Buchinger et al., 2009), могут помочь решить проблемы создания штаммов-продуцентов, предоставляя исчерпывающую информацию о внутриклеточных метаболических процессах для дальнейших изменений выбранного штамма-платформы. Например, сравнительный геномный анализ сконструированного штамма, продуцирующего лизин, и его родительского штамма выявил полезные точечные мутации, которые впоследствии были использованы для создания штамма с высокой продукцией лизина (Ohnishi et al., 2002).

1.9.2. Подходы основанные на эволюции

Естественная эволюция — это процесс, посредством которого биосфера наполняется разнообразными и уникальными формами жизни. В ходе этого процесса виды подвергаются мутациям и рекомбинациям, которые либо зависят от окружающей среды, либо являются наследственными, за которыми следует естественный отбор, в ходе которого наиболее приспособленные виды (обладающие более выгодным фенотипом) адаптируются в своей конкретной среде, выживают и размножаются (Darwin, 1999). Весь этот процесс также известен как адаптивная эволюция (Metzgar and Wills, 2000; Sauer, 2001).

Лабораторная адаптивная эволюция (ЛАЭ) — это процесс, на основе которого принципы естественной эволюции реализуются в лабораторных условиях в отношении конкретной популяции в контролируемых условиях. В ЛАЭ естественный отбор направлен на выбранную среду с желаемыми условиями для того, чтобы популяции получили лучшую приспособленность к ней (Dragositis and Mattanovich, 2013; Ferreira and Noble, 2019).

В ходе микробного ЛАЭ выбранный микроорганизм культивируется в течение длительного периода времени (от недель до нескольких лет) в определенных условиях, которые оказывают на него давление в направлении приобретения желаемого признака с использованием «правил» естественной эволюции, пока не будет разработан новый, наиболее приспособленный штамм, обогащенный новыми полезными мутациями (Dragositis and Mattanovich, 2013; Winkler and Kao, 2014; Sandberg et al., 2019).

Традиционные стратегии метаболической инженерии включают дерепрессию целевого метаболического пути, сверхэкспрессию генов, кодирующих ферменты, ограничивающие скорость, увеличение запаса предшественников. Цель метаболической инженерии — модифицировать микробный метаболизм для эффективного синтеза целевого продукта, но это обычно оказывает отрицательное влияние на рост клеток. Более того, для

биосинтеза гетерологичных метаболитов необходимо конструировать экзогенные метаболические пути или активировать нативные пути, которые необходимо оптимизировать для удовлетворения возросшего спроса на предшественников. Технология ЛАЭ не требует глубокого понимания сложной микробной физиологии и может помочь получить высокопродуктивные штаммы за счет улучшения устойчивости к стрессу, оптимизации путей производства метаболитов и улучшения метаболических потоков (Pontrelli et al., 2018; Luo et al., 2019; Awasthi et al., 2022). Технология ЛАЭ успешно использовалась для оптимизации скорости роста микроорганизмов (Hong et al., 2011; Yu et al., 2013; Pfeifer et al., 2017), устранения дефектов роста (Aguilar et al., 2018; Thyer et al., 2018), исследования изменений скорости роста (Barrick et al., 2009; Lenski et al., 2015), а также увеличения выхода биомассы и продукта (Fong et al., 2005; Yu et al., 2013; Meyer et al., 2018; Godara, Као, 2020).

ГЛАВА II. ШТАММЫ *ESCHERICHIA COLI* ЛИНИИ В И *ESCHERICHIA COLI* ЛИНИИ К12

На протяжении многих лет различные штаммы *Escherichia coli* с разными генотипами исследовались на предмет различий метаболизма, способности утилизировать различные источники углерода, образовывать побочные продукты, а самое главное, их способности продуцировать рекомбинантные белки или экономически значимые соединения в больших количествах.

Штаммы *E. coli* В и *E. coli* К12 в равной степени используются в качестве штамма-платформы для производства рекомбинантного белка. *E. coli* BL21 на сегодняшний день является наиболее часто используемым штаммом у исследователей (Waegeman, Soetaert, 2011).

Первая полногеномная последовательность штамма линии К-12 MG1655, была определена (Blattner et al., 1997) и детально сравнена с другим штаммом этой же линии К-12 W3110 (Hayashi et al., 2006). В настоящее время наиболее широко используемые штаммы *E. coli* – это штаммы производные линий В и К-12, что стало результатом новаторской работы с использованием К-12 для генетических и биохимических исследований и В для изучения вирулентных бактериофагов, систем рестрикции, мутагенных анализов и эволюции бактерий (Schaechter, 2004).

Несмотря на быстро растущее распространение технологий для секвенирования и аннотации геномов микроорганизмов, до недавнего времени последовательность генома *E. coli* BL21 не была доступна, что существенно осложняло работу исследователей с этим штаммом. Следовательно, по-прежнему много внимания уделялось штаммам, полученным на основе *E. coli* К12 (Ko et al., 2010; Ryu et al., 2010; Striedner et al., 2010). Недавний комплексный анализ полногеномных исследований, включающий многогранные целостные данные - геномов, транскриптомов, протеомов и фенотипов - для определения различий между штаммами *Escherichia coli* линий В и К-12.

Последовательности генома штаммов линии В были определены относительно недавно (Jeong et al., 2009): REL606 — это штамм, используемый

для долгосрочных эволюционных экспериментов в лабораторных условиях (Blount et al., 2008), а BL21(DE3) — штамм, широко используемый для производства рекомбинантных белков под контролем РНК-полимеразы T7 (STUDIER 1998).

Исследования штаммов *E. coli* выявил более высокие уровни экспрессии генов, связанных с метаболизмом ацетата и глиоксилатным шунтом в BL21 по сравнению со штаммом K-12 JM109. Также у этих штаммов был обнаружен иной механизм контроля накопления ацетата (Phue, Shiloach, 2004; Shiloach et al., 1996). В этом контексте Шилоах и др. предположили, что дифференциальная регуляция ацетата может объяснить более низкое образование ацетата во время культивирования BL21 по сравнению со штаммами K-12 (Shiloach et al., 1996). Кроме того, другие метаболические пути продемонстрировали дифференциальную регуляцию, таких метаболических путей как путь жирных кислот или гликолиз в целом (Phue, Shiloach, 2004). Кроме того, *E. coli* BL21 может достигать большего количества биомассы и более высоких скоростей роста, чем штаммы *E. coli* K-12, возможно, из-за дифференциально регулируемого транспорта глюкозы, как недавно было предположено (Shiloach et al., 2010). Более того, в штаммах BL21 отсутствуют две протеазы (lon, ompT) (Studier et al., 2009).

В исследованиях (Marisch et al., 2013) штамм BL21 показал увеличенное накопление ацетата на начальном этапе ферментационного процесса, за которым последовало небольшое снижение в отличие от штаммов K-12. Возможными объяснениями такого поведения являются потребление ацетата штаммом BL21 и преобразование его в другие метаболиты.

Шилоах и др. (Shiloach et al., 2010) предложили механизм контроля ацетата в штамме BL21, который, как предполагается, активируется при концентрации ацетата около 1 г/л. Более низкий уровень накопления ацетата во время культивирования может позволить штамму линии В достичь более высоких скоростей роста, поскольку ацетат, как известно, ингибирует клеточный рост (Luli, Strohl, 1990). Подробный анализ генов, связанных с метаболизмом ацетата, был проведен в этом исследовании с использованием данных транскриптома.

Низкое накопление ацетата штаммами линии В обычно объясняется усиленным потоком по глиоксилатному шунту, кодируемому ацетатным опероном *aceBAK*; однако на стадии экспоненциального роста в штаммах К-12 наблюдалась повышенная регуляция генов, участвующих в глиоксилатном шунте, цикле трикарбоновых кислот (ТСА) и глюконеогенезе. Эти паттерны экспрессии аналогичны результатам предыдущего анализа микрочипов, сравнивающего транскриптомы штаммов К-12 JM109 и BL21 во время ферментационного процесса с низким содержанием глюкозы (Phue et al., 2005).

Гены, вовлеченные в центральный метаболизм и пути ассимиляции/диссимиляции ацетата, а именно гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного пути, глиоксилатного шунта, глюконеогенеза, являются идентичными на генетическом уровне в штаммах В и К-12. Это также относится и к гену регулятора транскрипции *fruR*, который, как предполагалось, изменяет уровень экспрессии или регуляторную силу в штамме BL21, что приводит к угнетению метаболизма ацетата даже в условиях культивирования с высоким содержанием глюкозы (Phue et al., 2005). Интересно, что фермент, кодируемый геном *agrA*, функция которого неизвестна, но, как предполагается, играет роль в регуляции глиоксилатного пути, нарушен в штаммах В (Díaz-Guerra et al., 1997).

Многие фенотипические различия между штаммами В и К-12 в вопросах использования источников углерода могут быть связаны с генотипическими различиями. В частности, гены, отвечающие за транспорт и метаболизм галактитола, были высоко экспрессированы как на уровне мРНК (*gatYZC*), так и на уровне белка (*GatYZAB*) в MG1655, возможно, потому, что *gatR*, репрессор генов *gat*, укорочен в штамме MG1655, но не поврежден в REL606.

Для штаммов В и К-12 наблюдались различные клеточные реакции на изменения окружающей среды

Восприимчивость штамма *E. coli* В к различным стрессовым условиям и антибиотикам может быть объяснена несколькими особенностями. Во-первых, различия в составе и строении липополисахаридов (ЛПС) и уровнях синтеза белков внешней мембраны могут влиять на проницаемость и целостность клеточной оболочки. Штаммы линии В продуцируют больше порина (OmpF), чем штаммы К-12, поскольку в геноме штамма линии В отсутствует ген *micF*, белковый продукт, которого посттранскрипционно репрессирует продукцию белка OmpF (Schneider et al., 2002). Это дополнительно подтверждается данными транскриптома, показывающими высокие уровни экспрессии гена *ompF* в штамме линии В, а также высокую экспрессию генов *ompC* и *ompA* в штамме линии К-12. Эти наблюдения согласуются с результатами протеомного анализа фракций внешней мембраны. Вредные агенты, такие как антибиотики, легче диффундируют через интегрированный в мембрану белок OmpF, чем через OmpC, поскольку первый образует канал с большим размером пор (Nikaido, 2003). Во-вторых, образование биопленки, по-видимому, подавляется в штаммах линии В из-за отсутствия белков Rcs (*rcaADB*), основного механизма, регулирующего эти процессы (Majdalani, Gottesman, 2005). Данные протеома также показали, что белки FimA и Flu, участвующие в образовании биопленки, секретируются только штаммами линии К-12. В-третьих, сравнение последовательностей генома выявило по крайней мере пять модулей токсин-антитоксин в штаммах линии К-12, три локуса класса *relBE* (*relBE*, *dinJ-yafQ* и *yefM-yoeB*) и два *mazEF*-гомологичных локуса (*chpRA* и *chpSB*), тогда как штаммы линии В обладают только двумя локусами токсин-антитоксин (*dinJ-yafQ*, *chpRA*). Модули токсин-антитоксин играют важную роль в физиологии бактериального стресса и могут способствовать множественной лекарственной устойчивости (Gerdes et al., 2005). Наконец, штамм линии В показал более низкие реакции на стресс. Гены теплового шока, кодирующие молекулярные шапероны (*dnaK*, *groES*, *hspG*, *ibpA* и *clpB*) и

АТФ-зависимые протеазы (*clpA*, *clpP* и *hslV*), были экспрессированы на более низких уровнях в штамме линии В. Кроме того, штаммы линии В естественным образом дефицитны в основной протеазе Lon в результате вставки IS186 в промоторную область (SaiSree et al., 2001). Уровни экспрессии DnaK и ClpB, которые коррелируют с уровнями клеточного стресса, ниже в штаммах BL21, чем в штаммах К-12 (JM105, HB101 и TOP10) (Hyun et al., 2003). К-12 также показал активацию генов белка холодового шока (*CspE*), белка углеродного голодания (*CstA*), осмотически индуцируемой пероксидазы (*OsmC*), белка фагового шока (*PspE*) и универсального стрессового белка (*UspA*), что может сделать штаммы К-12 более устойчивыми к различным стрессовым условиям, чем штаммы В. Ген *rpoE*, кодирующий индуцируемый теплом сигма-фактор σ_E , и некоторые гены в опероне (*rseABC*), регулируемые этим сигма-фактором, были высоко экспрессированы в штамме REL606. σ_E вызывает реакцию экстрацитоплазматического стресса на неправильно свернутые белки внешней мембраны и повреждение клеточной оболочки (Ruiz, Silhavy, 2005). Изменения в экспрессии генов регулона *rpoE* могут быть результатом различий в составе внешней мембраны двух линий штаммов *E. coli*.

ГЛАВА III. АЦЕТИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ У БАКТЕРИЙ КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Белки представляют собой основу живых клеток. Этот универсальный класс макромолекул участвует практически во всех клеточных процессах: белки реплицируют и транскрибируют ДНК, участвуют в синтезе, процессируют и секретируют другие белки. Они контролируют клеточное деление, метаболизм и передачу молекул в клетку и из нее. Посттрансляционные модификации (ПТМ) белков дополнительно модулируют и расширяют диапазон возможных функций белка, обеспечивая быстрые ответы при относительно низких затратах для клетки. Такие изменения аминокислотных остатков белков происходит в клетках у большинства организмов: человека (Bagwan et al., 2021), растений (Friso, Wijk, 2015), грибов (Retanal et al., 2021) и бактерий (Macek et al., 2019). Однако представленность ПТМ уникальна для каждого отдельно взятого организма.

Диапазон клеточных процессов, регулируемых с помощью ПТМ, достаточно широк. Участие во многих биологических процессах осуществляется путем влияния на структуру и динамику белков, включая сборку ферментов и их функционирование (Ryšlavá et al., 2013), межбелковые взаимодействия (Marshall 1993), межклеточные взаимодействия, перенос молекул, активацию рецепторов, растворимость белков (Pappolla et al., 2003), фолдинг (Katzman et al., 1988) и локализацию белка (Rochet, 2007). Однако, механизмы ПТМ и их влияние на процессы наиболее изучены у эукариот.

На сегодняшний день идентифицировано множество различных типов ПТМ в прокариотических и эукариотических клетках (Walsh et al., 2005). Такие модификации включают специфическое ковалентное добавление липидов (пальмитиновая кислота и т. д.), химических групп (фосфорил), углеводов (глюкоза) или иногда полноразмерных белков (например, убиквитин) к боковым цепям аминокислот. Глобально все ПТМ можно разделить на два больших класса: обратимые или необратимые (Huang et al., 2014). К обратимым реакциям относятся ковалентные модификации, а к необратимым, протекающим в одном

направлении – протеолитические модификации (Ke et al., 2016). Важной особенностью некоторых ПТМ является возможность осуществляться сразу по нескольким механизмам: при участии специальных ферментов, без участия таковых или в комбинации. Примерами ПТМ, реализующихся только по неферментативному механизму, являются карбамирование, карбонилирование, нитрозилирование, гликирование и гомоцистеинилирование (Šoškić et al., 2008). Противоположностью является самая изученная ПТМ – фосфорилирование. Данная модификация реализуется только по ферментативному механизму, а значит, для своей реализации требует специальных ферментов: прямая реакция катализируется киназами, а обратная фосфатазами, что позволяет процессу быть динамичным (Ardito et al., 2017). Также существуют ПТМ, способные реализовываться сразу по двум механизмам. Одной из таких ПТМ является ацетилирование аминокислотных остатков лизина у различных организмов, включая бактерии. У последних ацетилирование является самой распространенной ПТМ.

В отличие от клеток растений и животных, бактерии находятся в постоянно изменяющейся окружающей среде, что заставляет их адаптироваться к конкретной ситуации по-разному, например, преобразованием структурных и транспортных белков, выделением токсинов, усилением синтеза конкретных ферментов и т. д. Однако механизм приспособления к изменению окружающей среды будет выбираться с учетом затрат клеточных ресурсов, необходимых для осуществления адаптации. Иными словами, клетка выберет наиболее простой путь решения проблемы. Например, в случае, если клетки *E. coli* растут в среде, в которой одновременно присутствуют глюкоза и лактоза, в первую очередь будет утилизирована глюкоза, так как для метаболизма глюкозы требуется на два фермента меньше, чем для метаболизма лактозы.

В процессе эволюции бактерии разработали сложные механизмы регуляции как катаболических, так и анаболических путей. Основными, как и у эукариот, являются те ПТМ белков, которые затрагивают почти все аспекты клеточной активности от генотипа до функционального фенотипа (Walsh et al., 2005). ПТМ у

бактерий увеличивают функциональное разнообразие протеома и изменяют характеристики белка, такие как ферментативная активность, субклеточная локализация, стабильность, деградация и белок-белковое взаимодействие, тем самым влияют на рост клеток, вирулентность, определение кворума и хемотаксис и регулируют метаболизм в целом (Ardito et al., 2017; Ren et al., 2017; Peng et al., 2019; Yao et al., 2019).

3.1. История открытия и изучения процесса ацетилирования

Ацетилирование боковых цепей лизина было впервые обнаружено в гистоновых белках Филлипсом в 1963 г. (Phillips, 1963). В 1964 г. Алрэй связал нейтрализацию положительно заряженного лизина в хроматине с ацетилированием и ослаблением взаимодействия с отрицательно заряженной ДНК и, следовательно, с усилением экспрессии генов (Allfrey et al., 1964). Первые данные о количественном анализе всех ацетилированных клеточных белков в клетках бактерии (ацетилومه) были опубликованы в 2008 г. (Isogai, Takagi, 2021), с тех пор было проведено более 50 подобных исследований, благодаря которым стало возможным делать выводы о влиянии различных условий культивирования штаммов на эту ПТМ белков.

Известно, что ацетилирование лизина и ферменты, регулирующие данный процесс, играют ключевую роль в клеточной физиологии млекопитающих (Schröder et al., 2013; Smith et al., 2022; Ketema et al., 2021). В результате проведения исследований ацетилированного протеома в растениях (Xia et al., 2022; Yao, Shen 201 было идентифицировано 416 сайтов модифицированных лизина в 277 белках, которые участвуют в самых разнообразных биологических процессах в клетках мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) (Zhang et al., 2016). Однако степень и функции этой модификации в прокариотических клетках остаются в значительной степени неизученными, поэтому изучения процесса ацетилирования у бактерий представляет собой несомненный научный интерес.

К настоящему времени ацетиломы были тщательно проанализированы и идентифицированы у нескольких бактерий, таких как *Escherichia coli* (Isogai, Takagi, 2021), *Thermus thermophiles* (Okanishi et al., 2013), *Bacillus subtilis* (Kim et al., 2013). Интересно, что более 70% ацетилированных белков являются метаболическими ферментами и регуляторами трансляции, что указывает на тесную связь этой модификации с метаболизмом.

3.2 Влияние процесса ацетилирования на клеточный метаболизм

Wang Q. с соавторами обнаружили потенциальный регуляторный механизм, координирующий поток углерода центрального метаболизма *S. enterica* посредством обратимого ацетилирования. Авторы продемонстрировали, что ферменты центрального метаболизма у сальмонелл модифицируются по-разному в зависимости от концентрации источника углерода. Согласно результатам исследования, относительная активность ключевых ферментов, контролирующих поток гликолиза по сравнению с глюконеогенезом, а также разветвление между цитратным циклом и глиоксилатным шунтом, регулировалась ацетилированием (Wang et al., 2010).

Schilling B. с соавторами исследовали факторы, влияющие на ацетилирование лизина, сравнивая рост клеток *E. coli* на глюкозе и ксилозе. Было обнаружено, что характер ацетилирования не меняется в зависимости от утилизируемого бактерией источника углерода, скорее, влияет его количество. При этом большее количество сахара приводит к большему количеству ацетилированных аминокислотных остатков в белках (Schilling et al., 2015).

Интересно, что метаболические пути с высокой степенью ацетилирования конкурируют друг с другом как за углерод, так и за кофакторы. Например, путь Эмбдена-Парнаса-Мейергофа и глюконеогенез являются противоположными процессами; первый метаболизирует глюкозо-6-фосфат, в то время как второй синтезирует его. Глюкозо-6-фосфат является субстратом как для пути Эмбдена-Мейерхоффа-Парнаса, так и для пентозофосфатного пути (Schilling et al.,

2019). Коэнзим А (КоА) должен распределяться между метаболизмом пирувата и циклом трикарбоновых кислот (ЦТК); и пируватдегидрогеназа и 2-оксоглутаратдегидрогеназа используют КоА в качестве субстрата для синтеза, соответственно, ацетил-КоА и сукцинил-КоА. Эти ферментные комплексы также имеют общую высокоацетилированную субъединицу, липоамиддегидрогеназу (LpdA). Возможно, что ацетилирование ключевых ферментов помогает управлять метаболической конкуренцией, обеспечивая механизм, с помощью которого центральные метаболические ферменты приспособливают свою функцию к изменяющемуся статусу клетки (Keseler et al., 2013).

С регуляторной точки зрения связь между метаболизмом углерода и ацетилированием имеет смысл. Когда поток углерода превышает возможности цикла ТСА, результатом является накопление побочных продуктов, чаще всего ацетата. Данный процесс реализуется путем каскада ферментативных реакций, катализируемых фосфатацетилтрансферазой (Pta) и ацетаткиназой (AckA). В этом сценарии избыток ацетил-КоА превращается в ацетилфосфат (AcP) через Pta вместо того, чтобы входить в цикл ТСА (Wolfe, 2005). В этом случае, индуцированная глюкозой транскрипция с промоторов *prp* и *srpP* подавляется за счет регуляции на генном уровне, тем самым снижая соотношение ацетил-КоА к КоА (Lima et al., 2011).

3.3 Изменение метаболизма бактериальных клеток путем ацетилирования ферментов центрального метаболизма

Как было отмечено, ацетилирование лизина также влияет на распределение потоков между некоторыми важными ветвями метаболизма, такими как гликолиз и глюконеогенез, между глиоксилатным шунтом и циклом ЦТК, а также между ЦТК и гликолизом. Регулирование подобного рода можно добиться путем ацетилирования ключевых ферментов центрального метаболизма.

Впервые ацетилирование бактериального метаболического фермента было обнаружено при анализе ацетил-КоА-синтетазы (Acs) из *Salmonella enterica* (Starai

et al., 2002). Starai V.J. с соавторами показали, что лизин в положении 609 обратимо ацетируется ферментом из семейства лизин-ацетилтрансфераз Pat и деацетируется ферментом CobB. Показано, что присутствие ацетильной группы у лизина в этом положении блокирует каталитическую активность Acs. Позднее эта регуляция Acs с помощью ацетилирования была найдена у широкого спектра бактерий, например, у *Escherichia coli* (Castaño-Cerezo et al., 2011; Gallego-Jara et al., 2017).

Фермент *E. coli* NhoA, N-гидроксиариламин-O-ацетилтрансфераза, содержит два сайта ацетилирования, расположенные остатки лизина этих сайтов *in vitro* деацетируются ферментом CobB. Zhang Q. с соавторами выяснили, что аминокислотные замены ацетилированных остатков лизина приводили к частичной потере ферментативной функции NhoA *in vivo* (Zhang et al., 2013).

Функциональное исследование ацетилированных белков у *Aeromonas hydrophila* показало связь с основными биологическими процессами, особенно метаболическими путями. В качестве объекта более детального изучения был выбран фермент аутоиндуктора-2 – синтаза LuxS, участвующий в определении кворума бактерий. Sun L. с соавторами установили, что аминокислотный остаток лизина в положении 165 подвержен двум конкурирующим посттрансляционным модификациям – ацетилированию и сукцинированию. Согласно исследованию, ферментативная активность LuxS снижалась в результате ацетилирования, тогда как сукцинирование действует как положительный регулятор (Sun et al., 2019).

Bi J. с соавторами (Bi et al., 2017) обнаружили, что ацетилирование лизина играет важную роль в модуляции центрального углеродного метаболизма у *Mycobacterium tuberculosis*. Мутант *M. tuberculosis*, с делецией гена *cobB*, демонстрировал улучшенный рост в среде, содержащей жирные кислоты. Общий анализ ацетилома лизина данного организма выявил три ацетилированных остатка лизина (K322, K331 и K392) изоцитратлиазы (ICL1). Используя систему генетического кодирования, было показано, что ацетилирование K392 увеличивало активность фермента ICL1, тогда как ацетилирование в позиции K322 приводит к снижению уровня активности фермента.

Фосфоенолпируваткарбоксилаза (Ppc) *E. coli* катализирует карбоксилирование фосфоенолпирувата с образованием оксалоацетата и участвует в восполнении метаболитов в цикле ЦТК. Данный фермент имеет пять ацетилированных лизинов, ни один из них не находится в области активного центра и не участвует в формировании связей с субстратами. Количественный анализ ацетилированных пептидов Ppc показал, что относительное количество ацетилированного лизина в положении 317 увеличивалось во время роста на глюкозе по сравнению с ксилозой как при высоких (4%), так и при низких (0,4%) концентрациях сахара, что указывает на то, что процесс ацетилирования зависит от вида источника углерода (Sun et al., 2016).

Фермент аденозилметионинсинтаза (MAT) содержит 12 сайтов ацетилирования (Hallows et al., 2011). MAT не является субстратом ацетилтрансферазы YfiQ, а скорее аутоацетилируется в присутствии ацетил-КоА, а затем деацетилируется CobV *in vitro*. Замена лизина на глутамин или аргинин в семи сайтах ацетилирования MAT приводило к снижению ее активности.

Все эти примеры демонстрируют ингибирующие эффекты ацетилирования. До сих пор не обнаружено примеров бактериальной ферментативной активности, стимулируемой ацетилированием, однако такая регуляция была описана у эукариот.

3.4 Механизмы ацетилирования

Уже упоминалось, что ацетилирование аминокислотных остатков лизина реализуется по двум механизмам: ферментативному и неферментативному. Преобладающим механизмом является неферментативное донорство ацетильной группы высокоэнергетического соединения ацетилфосфата (AcP) на чувствительный аминокислотный остаток лизина в белке (Kuhn et al., 2014; Weinert et al., 2013).

Неферментативное ацетилирование

В своей статье Schilling В. с соавторами (Schilling et al., 2019) изучали количественное ацетилирование белков *E. coli* во время роста клеток на глюкозе и ксилозе как при высоких, так и при низких концентрациях этих сахаров. Перед исследователями стояла цель проанализировать, различается ли количественное ацетилирование лизина во время роста на двух разных источниках углерода. Исследователи не наблюдали существенных различий между количеством ацетилированных лизинов во время роста на этих двух сахарах. Однако были обнаружены количественные изменения в ацетилировании лизина в зависимости от исходной концентрации сахара, причем рост клеток при более высокой концентрации сахара вызывал большую степень ацетилирования. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что ацетилирование лизина происходит в результате накопления промежуточных продуктов метаболизма, главным образом ацетилфосфат, в условиях, благоприятствующих продукции ацетата. Другими словами, всякий раз, когда клетки производят ацетат, они также ацетируют свои белки без участия специальных ферментов. Влияние ацетилфосфата на неферментативное ацетилирование белков было обнаружено у многих бактерий, например, у *E. coli* (Kuhn et al., 2014; Weinert et al., 2013), *Bacillus subtilis* (Kosono et al., 2015) и *Neisseria gonorrhoeae* (Post et al., 2017).

Как же происходит неферментативное ацетилирование аминокислотных остатков лизина? В основе данного процесса лежит самопроизвольно протекающая химическая реакция, в результате которой не расходуются энергетически значимые субстраты (Lammers 2021). Основными химическими агентами, донорами ацетильных групп, ацетилфосфат и ацетил-КоА. Согласно результатам ранних исследований, гистоны и синтетические лизинсодержащие пептиды ацетируются *in vitro* в присутствии ацетил-КоА (Paik et al., 1970). Однако после открытия лизинацетилтрансфераз изучение неферментативного ацетилирования *in vivo* долгое время не проводилось. Интерес исследователей к изучению этого механизма вновь возник только более чем четыре десятилетия спустя.

Масштабы неферментативного ацетилирования *in vivo* впервые были оценены Weinert В. Т. с соавторами (Weinert et al., 2015). Исследователи использовали количественную масс-спектрометрию для измерения изменений степени ацетилирования белков в *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что задержка роста в сочетании с высоким «уровнем» метаболизма приводила к накоплению в клетках ацетил-КоА, посредством которого происходило ацетилирование аминокислотных остатков лизина по неферментативному механизму.

По аналогичному механизму реализуется процесс ацетилирования и в бактериях (Kosono et al., 2015). Было установлено, что по количеству чувствительных лизинов ацетилфосфат-зависимое ацетилирование превосходит ацетилирование лизинов, осуществляемое ацетилтрансферазами. Согласно кристаллографическим, ацетилфосфат может связываться с белками в их активных центрах и сайтах связывания кофакторов, а также потенциально везде, где могут связываться с белком молекулы с фосфатной группой (Kuhn et al., 2014).

Преимуществом неферментативного ацетилирования является возможность модифицировать лизины, доступ к которым пространственно затруднен для ацетилтрансфераз. Относительно небольшие молекулы ацетилфосфата и ацетил-КоА способны взаимодействовать с аминокислотными остатками лизина не экспонированными на поверхности белков (Baeza et al., 2015).

Однако до сих пор не вполне ясно, в каких условиях регулируется неферментативное ацетилирование и каковы его функции, но известно, что на него влияют реакционная способность донора ацетильной группы и его концентрация в клетках, доступность различных остатков лизина в белке и локальный pH.

Ферментативное ацетилирование

Аминокислотные остатки лизина в белках могут ацетилироваться под действием специальных ферментов – ацетилтрансфераз. Так как изначально

ацетилирование изучалось как модификация гистонов, ферменты, которые катализируют этот процесс, сначала назывались «НАТ» (расшифровывается как гистон-ацетилтрансфераза (Histone)); более широкий термин «КАТs» (расшифровывается как лизин (K) ацетилтрансфераза) получил распространение позднее. В 1996 г. была описана способность к переносу ацетильной группы у дрожжевого белка 5 (Gcn5), Gcn5 и его гомологи стали, вероятно, наиболее изученными из всех ферментов КАТ. На сегодняшний день семейство N-ацетилтрансфераз, родственное GCN5 (GNAT), представляет собой важное семейство, которое включает более 100 000 белков как в эукариотах, так и в прокариотах (Ramirez, Tolmasky, 2010).

Все известные бактериальные N-ацетилтрансферазы можно разделить на N α -ацетилтрансферазы (aNAT) и N ϵ -ацетилтрансферазы (bKAT). Первые катализируют перенос ацетильной группы с ацетил-КоА на α -аминогруппу первого аминокислотного остатка белка. N α -ацетилирование всегда опосредовано ферментами, обычно необратимо и реже встречается у бактерий. bNAT катализирует реакцию, при которой модифицируется ϵ -аминогруппа аминокислотного остатка лизина.

Механизм реакции bKAT протекает через образование тройного комплекса за счет ассоциации КАТ, Ас-СоА и субстрата. Данный процесс включает в себя три стадии:

- (i) удаление протона с целевого лизина субстрата кислотным остатком фермента, в основном глутаматом;
- (ii) нуклеофильная атака депротонированного лизина на карбонильный углерод связанного Ас-СоА;
- (iii) протонирование и высвобождение кофермента А, обычно остатком тирозина в активном центре КАТ (Christensen et al., 2019; VanDrissse, Escalante-Semerena, 2019; Hickman et al., 1999).

GNAT-KAT имеют консервативный мотив последовательности (Q/RXXGXG/A), который служит гидрофобным карманом для связывания

ацетил-КоА. Это гарантирует хорошую скоординированность фермента и субстрата для облегчения катализа.

3.5 Доменная организация бактериальных протеинацетилтрансфераз

Независимо от субстратной специфичности ацетилтрансферазы классифицируют на основе их доменной организации. На сегодняшний день обнаружено четыре доменные организации ацетилтрансфераз (Tucker, Escalante-Semerena, 2013).

Ацетилтрансферазы типа I были обнаружены у *S. enterica* и *E. coli*. Данные ферменты состоят из большого N-концевого домена (~700 аминокислотных остатков) с неизвестной функцией и GNAT-каталитического C-концевого домена (~200 аминокислотных остатков) (Starai, Escalante-Semerena, 2004). Хотя физиологическую функцию большого N-концевого домена еще предстоит определить, исследования показали, что каждый мономер фермента *S. enterica* связывает две молекулы ацетил-КоА, одну на C-концевом домене и одну на N-концевом (Thao, Escalante-Semerena, 2012). Возможно, что связывание ацетил-КоА с N-концевым доменом является регуляторным механизмом, запускающим ацетилирование, но это еще предстоит продемонстрировать экспериментально.

Ацетилтрансферазы типа II были обнаружены у *Streptomyces lividans* (PatA) (Tucker, Escalante-Semerena, 2013). Этот тип ацетилтрансферазы уникален по ориентации домена. В отличие от bGNAT типа I, N-концевой домен ферментов типа II является каталитическим (~200 аминокислотных остатков), а C-концевой регуляторным (~900 аминокислотных остатков), который имеет неизвестную функцию.

Ацетилтрансферазы типа III сходны с типом I тем, что содержат N-концевой регуляторный домен и C-концевой каталитический домен GNAT. Ферменты III типа отличаются тем, что их регуляторный N-конец меньше (примерно 300–400 аминокислотных остатков), а их специфические регуляторные функции известны.

Ацетилтрансферазы типа IV не имеют регуляторного домена и состоят только из каталитического домена GNAT. Ацетилтрансферазы с такой организацией домена наиболее распространены у бактерий. Например, *S. enterica* имеет одну ацетилтрансферазу типа I и 25 ацетилтрансфераз типа IV. Есть несколько известных исключений из этого правила, например, у *Bacillus subtilis* обнаружены исключительно ацетилтрансферазы типа IV.

В литературе имеется множество примеров, подтверждающих вывод о том, что у бактерий ферментативное ацетилирование белков имеет большое физиологическое значение. Хотя не понятно, что вызывает активность ацетилтрансфераз, известно, что ацетилирование необходимо для поддержания клеточного гомеостаза, модуляции транскрипции основных генов и изменения клеточного метаболизма в зависимости от стрессовых факторов окружающей среды или ниш (Thao et al., 2010).

3.6 Ацетилирование и устойчивость к антибиотикам

Информации о новых исследованиях процесса ацетилирования с каждым днем становится все больше. Это создает прочную основу для дальнейшей характеристики ферментов семейства GNAT. Ацетилирование в сочетании с деацетилированием представляет собой быстрый способ для клетки регулировать клеточный метаболизм и участвует во множестве важных процессов, начиная от вирулентности и, заканчивая центральным метаболизмом и связыванием ДНК.

На сегодняшний день вызывают беспокойство механизмы возникновения устойчивости к антибиотикам у бактерий, и поэтому ведется поиск новых антимикробных стратегий. Проведенные исследования уже выявили несколько механизмов, с помощью которых бактерии справляются с антибиотиками, включая мутации в различных генах, приобретение плазмид, придающих резистентность, модификацию или деградацию мишеней для антибиотиков, ингибирование или подавление проницаемости мембран и стимулирование оттока лекарств (Alekshun, Levy, 2007; Almeida, Palomino, 2011). Однако понимания роли

и вклада отдельно взятых генов или белков недостаточно (Alonso et al., 2001; Anderson, 2005), необходимо разрабатывать подходы для анализа механизмов, которые могут предоставить исчерпывающую информацию о полном комплексе реакций и их взаимодействие, связанных с возникновением устойчивости у бактерий к антибиотикам.

Все больше и больше работ проливают свет на значимость регулирования метаболизма в формировании устойчивости бактерий к антибиотикам. В большинстве своем исследования в данной области проводятся путем протеомного анализа патогенных штаммов.

Fang Z. с соавторами использовали количественный протеомный анализ в сочетании с обогащением антителами, чтобы исследовать, как ацетилирование влияет на устойчивость бактерий к β -лактамам (ампициллину), аминогликозидам (канамицину) и полипептидам (полимиксину В). Показано, что ацетилирование лизина позитивно влияет на подвижность бактерий и отрицательно на энергетический обмен. Исследуя роль ацетилирования, авторы обнаружили ключевые ацетилированные регуляторные белки, которые открывают новую перспективу для изучения механизмов бактериальной резистентности. Кроме того, было установлено, что деацетилирование лизина K413 белка RukF может повысить ферментативную активность этого фермента, что приводит к усилению энергетического метаболизма в бактериях, что, в свою очередь, повышает чувствительность штаммов к антибиотикам (Fang et al., 2022).

Изучая протеом *Edwardsiella tarda*, Fu Y. с соавторами (Fu et al., 2022) обнаружили, что белок RukF также ацетилирован, хотя и по иным сайтам. Авторы установили, что по крайней мере 45 ацетилированных белков участвуют в возникновении бактериальной устойчивости к противомикробным препаратам

Vetting M. W. с соавторами (Vetting et al., 2004) анализировали структурные и каталитические корреляции между членами суперсемейства N-ацетилтрансфераз у про- и эукариот. У бактерии *Salmonella enterica* исследователями был обнаружен структурно подобный аналог Hpa2-кодируемой гистоновой ацетилтрансферазе из *Saccharomyces cerevisiae*, состоящий из 145 аминокислот. Предсказанный фермент,

показал значительную гомологию аминокислотной последовательности с другими аминогликозид-6'-ацетилтрансферазами и членами этого суперсемейства. Данный фермент способен связывать белки и пептиды, а также аминогликозиды, вызывая резистентность организма к этому классу антибиотиков. Все проанализированные структурные и каталитические сходства приводят к предположению, что кодируемые бактериальные ацетилтрансферазы, в том числе функционально идентифицированные как аминогликозидацетилтрансферазы, являются эволюционными предшественниками эукариотических гистоновых ацетилтрансфераз

При сравнении резистентных и чувствительных к ципрофлоксацину штаммов *Salmonella* выявляются частично ацетилированные белки, относящиеся к метаболическим процессам биосинтеза антибиотиков и бактериального хемотаксиса. Среди дифференциально ацетилированных белков 14 непосредственно вовлечены в устойчивость к антибиотикам, а ацетилирование по лизину представляет собой существенное различие между устойчивым и чувствительным штаммом (Li et al., 2018).

3.7 Практическое применение

Основной принцип конструирования штаммов-продуцентов экономически значимых продуктов заключается в перенаправлении потока углерода по заданному пути и увеличении его уровня конверсии. Регуляция такого потока определяется активностью его ключевых ферментов и их взаимодействием с другими ферментами центрального метаболизма. На первых этапах развития науки это достигалось путем селекции и отбора штаммов на токсичных для клеток аналогах целевого продукта или промежуточных метаболитов. Таким образом, исследователям удавалось снимать ингибирование ферментов конечным продуктом, увеличивать синтез белков и усиливать экспорт продукта. Позже, с развитием молекулярно-биологических методов, появились подходы,

сформировавшие новое направление, которое получило название метаболическая инженерия.

Первые рекомбинантные штаммы-продуценты представляли собой клетки, содержащие плазмидные ДНК, несущие ключевые гены для биосинтеза целевого продукта. Наличие таких плазмид позволяло достаточно легко экспрессировать как чужеродные, так и нативные гены в клетках микроорганизмов; до широкого распространения молекулярно-биологических методов данный подход был единственным способом увеличить число копий (плазмид генов). В дальнейшем благодаря развитию генетического инструментария стало возможным увеличение количества копий генов и оперонов путем их интеграции в хромосому, что повысило стабильность штаммов по сравнению с плазмидными аналогами (Gorshkova, 2018).

Оптимизация уровня экспрессии интегрированных генов достигается за счет использования промоторов разной силы и их усовершенствования, прокариотических промоторов, что в свою очередь позволяет регулировать метаболические потоки путем воздействия на транскриптом (Katashkina et al., 2005).

На сегодняшний день очень мало исследований посвящено ацетилированию белков как инструменту создания бактериальных штаммов-продуцентов. Детальное изучение этой посттрансляционной модификации у бактерий позволит разработать новые подходы «тонкой настройки» метаболизма, путем влияния на уже синтезированные белки. В развивающейся области ацетилирования белков существует еще множество нерешенных вопросов и потенциальных возможностей для использования в фундаментальной и прикладной областях науки. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что ферментативная активность белка — не единственный аспект, на который влияет ацетилирование аминокислотных остатков лизина, и, возможно, нам необходимо уделять больше внимания влиянию ацетилирования на структуру, олигомеризацию и белок-белковое взаимодействие.

ГЛАВА IV. МИНИМИЗАЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АЦЕТАТА ПРИ ФЕРМЕНТАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ У *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli была первой и остается одной из самых часто используемых производственных организмов в промышленной биотехнологии. Аэробные культуры *E. coli* с высокой плотностью клеток чаще всего используются для достижения высоких выходов биомассы и высоких концентраций целевых метаболитов или белков. Обычно в этих культурах с высокой плотностью клеток в качестве источника углерода подается глюкоза – дешевый и доступный источник углерода, который метаболизируется гликолизе (путь от глюкозы до ацетил-КоА). Более того, в среде с несколькими источниками углерода глюкоза является предпочтительным в результате катаболитной репрессии. При гликолизе, который является основным путем промежуточного метаболизма сахаров у энтеробактерий, при котором усваивается до 72% всего углеродного потока. Однако, во время аэробных ферментационных процессов при высоких темпах роста накапливаются значительные количества ацетата, как описано (Akkesson et al., 1999). Продукция ацетата не только является потерей углерода и, следовательно, экономическим убытком, но также вредно для производства целевых продуктов, а также способствует ингибированию роста клеток (Dittrich et al., 2005).

Образование ацетата в культурах *E. coli* в полностью аэробных условиях может быть вызвано одной из двух причин. С одной стороны, локальный недостаток растворенного кислорода активирует пути метаболизма, вызывая выделение ацетата. Это называется смешанно-кислотным брожением. С другой стороны, это выделение ацетата также обусловлено механизмом метаболического переполнения, вызванным дисбалансом между быстрым поглощением глюкозы и ее превращением в биомассу и продукты, направляя ацетил-КоА из цикла трикарбоновых кислот в ацетат (Akkesson et al., 1999).

Два основных аэробно зависимых пути образования ацетата у *E. coli* регулируются пируватоксидазой (PoxB) и опероном, состоящих из генов,

кодирующих ферменты ацетилфосфатсинтазу - фосфатрансацетилазу (AckA-Pta) (Kakuda et al., 1994). Фосфатрансацетилаза [ЕС 2.3.1.8] обратимо преобразует ацетил-КоА и неорганический фосфат в ацетилфосфат и КоА, а ацетаткиназа [ЕС 2.7.2.1] обратимо преобразует ацетилфосфат и АДФ в ацетат и АТФ. Оба гена считаются важными для сбалансированного потока углерода внутри клетки во время экспоненциального роста, как аэробно, так и анаэробно (Avison et al., 2001). *E. coli* использует путь AckA-Pta в качестве источника производства АТФ в анаэробных и даже аэробных условиях (Chang et al., 1999).

Второй фермент, пируватоксидаза [ЕС 1.2.2.2], является периферическим мембранным белком, который преобразует пируват, убихинон и H₂O в ацетат, убихинол и CO₂. Сообщалось, что он является несущественным аэробным ферментом, активным в ранней стационарной фазе (Chang et al., 1983). Однако более поздние исследования показали, что пируватоксидаза играет важную роль в эффективности аэробного роста *E. coli* (Abdel-Hamid et al., 2001), возможно, для сохранения пула свободного CoA-SH. Дитрих и др. (Dittrich et al., 2005) подтверждают, что метаболический поток, регулируемый RoxB более активен во время поздней экспоненциальной и стационарной фазе, тогда как путь ackA-ptA более активен на экспоненциальной стадии роста клеток. Также сообщается, что на два пути, продуцирующих ацетат, влияют условия культивирования, такие как значения pH. Кислые среды подавляют путь ackA-ptA, но активируют поток, регулируемый RoxB. Кроме того, сам ацетат оказывает сильное негативное воздействие на оба пути (Dittrich et al., 2005).

Образование ацетата имеет ряд недостатков:

- концентрации ацетата выше 1 г/л наносят ущерб как производству биомассы, так и производству рекомбинантных белков (Contiero et al., 2000);
- помимо ингибирования продукции рекомбинантного белка, ацетат оказывает отрицательное влияние на стабильность внутриклеточных белков (Becker et al., 1998);
- органические кислоты уже проявляют отрицательные эффекты при концентрациях, намного меньших, чем у минеральных кислот.

Недиссоциированная форма ацетата может свободно перемещаться через клеточную мембрану и, таким образом, накапливаться в среде. Часть этой внеклеточной, недиссоциированной формы будет повторно попадать в клетку и диссоциировать из-за более высокого внутреннего значения pH. Таким образом, ацетат действует как проводник протонов, и этот процесс вызывает снижение движущей силы протонов (Diaz-Ricci et al., 1990);

- накопление ацетата в среде приведет к ее закислению. При значениях pH ниже 5,0 произойдет лизис клеток из-за необратимой денатурации белков и ДНК (Cherrington et al., 1991)

Уровень ацетата, образующегося во время аэробной ферментации, зависит от штамма *E. coli*, условий роста, фактической концентрации глюкозы в среде и общего состава среды ферментации (Wolfe, 2005).

Исследователи испробовали множество стратегий для снижения накопления ацетата в ферментациях *E. coli* с высокой плотностью клеток. Эти стратегии находятся на двух уровнях: уровне биопроцесса и генетическом уровне.

4.1 Подходы на уровне биопроцессов для минимизации образования ацетата

Эти методы в основном направлены на изменение в составе среды и/или условия культивирования. Ход ферментации можно оптимизировать, контролируя ряд параметров, таких как температура, режим перемешивания, объем, вспенивание, концентрацию растворенного кислорода, значения pH, оптическая плотность, ограниченная концентрация субстрата или способ его подачи.

Культура *E. coli* будет генерировать ацетат, когда клетки превысят пороговую скорость потребления глюкозы, независимо от доступности кислорода для культуры (Eiteman et al., 2006). В литературе упоминается несколько конкретных стратегий ферментации для снижения уровней продукции ацетата (Lin et al., 2001). Эти методы основаны на математических моделях, которые описывают

закономерности роста и ожидаемую потребность в питательных веществах. Также стратегии включают различные подходы к скорости подачи глюкозы (Kleman et al., 1994), ограничения скорости роста схемами периодической подачи источника углерода с ограничением по субстрату (Lee, 1996) и использование альтернативных источников углерода, таких как глицерин (Hahn et al., 1994), манноза (Andersen et al., 1980) или фруктоза (Aristidou et al., 1999). Например, сообщалось о снижении уровня накопления ацетата и увеличении выхода белка, когда в качестве источника углерода вместо глюкозы использовалась фруктоза (Aristidou et al., 1999). Также было показано, что ее добавление в среду положительно влияет на снижение концентрации ацетата (Han et al., 1992). Другим подходом к поддержанию скорости роста ниже порогового значения для выработки ацетата является рН-стат, где активируется питательная подпитка, если значения рН увеличивается и изменяется, тогда культура получает больше питательных веществ, чем необходимо. Однако основным недостатком рН-стата является то, что он обнаруживает голодание, а не пороговое значение концентрации ацетата напрямую (Eiteman et al., 2006). В целом, следствием ограничения скорости роста является то, что биомасса генерируется медленнее, чем в иных условиях.

Вместо снижения скорости роста, полученный ацетат может быть удален из культуры во время процесса ферментации, чтобы уменьшить ингибирующее действие ацетата. В литературе сообщается об использовании диализных ферментеров для удаления ацетата из культуры (Fuchs et al., 2002). Диализ определяется как разделение молекул растворенного вещества путем их неравной диффузии через полупроницаемую мембрану на основе градиента концентрации. Недавно был описан другой метод удаления ацетата из ферментера с помощью макропористых ионообменных смол (Sen et al., 2005). Однако методы удаления ацетата из культуры, как правило, удаляют также и питательные вещества. Кроме того, эта стратегия не учитывает тот факт, что углерод отводится в побочный продукт и, таким образом, в экономичный сток.

Хотя эти методы широко используются в отрасли, они не являются лучшими решениями, поскольку отрицательно влияют на максимальный рост и производительность штаммов-продуцентов.

4.2 Генетические подходы к минимизации образования ацетата

Также сообщалось о нескольких стратегиях, которые вмешиваются в образование ацетата на генетическом уровне. Эти стратегии основаны на изменении центрального метаболизма *E. coli*.

Путь от гликолиза к циклу трикарбоновых кислот очень важен из-за множества реакций, которые играют роль в точке разветвления пирувата. Из этой точки разветвления поток углерода может быть направлен на производство ацетата через гены, кодирующие ацетаткиназу (*ackA*), фосфотрансацетилазу (*pta*), ацетил-КоА-синтазу (*acs*) и пируватоксидазу (*poxB*). Поток также может быть направлен в цикл трикарбоновых кислот (цитратсинтаза, *gltA*), где обход глиоксилата играет важную роль в регуляции (изоцитратлиаза, *ackA*; малатсинтаза, *aceB* и изоцитратдегидрогеназа; *icd*).

Одна из стратегий минимизации продукции ацетата путем генетических преобразований это усиление путей его ассимиляции. Потребление ацетата достигается за счет его превращения обратно в ацетил-КоА с помощью ацетил-КоА-синтетазы (*Acs*) и обратного действия *Pta-AckA* (Phue, Shiloach, 2004). *Acs* позволяет *E. coli* использовать ацетат в качестве источника энергии для создания строительных блоков, обеспечивающих выживание в периоды голодания (Báez-Viveros et al., 2007). Сверхэкспрессия *Acs* в *E. coli* приводит к значительному снижению накопления ацетата (Lin et al., 2006).

Причины накопления клетками ацетата сложны. Первоначально считалось, что это явление вызвано ограниченной дыхательной способностью клеток, что приводит к накоплению восстановленных кофакторов (НАД(Ф)Н), промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и ацетил-КоА (Han et al., 1992; Varma and Palsson, 1994). Хотя проблема до конца не изучена, в

настоящее время принято считать, что она является результатом нескольких комбинированных эффектов. Регуляция метаболизма ацетата в клетках *E. coli* является результатом взаимодействия нескольких взаимосвязанных и взаиморегулируемых подходов, действующих на разных клеточных уровнях: транскрипция генов, посттранскрипционная регуляция, модуляция активности белков низкомолекулярными молекулами и т. д. (Basan et al., 2015; Enjalbert et al., 2015; Peebo et al., 2015; Schilling et al., 2015; Valgepea et al., 2010). Все эти механизмы регуляции действуют в клетке одновременно, но их вклад в регуляцию метаболизма ацетата в *E. coli* изучается и по сей день.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА V. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1 Работа с бактериальными культурами

Штаммы *E. coli* культивировали аэробно на полноценной и минимальной средах при 37°C. В качестве полноценной использовали среды LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl), SOB (20 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 0,5 г/л NaCl, 0,186 г/л KCl, 450,95 г/л MgCl₂, pH = 7,0), SOC (идентична по составу среде SOB, но дополнительно содержит 20 мМ глюкозы), в качестве минимальной – среды M9 (0,04 М Na₂HPO₄, 0,02 М KH₂PO₄, 0,019 М NH₄Cl, 0,008 М NaCl) с добавлением в качестве источника углерода глюкозы (5 или 10 г/л), MOPS с добавлением 0,25 мМ KH₂PO₄ и 0,4% глюкозы в качестве источника углерода.

Используемые концентрации антибиотиков (в мкг/мл): хлорамфеникол (Cm) – 40; канамицин (Km) – 50, 100; тетрациклин (Tc) – 12,5; ампициллин (Ap) – 100.

5.2 Бактериальные штаммы и плазмиды

Таблица 1 - Бактериальные штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
MG1655	F ⁻	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ РАН
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3)	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ РАН
MG1655 Δ ackA	ilvG rfb-50 rph-1, Δ ackA::kan	Данная работа
MG1655 Δ cobB	ilvG rfb-50 rph-1, Δ cobB::kan	Данная работа
MG1655 Δ patZ	F ⁻ , ilvG rfb-50 rph-1, Δ patZ::kan	Данная работа
PRO (продуцент L-пролина)	702ilvA	ВКПМ В-8012
PRO Δ ackA	702ilvA, Δ ackA::kan	Данная работа
PRO Δ cobB	702ilvA, Δ cobB::kan	Данная работа
PRO Δ patZ	702ilvA, Δ patZ::kan	Данная работа
THR (продуцент L-треонина)	MG1655 Δ tdh, rhtA23, pVIC40	ВКПМ В-2307
THR Δ ackA	MG1655 Δ tdh, rhtA23, pVIC40, Δ ackA::kan	Данная работа
THR Δ cobB	MG1655 Δ tdh, rhtA23, pVIC40, Δ cobB::kan	Данная работа
THR Δ patZ	MG1655 Δ tdh, rhtA23, pVIC40, Δ patZ::kan	Данная работа
ТА-81	THR - ЛАЭ	Данная работа
ТА-71	THR - ЛАЭ	Данная работа
ТМ-29	THR - УФ-мутагенез	Данная работа
SENS-THR	MG1655 Δ thrABC/pSENS	Данная работа

Таблица 2 - Плазмиды, использованные в работе

Название	Устойчивость к антибиотикам	Характеристики	Источник
pKK-gapA ^{WT}	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	Данная работа
pKK-gapA ^K	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	Данная работа
pKK-gapA ^{AT} _к	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	Данная работа
pET15b	Amp	ori pBR322, P _{T7} , T _{T7}	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ РАН
pNSP1	Cm	ori pBR322, P _{T5} , T _{rrnB}	Данная работа
pNSP1-patZ	Cm	ori pBR322, P _{T5} -patZ-T _{rrnB}	Данная работа
pKD20	Amp	ori R101, repA101(ts), P-gam-bet-exo	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ РАН
pVIC40	Str	ori pRSF1010, thrA*BC	ВКПМ В-2307
pCOB	Cm	pET15b-T5-cobB-TrrnB	Данная работа
pSENS	Amp	T5-gfp	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ РАН

5.3 Олигонуклеотиды, использованные в работе

Таблица 3 - Олигонуклеотиды, использованные в работе

ID	Праймер	Последовательность (5'→3')
P1	<i>ybhB</i> -Km	ctttctgcaaacagaaggagggttcacgctcaagtagtataaaaaagctgaacgag
P2	<i>gapA</i> -Km	gccagttggtgtaatgtttgttagaatcgtaattgaagcctgcttttta
P3	Km- <i>gapA</i>	acttagtataaaaaagcaggctcaattacgattctaacaacattaac
P4	<i>gapA</i> - <i>ybhB</i>	gcgccatctggcagagtgattaactaaacatcgcagtaattatttggagatgtgagcgatcaggt
P5	<i>ybhB</i> -up	gcaacagttgcagcgtctga
P6	<i>ybhB</i> -down	gttgagctacaggcggtcag
P7	<i>gapA</i> -down	tgatttcagcgtccacggcag
P8	<i>gapA</i> -up	gccgtcacgcttgttatgc
P9	del- <i>gapA</i> -R	gctcacatctcactttaatcgtgctcacattacgtgactcgcctcaagtagtataaaaaagc
P10	del- <i>gapA</i> -L	gatgtgatttcagcgtccacggcaggttgcgggcaaaatgaagcctgctttttataactaag
P11	<i>patZ</i> -HindIII-NotI	ttgccagcgcgaggaatcaaagcttgcggccgcactcgag
P12	<i>patZ</i> -NcoI	ccagtcctcgetgacctatggccatcgcc
P13	<i>cobB</i> -NcoI	gatgaccccgacgcgacacctatggccatcgccggctg
P14	<i>cobB</i> -HindIII-NotI	gattaaaagcgggaagcattgccaagcttgcggccgcactcgagcac
P15	del- <i>patZ</i> -R	cgtttaaactcattcggtcacttctgcgggagaccggtatggtgtaggctggagctgcttcg
P16	del- <i>patZ</i> -L	gattaagtggcaacatttcagctacttactcatgattcctgtcaaacatgagaattaattccg
P17	<i>patZ</i> -up	tcacagcagaacagttagaa
P18	<i>patZ</i> -down	tgggcaaggtgtgttga

Таблица 3 - Олигонуклеотиды, использованные в работе - продолжение

ID	Праймер	Последовательность (5'→3')
P19	del- <i>cobB</i> -R	ccttcctacatctaaccgattaaacaacagagggtgctatggtgtaggctggagctgcttcaagt
P20	del- <i>cobB</i> -L	ggcctgataagecgtagtgcatcaggcaatgcttcccgtttctgtcaaacatgagaattaattccggg
P21	<i>cobB</i> -up	tcttacctgtagctcgtgtcc
P22	<i>cobB</i> -down	tcgataatagctttgcga
P23	del- <i>ackA</i> -R	ctgacggttttttagccacgtatcaattataggtacttccatggtgtaggctggagctgcttcaag
P24	del- <i>ackA</i> -L	cgccagctgagctggcgggtgaaatcaggcagtcaggcggctctgtcaaacatgagaattaattc cgg
P25	<i>ackA</i> -up	gcatgatgtaatacataaatgtcggg
P26	<i>ackA</i> -down	ggacacggttatcctctttcgttac
P27	Cm-EcoRI	tttttgaattctgatcggcacgtaagagggtc
P28	Cm-PstI	ttttctgcagttacgccccgcctgccac
P29	T5-BglII	tttttagatctcataaaaaatttttget
P30	T5-XbaI	ttttttctagatattataattgttatccgctcacia
P31	TrrnB-BamHI	tttttggatccattgtcctactcaggagag
P32	TrrnB-HindIII	tttttaagcttcaaataaacgaaaggctcagtc
P33	patZ-NcoI	tttttccatggatgctgtcgcgctgggggt
P34	patZ-BamHI	tttttggatcctcaggcaatgcttcccgt
P35	<i>cobB</i> -NcoI	tttttccatggatgctgtcgcgctgggggt
P36	<i>cobB</i> -BamHI	tttttggatcctcaggcaatgcttcccgt
P37	del- <i>thrABC</i> -R	gtaacgaggtaaacaacctggtgtaggctggagctgcttcaagttcctatactttctagag
P38	del- <i>thrABC</i> -L	catgagaattaattccggggatccgtcgacctgcagttcgaagttcctattctctag
P39	<i>thrABC</i> -up	acacagaaaaagcccgcac
P40	<i>thrABC</i> -down	gcaaaccggcctgattga

5.4 Конструирование плазмиды, несущей ген, кодирующий деацетилазу CobB для коэкспрессии

Для создания стабильной многокопийной плазмиды, способной экспрессироваться в любом штамме *E. coli*, был изменен коммерчески доступный вектор pET15b (Novagen, США). Для поддержания плазмиды в клетках в течение длительного культивирования маркер устойчивости к ампициллину был заменен на маркер устойчивости к хлорамфениколу с помощью праймеров P27 и P28. Промотор фага T7, способный распознаваться только РНК-полимеразой того же фага, был заменен промотором фага T5, который может быть распознан РНК-полимеразами *E. coli*, с помощью праймеров P29 и P30. Синтетический промотор фага T5 также находился под аналогичной репрессией *lacI*. С той же целью был изменен терминатор фага T7 на TrrnB с помощью праймеров P31 и P32. После этого в сконструированный вектор был клонирован ген, кодирующий деацетилазу CobB с помощью праймеров P35 и P36. В качестве матрицы для амплификации была использована хромосома штамма *E. coli* MG1655. Идентичность всех амплифицированных фрагментов ДНК была подтверждена секвенированием, а уровень синтеза белка был проверен в штамме *E. coli* MG1655.

5.5 Электротрансформация компетентных клеток *E. coli*

Для приготовления электрокомпетентной культуры выращивали ночную культуру на среде LB, разводили ее в соотношении 1:100 средой SOB и подращивали с хорошей аэрацией до $ОП_{600}=0.8-1.0$. Клетки из 10 мл культуры трижды промывали равным объемом ледяной деионизованной воды, затем однократно 200 мкл 10% глицерина и суспендировали в 40 мкл холодного 10% глицерина. ДНК растворяли в 5 мкл деионизованной воды и добавляли к культуре непосредственно перед проведением электропорации. Электропорацию проводили на приборе для бактериальной электротрансформации фирмы BioRad, США

(каталожный номер 165-2098, версия 2-89). Параметры электрического импульса задавали в соответствии с рекомендациями производителя для *E.coli* (время импульса 4-5 мсек, напряженность электрического поля 12.5 кВ/см).

После проведения электропорации к клеточной суспензии немедленно добавляли 1мл среды SOC, после чего клетки подращивали с аэрацией в течение 2 часов при 37°C и высевали на чашки с агаризованной селективной средой. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C.

5.6 Получение тест-культуры

Гены *thrABC* в хромосоме *E. coli* инактивировали с применением Red-зависимой системы по методу, описанному выше с использованием вспомогательной плазмиды pKD20. Кассету $\Delta thrABC::Km$ конструировали с помощью праймеров P37 и P38; проверяли делеции генов с помощью праймеров P39-P40. В полученные штаммы была введена плазида pSENS, несущая ген *gfp* под конститутивным промотором фага T5.

5.7 Получение препарата фага P1vir для трансдукции в клетки *E. coli*

Для получения фаголизата штамм-донор подращивали на среде LB до ОП₆₀₀=2. К 2,5 мл бактериальной культуры добавляли 2.5 мл расплавленного R-агара (триптон 10 г/л, NaCl 8 г/л, дрожжевой экстракт 1 г/л, агар 0.8%) и по 20, 40, 60, 100 мкл 3 разведения исходного фаголизата. Полученные смеси выливали на чашки с LB-агаром и инкубировали в течение ночи при 37°C. Для получения лизата выбирали чашку, на которой фаговые бляшки почти сливались (образовывали «сеточку»). На такую чашку наливали 2,5 мл LB, верхний слой шпателем собирали в пробирку, добавляли 1-5% хлороформа, тщательно перемешивали и оставляли на 1 час при комнатной температуре. Для осаждения

клеток и агара проводили центрифугирование на центрифуге K23 в течение 30 минут при 4000 об/мин. Супернатант собирали.

Клетки из 500 мкл ночной культуры штамма-реципиента собирали центрифугированием, суспендировали в 100 мкл буфера $MgSO_4$ 0.1 М, $CaCl_2$ 5 мМ, добавляли лизат фага нужного разведения (10^9 фаговых частиц/мл) и инкубировали 30 минут при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием, промывали 1 мл стерильного физиологического раствора 3 раза, суспендировали в 100 мкл физиологического раствора и высевали на чашку с селективной средой. Отбор трансдуктантов проводили методом реплик (Miller J.H., 1972).

5.8 Интеграция фрагментов ДНК в бактериальную хромосому, с использованием Red-зависимой системы рекомбинации бактериофага λ .

Введение маркированных модификаций в геном клеток *E.coli* осуществляли с использованием Red-зависимой рекомбинации бактериофага λ , как предложено Datsenko и Wanner (Datsenko K.A., Wanner B.L., 2000). В качестве плазмиды, содержащей гены Red-системы, использовали pKD20 (с ts-чувствительным репликоном, в которой экспрессия генов λ *exo*, *bet*, *gam* осуществляется с контролируемого арабинозой промотора P_{araB}). Для последующего удаления маркера устойчивости к антибиотику из бактериальной хромосомы использовали Int/Xis-зависимые системы сайт-специфической рекомбинации бактериофагов λ и $\phi 80$, впервые примененные для решения аналогичных задач в работах (Datsenko K.A., Wanner B.L., 2000).

Для конструирования кассеты, содержащей дополнительную копию гена *gapA*, были синтезированы два фрагмента: первый, несущий ген устойчивости к канамицину - на основе фрагмента attL λ -Km-attR λ с помощью праймеров P1 и P2; второй, несущий ген *gapA** с собственной регуляторной областью, - на основе плазмид pKK-*gapA*^{WT}, pKK-*gapA*^{D34K} или pKK-*gapA*^{D34KG188TP189K} помощью праймеров P3 и P4. Полученные фрагменты ДНК использовали в качестве матрицы для синтеза полноразмерной кассеты km-*ybhB*::*gapA* посредством

перекрывающейся ПЦР с использованием праймеров P1 и P4. Введение дополнительной копии гена *gapA* в хромосому осуществлялось методом Red-зависимой интеграции; ее наличие контролировалось ПЦР с использованием праймеров P5-P6. В заключение маркер устойчивости к канамицину был удален, что также контролировалось ПЦР с использованием праймеров P5-P6.

Инактивация гена *gapA* на хромосоме *E. coli* осуществлялась с использованием Red системы фага λ по методу, описанному в работе с использованием плазмиды pKD20. Конструирование кассеты $\Delta gapA::Km$ осуществлялось с помощью праймеров P9-P10; проверка делеции гена *gapA* – с помощью праймеров P7-P8.

5.9 Оценка накопления L-аминокислот в культуральной среде

Первоначально штаммы-продуценты L-аминокислот выращивали в течение 18–24 ч при температуре 37°C на чашках с LB-агаром, содержащим антибиотик хлорамфеникол в случае продуцента пролина и стрептомицин в случае продуцента треонина. Для получения посевной культуры штаммы выращивали в пробирках размером 20 × 200 мм, содержащих 2 мл LB с добавлением указанных выше антибиотиков, на ротационной шейкере (250 об/мин) при 37 °C в течение 18 ч. Далее в ферментационную среду вносили 0,2 мл ночной культуры (10%). Ферментацию проводили в пробирках с 2 мл ферментационной среды. После культивирования количество аминокислот в среде определяли методом капиллярного электрофореза. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра THERMO FISHER SCIENTIFIC Genesys 150.

L-пролин. Ферментацию штаммов-продуцентов L-пролина проводили в течение 72 ч при 32°C с перемешиванием при 240 об/мин. Состав ферментационной среды (г/л): глюкоза – 60, (NH₄)₂SO₄ – 25, KH₂PO₄ – 2, MgSO₄·7H₂O – 1,0, L-изолейцин – 0,05; Тиамин–HCl – 0,0001, CaCO₃ – 25, pH 7,2.

L-треонин. Ферментацию штаммов-продуцентов L-треонина проводили в течение 72 ч при 32 °C с перемешиванием при 240 об/мин. Состав

ферментационной среды (г/л): глюкоза – 80,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 22,0; NaCl – 0,8; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; Тиамин–HCl – 0,0002; Дрожжевой экстракт – 1,0; CaCO_3 – 30,0; pH 7,0.

Продуктивность штаммов определялась как отношение продукции аминокислоты (г/л) к оптической плотности (OP_{600}).

5.9 Измерение активности глицеральдегидфосфат дегидрогеназы

Культуру клеток выращивали в минимальной среде M9 в течение 4–8 ч при 37°C (до OP_{600} 2.0), центрифугировали, дважды промывали физиологическим раствором и разрушали с помощью звукового дезинтегратора в буфере следующего состава: 100 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 20 мМ KCl, 0.5 мМ EDTA, 2 мМ DTT.

Активность ГАФД измеряли спектрофотометрически в клеточных экстрактах с добавлением NAD^+ (Serva) (2 мМ). Очистку ГАФД для определения кинетических параметров проводили фракционным осаждением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для дальнейшей работы использовали фракцию белка, осажденную при 75–85% насыщения сульфатом аммония (фракция III).

Электрофорез тотального белка в 15%-полиакриламидном геле выполнен в соответствии с методикой, представленной Лэмли. Определение количества белка в экстрактах проводилось по методу Брэдфорда с использованием реактива Bio-Rad Protein Assay (“Bio-Rad Laboratories GmbH”, Германия).

5.10 Идентификация ацетилированных аминокислотных остатков лизина в белках

Протеолитический гидролиз белков из геля проводился с использованием трипсина Gold (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя.

ВЭЖХ-МС анализ проводился на квадрупольно-времяпролетном масс-спектрометре высокого разрешения Impact II (Bruker Daltonik, Германия),

оснащённым источником ионизации электрораспылением Apollo II (Bruker Daltonik, Germany) и УВЭЖХ Elute (Bruker Daltonik, Германия) на обращенно-фазовой колонке Waters Acquity HSS T3 1.8 мкм 2.1 × 100 мм (Waters, Ирландия) в следующих условиях: объем вкола 10 мкл, скорость потока 0.25 мл/мин, градиентное элюирование от 5% до 60% Б за 30 мин, затем до 95% Б за 3 мин (А: 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде, Б: 0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле), температура колонки 30 °С, постколоночное разделение потока 1:20, ионизация электрораспылением в положительном режиме ионов, потенциал на капилляре 4.5 кВ, распыляющий газ – азот 1.0 бар, осушающий газ – азот 5.0 л/мин 200 °С, диапазон сканирования m/z 100-2200, частота сканирования для полного спектра 2 Гц, автоматический режим регистрации спектров второго порядка (активация соударением) с динамической частотой регистрации 2–6 Гц, длина цикла 2 с, предпочтительные зарядовые состояния 2–6, столкновительный газ – азот, динамическая энергия соударений (20 эВ на m/z 300, 65 эВ на m/z 1300), автоматическая внутренняя калибровка по раствору трифторацетата натрия.

Обработка спектров и идентификация белков осуществлялись с использованием программного пакета BioPharma Compass 3.1.1 (Bruker Daltonik, Германия).

5.11 Клонирование генов *patZ* и *cobB*

На первом этапе получали фрагмент ДНК, соответствующий гену *patZ*, с использованием праймеров P11 и P12. Праймер P11 гомологичен 3'-концу гена и содержит сайт узнавания рестриктазы *Bam*HI. Праймер P12 гомологичен 5'-концу гена и содержит сайт узнавания рестриктазы *Nco*I для дальнейшего клонирования в плазмиду. Аналогичным образом был получен фрагмент, соответствующий гену *cobB*, с помощью праймеров P13 и P14. Целевые фрагменты обрабатывали рестриктазами *Bam*HI и *Nco*I и клонировали в составе вектора pET22/*Bam*HI-*Nco*I, последовательность генов подтверждали секвенированием. Штамм *E. coli* BL21

(DE3) был трансформирован полученными плазмидами с последующим отбором трансформантов на среде LB с ампициллином.

5.12 Очистка ферментов CobB и PatZ

Клетки штаммов *E. coli* BL21(DE3)[pET22-cobB] и BL21(DE3)[pET22-patZ], содержащие ген РНК полимеразы фага T7 под контролем промотора P_{lacUV5} в хромосоме, а гены исследуемых ферментов под контролем промотора, узнаваемого РНК полимеразой T7, в составе рекомбинантных плазмид, выращивали в колбах (200 мл) в среде LB с добавлением Ar до $OP_{600} = 1$. Синтез целевых белков индуцировали добавлением 1мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и продолжали культивирование в течение 3 ч. Далее для очистки ферментов выращенные клетки BL21(DE3)[pET22-cobB] и BL21(DE3)[pET22-patZ] осаждали центрифугированием, промывали 10 мл физиологического раствора NaCl, ресуспендировали в буфере А (20 мМ фосфат натрия pH 7,0; 1 мМ ДТТ; 1мМ ЭДТА) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Клеточные обломки и остатки неразрушенных клеток удаляли центрифугированием. Из полученного супернатанта выделяли целевые белки с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке HisTrap HP согласно рекомендациям производителя («GE Healthcare», Великобритания).

5.13 Ацетилирование ϵ -аминогрупп остатков лизина в целевых белках *in vitro*

Реакцию ацетилирования проводили *in vitro*. В качестве субстрата использовали III белковую фракцию ГАФД и 50 нг очищенного фермента PatZ. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение различных промежутков времени и анализировали ферментативную активность ГАФД.

5.14 Деацетилирование ϵ -аминогрупп остатков лизина в целевых белках *in vitro*

Реакцию проводили *in vitro*. В качестве субстрата использовали III белковую фракцию ГАФД в отсутствие или в присутствии 50 нг очищенного фермента CobV и 2 мМ НАД⁺. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 1 ч и затем измеряли ферментативную активность ГАФД.

Реализацию процессов ацетилирования/деацетилирования целевого белка контролировали электрофорезом в полиакриламидном геле в нативных условиях.

5.15 Построение 3D-структур белков с аминокислотными заменами

В качестве основы для моделирования была взята трехмерная структура ГАФД 1S7C. Сервером I-TASSER были предсказаны мономерные субъединицы белков с аминокислотными заменами. Выравнивание, уточнение и визуализация трехмерных структур осуществлялись с помощью PyMOL v.2.5.0.

Для описания введенных посттрансляционных модификаций было выбрано силовое поле Charmm 36M дополнительной параметризацией.

5.16 Молекулярный докинг

Расчеты стыковки проводились с использованием DockingServer. Силовое поле MMFF94 использовали для минимизации энергии молекулы лиганда (DL-глицеральдегид-3-фосфат) с помощью DockingServer. Исходное положение, ориентация и вращение молекул лиганда задавались случайным образом. Каждый эксперимент по стыковке был получен из 100 различных запусков, которые должны были завершиться после максимум 250 000 оценок энергии. Размер популяции был установлен равным 150. Во время поиска применялись поступательный шаг 0,2 Å, кватернионный и торсионный шаги 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА VI. ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАТИВНОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ L-ТРЕОНИНА ШТАММОМ-ПРОДУЦЕНТОМ *ESCHERICHIA COLI*

Основной задачей при создании штаммов-продуцентов аминокислот, как и других экономически ценных продуктов, является оптимизация метаболического потока по целевому направлению. А именно, усиление транспорта источника углерода, предотвращение синтеза побочных продуктов и усиление экспорта целевой аминокислоты из клетки.

Не секрет, что уровень продукции коммерчески успешных штаммов-продуцентов аминокислот способен приближаться к теоретически возможному выходу. Для поиска новых способов повышения эффективности таких штаммов-продуцентов необходимо искать новые универсальные подходы, способные регулировать пути метаболизма, повышая выход целевого продукта.

Один из таких новых подходов – использование посттрансляционных модификаций, в частности ацетилирования. Как и все существующие посттрансляционные модификации, ацетилирование воздействует на уже синтезированные белки, моделируя и расширяя их функции. Диапазон клеточных процессов, регулируемых таким образом очень широк и включает в себя межбелковые взаимодействия, фолдинг, локализацию белков и их активность.

Vi J. с соавторами обнаружили, что ацетилирование лизина играет важную роль в модуляции центрального углеродного метаболизма у *Mycobacterium tuberculosis* (Vi J. et al., 2017). Мутант *M. tuberculosis*, с делецией гена *cobB*, демонстрировал улучшенный рост. В *E. coli* процессы ацетилирования начали изучать достаточно недавно, в основном это связано с проблемой антибиотикорезистентности поэтому тема данного исследования является очень актуальной. Представляет интерес изучение влияния процессов ацетилирования на метаболизм и продуктивность штаммов-продуцентов аминокислот.

У бактерий, как и у других организмов, ацетилирование реализуется по двум механизмам: ферментативному (в этом случае перенос ацетильной группы с молекулы ацетилкоэнзима А осуществляется под действием ацетилтрансферазы PatZ) и неферментативному (ацетильная группа с молекулы ацетилфосфата переносится на аминокислотный остаток лизина без участия ферментов).

В качестве модельного штамма был выбран штамм-продуцент аминокислоты L-треонина. L-треонин – незаменимая аминокислота, широко используемая в сельском хозяйстве, фармацевтической и пищевой промышленности. L-треонин на протяжении уже многих лет производится путем микробного синтеза с использованием глюкозы или сахарозы в качестве субстратов.

Залог высокой эффективности штамма-продуцента – способность производить целевой продукт, используя источник углерода с высокой конверсией. Намного лучше, если штамм способен использовать разные источники углерода, не теряя своей эффективности, ведь себестоимость целевого продукта, получаемого с помощью микробного синтеза, в большой степени определяется стоимостью основного субстрата — источника углерода. Создание универсальных по потреблению источников углерода штаммов-продуцентов позволит производить целевой продукт, независимо от постоянного изменения цен на углеродные субстраты и невзирая на их локальную доступность.

E. coli может использовать множество различных источников углерода. Каждый сахарный субстрат имеет уникальную систему, предназначенную для доставки его в клетку (через специальные транспортеры), ферменты для преобразования сахара в энергию и биомассу (метаболические ферменты) и регуляторные белки, которые контролируют время экспрессии этих белков (факторы транскрипции). Наиболее изученными и понятными являются гексозные и пентозные сахара.

В качестве углеродных субстратов нами были выбраны несколько сахаров, имеющих различные химические структуры: глюкоза (гексоза), которая

метаболизируется преимущественно по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, ксилоза (пентоза), которая метаболизируется по неокислительному пентозофосфатному пути, и сахароза (дисахарид), которая в первую очередь расщепляется на глюкозу и фруктозу.

Предпочтительным источником углерода для *E. coli*, как и для многих других бактерий, является глюкоза, обеспечивающая более высокую скорость роста по сравнению с другими сахарами. Различная скорость роста штамма на различных субстратах может стать причиной разных уровней ацетилирования аминокислотных остатков лизина в белках.

Для изучения влияния ферментативного ацетилирования на продукцию треонина в выбранный модельный штамм-производитель была введена плаزمид, несущая ген, кодирующий ацетилтрансферазу PatZ, под регуляцией промотора фага T5, который узнается полимеразой *E. coli*. Для индукции синтеза фермента ацетилтрансферазы на начальном этапе ферментации к культивируемым штаммам в ферментационную среду были добавлены лактоза и галактоза до конечных концентраций 10 мМ. В отличие от ИПТГ (Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид), лактоза и галактоза способны утилизироваться клетками. Поэтому индуцированный ими синтез ацетилтрансферазы будет прекращен после полной утилизации добавленных индукторов и будет осуществлен в самый оптимальный для ацетилирования период ферментации. В качестве дополнительного контроля лактоза, и галактоза были добавлены и в культуральную среду контрольного штамма.

Накопление треонина в культуральной среде у штаммов-производителей оценивали в результате пробирочной ферментации на средах с различными источниками углерода в течение 72 ч методом капиллярного электрофореза. Анализ и сравнение уровня продукции треонина и оптической плотности всех штаммов на ферментационных средах с различными источниками углерода представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты ферментаций штаммов-продуцентов треонина на средах с различными источниками углерода. Представлены усредненные результаты 2 независимых экспериментов.

	OD ₆₀₀	Треонин, г/л	Продуктивность, г/л/ОП ₆₀₀
Среда с глюкозой			
THR	5,3 ± 0,2	13,6 ± 0,6	2,6
THR-patZ	5,7 ± 0,1	15,8 ± 0,9	2,8
Среда с ксилозой			
THR	7,0 ± 0,1	12,7 ± 0,2	1,8
THR-patZ	6,7 ± 0,2	16,3 ± 0,2	2,4
Среда с сахарозой			
THR	2,8 ± 0,2	5,3 ± 0,7	1,9
THR-patZ	3,0 ± 0,2	7,3 ± 0,4	2,4

Из полученных результатов можно сделать вывод, что усиление процесса ферментативного ацетилирования на начальном этапе ферментации положительно влияет на выход треонина: при одинаковой оптической плотности (в пределах погрешности измерения) обоих штаммов, в штамме с усиленным геном *patZ*, кодирующим ацетилтрансферазу, наблюдается увеличение синтеза целевой аминокислоты. В результате ферментационного процесса на среде с глюкозой продуктивности штамма увеличивается на 8% по сравнению с продуктивностью исходного штамма, а при использовании в качестве источника углерода ксилозы и сахарозы на 33% и 26% соответственно.

ГЛАВА VII. ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ L-ТРЕОНИНА ШТАММОМ-ПРОДУЦЕНТОМ *ESCHERICHIA COLI*

В природе лишь немногие бактерии способны естественным образом усваивать ацетат, среди них *Escherichia coli*, микроорганизм с преимуществами быстрого роста на дешевых средах и простыми протоколами для генетического редактирования. Данная бактерия на протяжении долго времени широко используется для получения различных ценных химических веществ (Baneux, 1999; Sharma et al., 2011; Huang et al., 2012). Тем не менее, проблема образования ацетата в культурах *E. coli*, выращенных в аэробных условиях, до сих пор остается актуальной, поскольку он ингибирует рост клеток и синтез целевых продуктов (Jensen, Carlsen, 1990; El-Mansi, 2004), а также вызывает стрессовые реакции в клетках даже при низкой концентрации (Nakano et al., 1997). Более того, образование этого химического соединения представляет собой нецелевую конверсию источника углерода (March et al., 2002). Для уменьшения образования ацетата обычно применяются различные стратегии, такие, как генно-инженерные подходы к изменению самих штаммов (Chou et al., 1994; Aristidou et al., 1999; San et al., 1994) и изменение условий их культивирования (Akesson et al., 2001; Johnston et al., 2003; Kleman et al., 1991; Riesenber, Guthke, 1999). Однако о способе регулирования метаболизма ацетата в клетках *E. coli* с помощью процессов ацетиляции до сих пор очень мало сведений.

Клеточный метаболизм ацетата и ацетиляция белков тесно связаны. Ацетиляция представляет собой обратимую посттрансляционную модификацию, которая часто встречается в прокариотических клетках.

В основном ацетиляции подвержены ферменты метаболических путей, что, в свою очередь, влияет на их функцию, обеспечивая глобальную регуляцию всего метаболизма. Эта реакция модификации обратима благодаря действию деацетилаз; самой изученной деацетилазой *E. coli* является CobB (Castaño-Cerezo et al., 2014; Castaño-Cerezo et al., 2011; Zhao et al., 2004; Starai et al., 2002). Из

литературных данных известно, что CobV требует НАД⁺ в качестве кофактора, а ее субстратная специфичность довольно низкая. Активность CobV носит глобальный регуляторный характер, способствуя деацетилированию большого количества модифицированных аминокислотных остатков лизина в белках независимо от механизма, по которому они были ацетилированы (AbouElfetouh et al., 2015).

Как уже упоминалось, серьезной проблемой при промышленном культивировании штаммов *E. coli*, в том числе продуцентов аминокислот, является образование ими на средах с глюкозой значительного количества ацетата, который снижает конверсию моносахарида в целевой продукт и угнетает рост клеток (Cheng et al., 2012). Синтез клетками ацетата, на который расходуется до 15% глюкозы, может негативно влиять на ферментативную активность ключевых ферментов центрального метаболизма в результате ацетилирования в них аминокислотных остатков лизина. В 2010 году было обнаружено, что накопление ацетата является результатом катаболитной репрессии ацетил-СоА-синтетазы, кодируемой геном *acs*, которая происходит в условиях быстрого роста и, соответственно, быстрого потребления глюкозы (Valgerea et al., 2010). А уже в 2011 году Castaño-Cerezo с коллегами выяснили, что ацетил-КоА-синтетаза, которая катализирует реакцию превращения ацетата в ацетил-КоА, инактивируется ацетилированием (Castaño-Cerezo et al., 2011).

Весь процесс использования ацетата для производства биохимических веществ можно разделить на три этапа: транспорт ацетата (из внешней среды во внутриклеточное пространство), ассимиляция ацетата (от ацетата до ацетил-КоА) и образование химических веществ (из ацетил-КоА в целевой продукт). Использование же внутриклеточного ацетата в качестве дополнительного источника углерода требует адаптации клеточного метаболизма, а в случае его высоких концентраций – перестройки метаболизма. Согласно литературным данным, рост штамма *E. coli* дикого типа ингибируется в присутствии 128 мМ ацетата в культуральной среде (Pinhal et al., 2019). Создать штаммы с устойчивостью к высоким концентрациям ацетата, а точнее, способные использовать накопленный ацетат в качестве дополнительного источника

углерода, можно методами генной инженерии, лабораторной адаптивной эволюции (ЛАЭ), а также при помощи мутагенеза. В данной работе были выбраны два последних метода, поскольку основной задачей было получение определенного фенотипа штаммов для изучения влияния процесса деацетилирования на клеточный метаболизм. Возникшие адаптивные мутации, нацеленные на регуляторные механизмы, будут изучены отдельно.

При проведении ЛАЭ или мутагенеза появляется возможность отобрать штаммы с улучшенными характеристиками, приняв за основу тот факт, что скорость роста на высоких концентрациях ацетата (выше ингибирующей концентрации) прямо связана с успешной его ассимиляцией клетками.

7.1 Получение штаммов, характеризующихся ускоренным ростом на высоких концентрациях ацетата методом УФ-мутагенеза

УФ-мутагенез традиционно используется в лабораторной практике как наиболее доступный способ улучшения свойств штаммов-продуцентов. УФ-облучение, которое проводят при длинах волн в диапазоне 200–300 нм (оптимально при 254 нм), вызывает транспозиции, трансверсии, сдвиги рамки считывания и делеции участков ДНК. Хотя УФ-лучи не обладают сильной проникающей способностью, на практике УФ-мутагенез позволяет получить штаммы с улучшенными характеристиками (Pathak et al., 2015).

На первом этапе данного исследования проводили УФ-облучение исходного штамма THR, ранее не подвергавшегося мутагенезу. Обработка суспензии клеток возрастающими дозами этого мутагена была достаточно эффективна и обеспечила рост клеток на высоких концентрациях ацетата в среде при облучении в течение 1–3 мин. Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

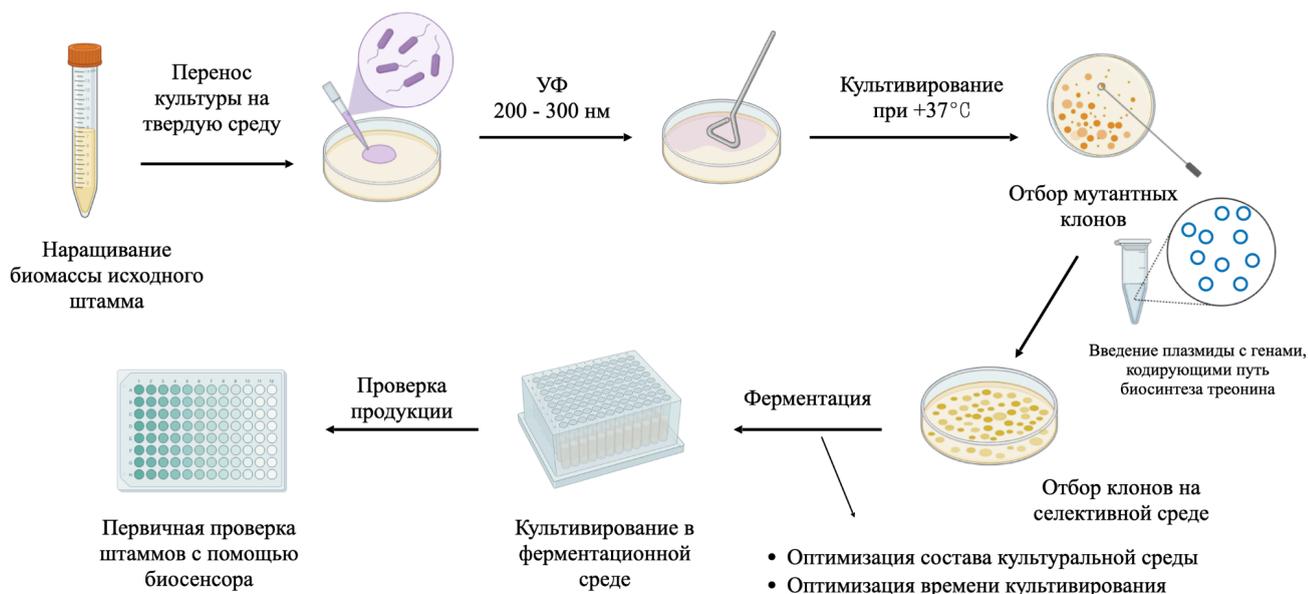


Рисунок 1. УФ-мутагенез. Схема эксперимента (Плеханова и др, 2024 б).

7.2 Получение штаммов, характеризующихся ускоренным ростом на высоких концентрациях ацетата методом ЛАЭ

ЛАЭ - метод, основанный на способности микроорганизмов быстро приспосабливаться к новым условиям внешней среды. Этот метод достаточно часто применяется для исследования молекулярных основ и динамики эволюции бактериальных культур, а также для направленного изменения метаболизма микроорганизмов (Rosenzweig et al., 1994; Helling et al., 1987; Horinouchi et al., 2010; Conrad et al., 2011).

Для селекции клеток, эффективно утилизирующих ацетат, в качестве исходного использовали штамм THR. Культуру, выращенную в пробирках в жидкой среде, поддерживали в стадии экспоненциального роста ежедневным пересевом на свежую минимальную среду с ацетатом в качестве единственного источника углерода. Каждые 72 ч культивирования концентрацию ацетата повышали, а клетки высевали на агаризованную среду с ацетатом для получения индивидуальных клонов и последующей оценки скорости их роста и продукции аминокислоты. Схема эксперимента представлена на рисунке 2.

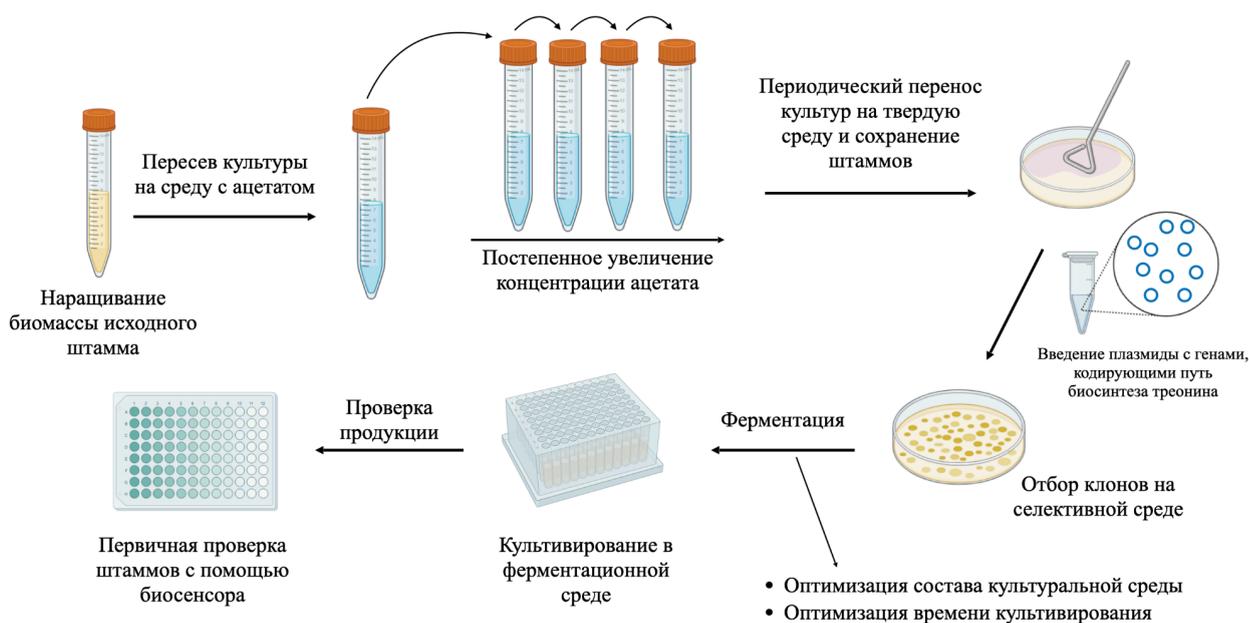


Рисунок 2. Адаптивная Лабораторная Эволюция. Схема эксперимента (Плеханова и др, 2024 б).

В результате, с помощью ЛАЭ и УФ-мутагенеза были получены штаммы, способные расти при высоких концентрациях (168 мМ) ацетата в качестве единственного источника углерода.

7.3 Первичная проверка уровня синтеза целевого продукта в полученных штаммах-продуцентах

Продуктивность полученных индивидуальных клонов штаммов THR была проанализирована в результате ферментации в глубоколоночном планшете на ферментационных средах, содержащих глюкозу в качестве основного источника углерода, а также ацетат в качестве дополнительного источника углерода в соотношении 3:1 соответственно.

Первичный анализ продукции треонина проводили с помощью специально созданной тест-культуры. Поскольку штамм SENS-THR несет делецию генов пути

биосинтеза аминокислоты треонин, а именно делецию треонинового оперона (*thrABC*), такой штамм является ауксотрофом по этой аминокислоте и не способен расти на минимальной среде без добавления треонина. Рост данного штамма на минимальной среде с добавлением аликвот культуральной ферментационной среды штаммов-продуцентов THR будет прямо пропорционален накоплению треонина в результате ферментации. Для лучшей визуализации первичного скрининга в штамм SENS-THR была введена многокопийная плаزمиды pSENS, несущая ген *gfp*, кодирующий зеленый флуорисцентный белок под регуляцией конститутивного промотора T5. Таким образом, представлялось возможным отобрать самые эффективные клоны, не прибегая к дорогостоящим и трудозатратным способам определения концентрации аминокислоты методами аналитической химии. Была построена калибровочная кривая для разных концентраций треонина, растворенного в ферментационной среде.

В результате УФ-мутагенеза был отобран модифицированный штамм-продуцент треонина ТМ-29; в результате ЛАЭ – штаммы ТА-72 и ТА-81. При предварительной оценке накопления треонина с помощью тест-культуры pSENS данные штаммы превосходили контрольный штамм (THR) по оптической плотности THR-SENS (данные не представлены). Для дополнительной проверки полученного результата была проведена пробирочная ферментация на среде, содержащей глюкозу в качестве основного источника углерода и ацетат в качестве дополнительного источника углерода в соотношении 3:1 соответственно. Накопление аминокислоты треонина у выбранных мутантных штаммах определяли методом капиллярного электрофореза. Результаты представлены на рисунке 3.

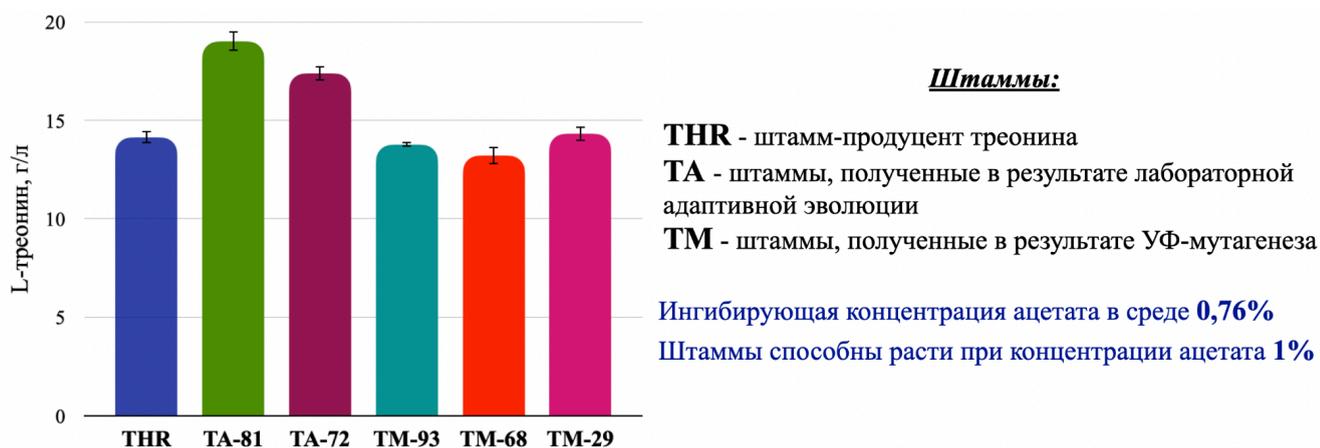


Рисунок 3. Оценка накопления треонина в культуральной среде глюкоза:ацетат = 3:1

Согласно представленным результатам, метод ЛАЭ является наиболее подходящим для получения ацетат-устойчивых штаммов без потери их продуктивности.

7.4 Идентификация мутаций, полученных в ходе адаптивной эволюции к высоким концентрациям ацетата

Для идентификации полученных мутаций, приводящих к устойчивости к высоким концентрациям ацетата, и для установления их локализации штаммы ТА-81 и ТА-72 были использованы в качестве донорного штамма при получении препарата фага P1 *vir*. Селекцию проводили на минимальной среде с ацетатом (168 мМ) в качестве единственного источника углерода. Получить клоны реципиентного штамма, способные расти в таких условиях, не удалось, что свидетельствует о том, что возникшие изменения генома штаммов ТА-81, и ТА-72 связаны с мутациями в нескольких генах, кодирующих ферменты, участвующие в разных путях ассимиляции ацетата. Идентифицировать подобные изменения возможно только с помощью полногеномного секвенирования штамма, что будет сделано позднее.

Усиление уровня экспрессии гена *cobB*

На следующем этапе в штаммы THR и TA-81 была введена плазмида pCOB, несущая ген *cobB*, кодирующий единственную описанную у *E. coli* деацетилазу. Целевой ген находится под регуляцией индуцибельного промотора T5. Накопление треонина в культуральной среде отобранных клонов с плазмидой оценивали в ходе пробирочной ферментации на средах с различными источниками углерода в течение 72 ч. Для индукции синтеза фермента деацетилазы через 48 ч к культивируемым штаммам в ферментационную среду были добавлены лактоза и галактоза до конечных концентраций 10 мМ. Лактоза и галактоза способны утилизироваться клетками. Поэтому индуцированный ими синтез деацетилазы будет прекращен после полной утилизации добавленного индуктора и будет осуществлен в самый оптимальный для деацетилирования период ферментации. Иными словами, удаление ацетильных групп с аминокислотных остатков лизина в белках инициируется только после того, как клетки штамма-производителя начнут накапливать ацетат и запустится процесс неферментативного ацетилирования. В качестве контроля и лактоза, и галактоза были добавлены и в культуральную среду штаммов THR и TA-81, не несущих плазмиду pCOB. В этом случае оптическая плотность и уровень продукции треонина сохранялись на том же уровне, что и в контрольных штаммах THR и TA-81 без добавления лактозы и галактозы (данные не представлены).

В качестве углеродных субстратов нами были выбраны несколько сахаров, имеющих различные химические структуры: глюкоза (гексоза), которая метаболизируется преимущественно по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, ксилоза (пентоза), которая метаболизируется по неокислительному пентозофосфатному пути, и сахароза (дисахарид), которая в первую очередь должна расщепиться на глюкозу и фруктозу.

Как и в предыдущем эксперименте в качестве источников углерода были выбраны глюкоза, ксилоза и сахароза. Также в качестве альтернативного источника углерода был выбран этанол, который способен напрямую

преобразоваться в ацетил-КоА. Схемы метаболизма выбранных источников углерода представлены на рисунке 4.

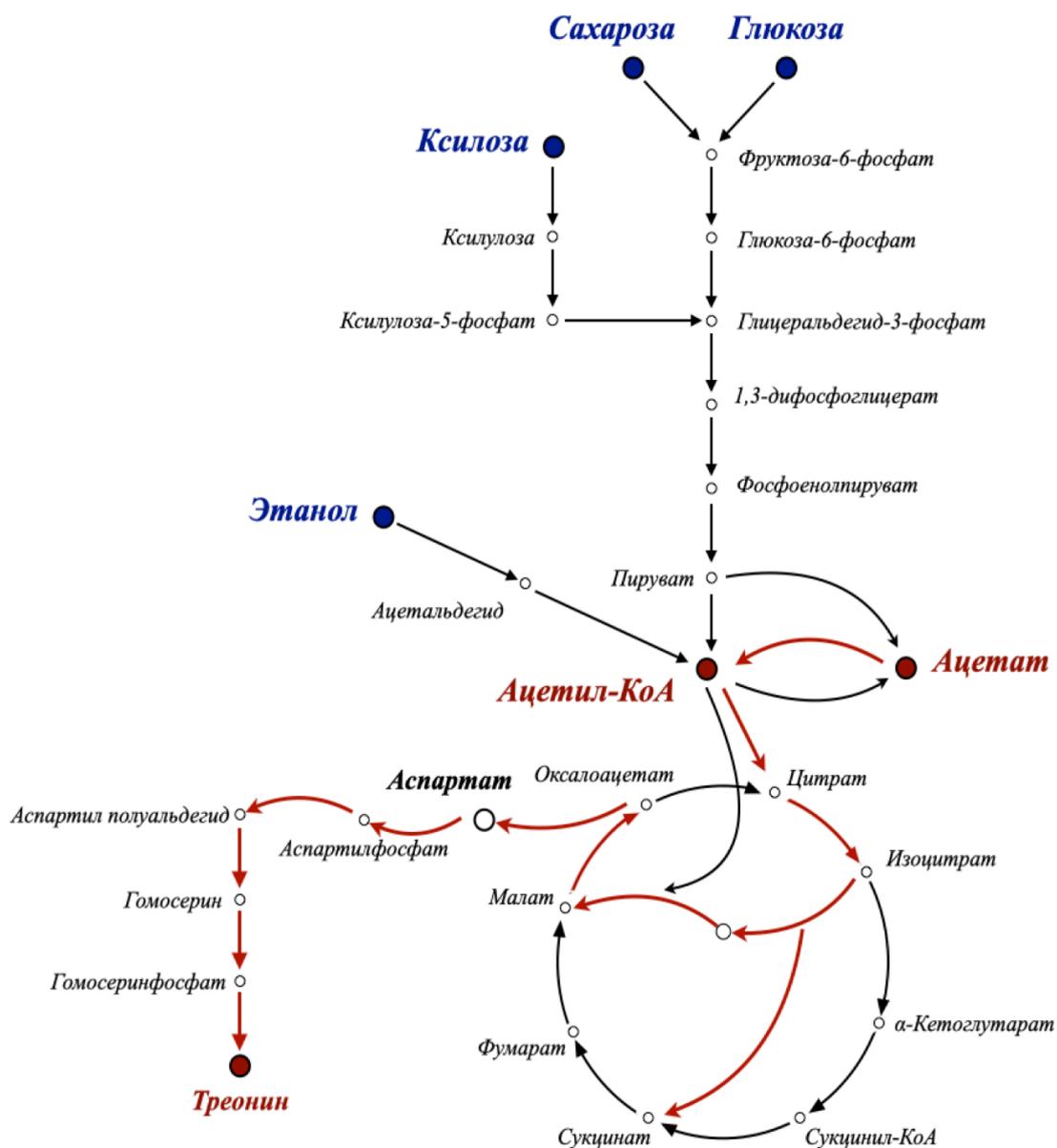


Рисунок 4. Путь биосинтеза L-треонина и схема метаболизма ацетата клетками (выделена красным цветом) *Escherichia coli* (Плеханова и др, 2024 б).

Анализ и сравнение уровня продукции треонина и оптической плотности всех штаммов на ферментационных средах с различными источниками углерода представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты ферментаций штаммов-продуцентов треонина на средах с различными источниками углерода. Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Штамм	ОП ₆₀₀	Треонин, г/л	Продуктивность, г/л/ОП ₆₀₀
Ферментационная среда с глюкозой			
THR	7,0 ± 0,2	13,7 ± 0,2	2,0
THR-CobB	6,3 ± 0,1	14,4 ± 0,1	2,3
TA-81	6,5 ± 0,1	15,7 ± 0,5	2,4
TA-81-CobB	6,0 ± 0,1	18,8 ± 0,5	3,1
Ферментационная среда с ксилозой			
THR	6,9 ± 0,1	11,7 ± 0,5	1,7
THR-CobB	7,0 ± 0,1	12,0 ± 0,5	1,7
TA-81	6,9 ± 0,1	13,3 ± 0,2	1,9
TA-81-CobB	6,1 ± 0,1	15,0 ± 0,2	2,4
Ферментационная среда с сахарозой			
THR	1,9 ± 0,1	5,4 ± 0,1	2,8
THR-CobB	2,1 ± 0,1	6,7 ± 0,3	3,2
TA-81	2,2 ± 0,1	5,8 ± 0,3	2,7
TA-81-CobB	2,2 ± 0,2	7,0 ± 0,1	3,1
Ферментационная среда с этанолом			
THR	1,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,3
THR-CobB	1,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,4
TA-81	1,8 ± 0,1	0,5 ± 0,4	0,3
TA-81-CobB	1,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,5

Увеличение уровня экспрессии гена *cobB* приводит к удалению ацетильных групп с аминокислотных остатков лизина в белках. На сегодняшний день мало данных, показывающих, на активность каких ферментов и как именно влияет ацетилирование аминокислотных остатков лизина у *E. coli*. В результате деацетилирования свободные молекулы ацетата могут быть возвращены в клеточный метаболизм. Как следует из данных в таблице 5, штаммы, адаптированные к высоким концентрациям ацетата, демонстрируют более

высокий уровень продукции треонина по сравнению с исходным штаммом при проведении ферментационного процесса на всех углеродных субстратах.

На ферментационных средах с глюкозой +15% для исходного штамма-продуцента треонина и +29% для ТА-81. На ферментационных средах с сахарозой +14% и +15% соответственно. В случае роста на ксилوزه положительный эффект от усиления деацетилазы наблюдался только для штамма ТА-81 (+26%). Известно, что при росте на ксилوزه клетки *E. coli* накапливают больше ацетата, что, в свою очередь, может повышать степень неферментативного ацетилирования и приводить к ингибированию ферментов. Таким образом, нами впервые показано, что усиление процесса деацетилирования позволяет добиться повышения продукции треонина в штамме-продуценте *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода.

ГЛАВА VIII. ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССАХ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА КЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И ПРОДУКЦИЮ АМИНОКИСЛОТ

8.1 Оценка скорости роста штаммов *Escherichia coli* с делетированными генами *cobB*, *patZ* и *ackA*

Еще одним способом оценки влияния ферментов, участвующих в процессах ацетилирования – это делеция кодирующих их генов. Делеция генов (gene knockout) представляет собой эффективный и надежный метод для изучения метаболизма. Данный метод предполагает внесение делеций в хромосому и удаление определенного гена или генов, ответственных за конкретные метаболические пути, что делает исследование более точным и специализированным. Метод делеции генов широко используется в исследованиях *E. coli* и он хорошо адаптирован для данного микроорганизма (Tong et al., 2023).

Скорость роста любого штамма-продуцента, как и оптимальный уровень усвоения им источника углерода, является важным показателем эффективности штамма-продуцента. Для определения влияния инактивации генов на кинетику роста штаммов были исследованы зависимости оптической плотности от времени культивирования. На рисунке 5 представлена зависимость оптической плотности от времени роста для штаммов дикого типа и для штаммов с инактивированными генами *cobB*, *patZ* и *ackA*.

Также были оценены зависимости оптической плотности от времени для культивирования штаммов-продуцентов L-пролина, представленные на рисунках 6А и L-треонина, представленные на рисунках 7А.

Оценивая особенности роста штаммов с делециями генов *cobB*, *patZ* и *ackA*, можно сделать следующие выводы:

- все штаммы имеют увеличенный во времени период лаг-фазы, по сравнению с исходным штаммом MG1655;

- все штаммы демонстрировали замедление скоростью роста, по сравнению с исходным штаммом MG1655;
- ни один из модифицированных штаммов не способен достичь показателей оптической плотности исходного штамма в стационарной фазе.

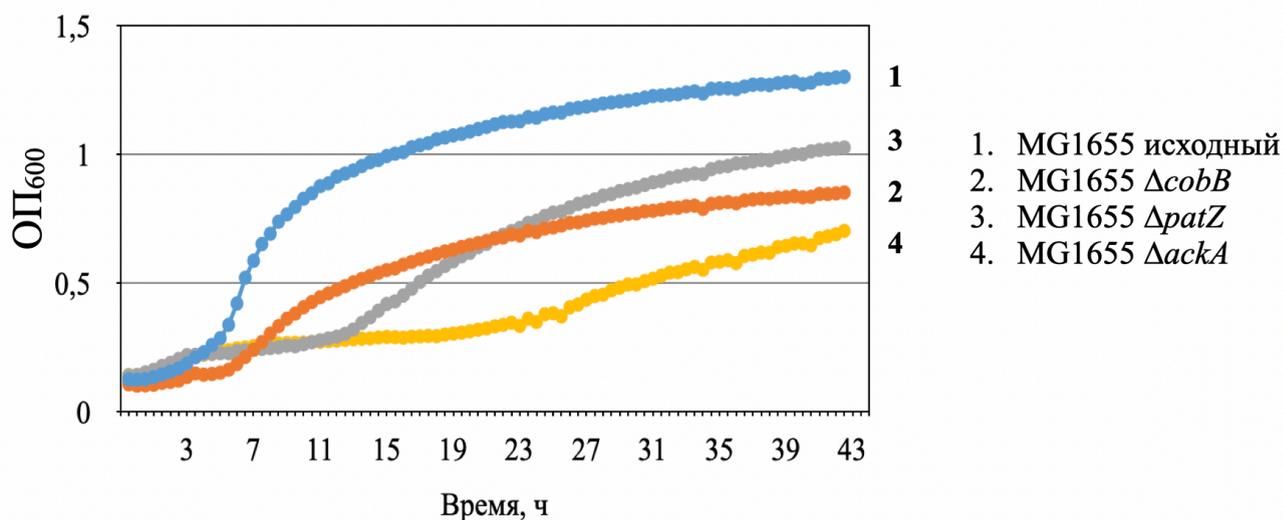


Рисунок 5. Рост штаммов *E. coli* на минимальной среде М9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода.

8.2 Оценка накопления L-аминокислот в культуральной среде

Определение уровня накопления аминокислот штаммами-продуцентами для оценки влияния генетических изменений на метаболизм позволяет анализировать эффект введенных генетических модификаций. В нашем исследовании были использованы штаммы продуценты L-аминокислот разных семейств, а именно, треонин из семейства аспартата и пролин из семейства глутамата. Данные аминокислоты имеют разные независимые друг от друга пути биосинтеза.

В штаммах-продуцентах пролина и треонина были инактивированы гены *cobB*, *patZ* и *ackA*, кодирующие деацетилазу, ацетилтрансферазу и ацетат киназу, соответственно. Полученные штаммы культивировали в ферментационных средах с добавлением глюкозы в качестве единственного источника углерода. Сахар,

первоначально добавленный в среду, был полностью израсходован за время культивирования во всех образцах, кроме образцов со штаммом без деацетилазы ($\Delta cobB$). Для сравнения штаммов между собой ввиду различия скорости роста, утилизации источника углерода, и конечной оптической плотности культуры, была рассчитана продуктивность штаммов-продуцентов, представленная на рисунках 7Б и 8Б.

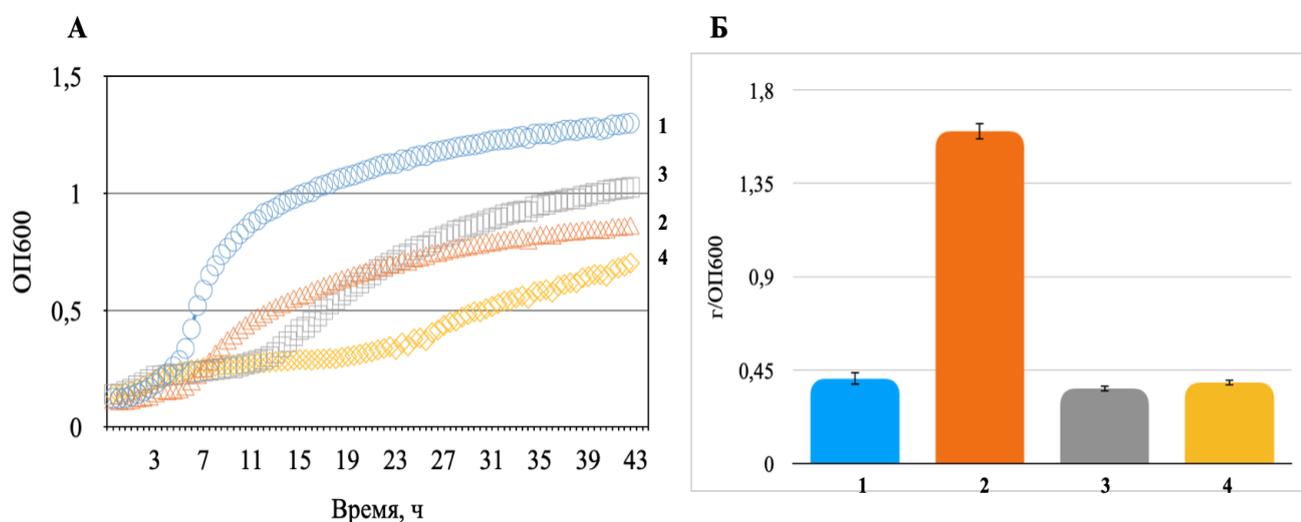


Рисунок 6. Рост и продуктивность штаммов-продуцентов L-пролина на минимальной среде М9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода.

А. Рост штаммов: PRO, исходный (1), PRO $\Delta cobB$ (2), PRO $\Delta patZ$ (3) и PRO $\Delta askA$ (4) Б. Продуктивность штаммов (обозначения те же). Стандартные отклонения от средних значений указаны в виде планок погрешностей (Плеханова и др, 2024 а).

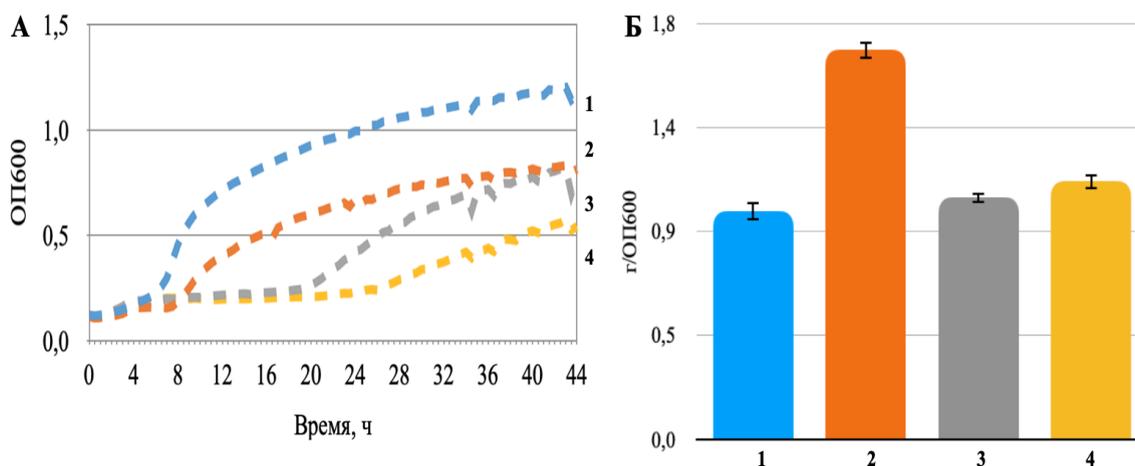


Рисунок 7. Рост и продуктивность штаммов-продуцентов L-треонина на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода.

А. Рост штаммов: THR исходный (1), THR $\Delta cobB$ (2), THR $\Delta patZ$ (3) и THR $\Delta ackA$ (4) на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода. Б. Продуктивность штаммов (обозначения те же). Стандартные отклонения от средних значений указаны в виде планок погрешностей (Плеханова и др, 2024 а).

Как следует из рисунков 6 и 7, штаммы-продуценты пролина и треонина с инактивированным геном *cobB* продемонстрировали замедленный рост и усвоение глюкозы, но вместе с тем повышенную продуктивность. Очевидно, что это может быть связано с нарушением процесса деацетилирования. Здесь интересно отметить, что НАД⁺ является одновременно кофактором и фермента ГАФД, и субстратом лизиндеацетилазы лизина CobB. Эта конкуренция за НАД⁺ особенно важна для статуса ацетилирования остатков лизина, которые совместно регулируются ацетилфосфатом и CobB (Castaño-Cerezo et al., 2014; Kuhn et al., 2014; AbouElfetouh et al., 2015).

ГЛАВА IX. ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО N_E-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ *ESCHERICHIA COLI*

Ацетилирование аминокислотных остатков лизина – универсальный регуляторный механизм, оказывающий влияние на все клеточные процессы. Идентификация широкого ряда ацетилированных метаболических ферментов как у человека и растений (Xia et al., 2022), так и у прокариот (Okanishi et al., 2013), а также анализ литературных данных о различных метаболических регуляторных ролях этой модификации (Smith et al., 2022) указывают на то, что обратимое ацетилирование аминокислотного остатка лизина может представлять собой эволюционно консервативный механизм метаболической регуляции как у эукариот, так и у прокариот (Ketema, Lopaschuk, 2021).

Из опубликованных литературных данных известно, что ацетилирование аминокислотных остатков лизина глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАФД) по-разному влияет на ее активность у эукариот в зависимости от типа и состояния клеток. Например, в эмбриональных клетках почек человека (HEK293T) ацетилирование ГАФД по остатку лизина 254 повышает ее ферментативную активность в ответ на глюкозу (Li et al., 2014). В клетках фибробластов мыши (NIH3T3) ацетилирование ГАФД усиливает ее транслокацию из цитоплазмы в ядро, тем самым ингибируя нисходящий гликолиз и накопление промежуточных продуктов гликолиза (Ventura et al., 2010). В растениях риса ацетилирование ГАФД снижает ее ферментативную активность, а также ее взаимодействие с другими гликолитическими ферментами (Zhang et al., 2017). Следовательно, ацетилирование аминокислотных остатков лизина ГАФД может модулировать ее функцию и по-разному влиять на гликолиз в различных организмах в разных условиях. Однако влияние ацетилирования лизиновых остатков ГАФД у *E. coli* до сих пор детально не изучено. Изменения активности этого фермента может перераспределять метаболические потоки в

штаммах-продуцентах как показано в предыдущих экспериментах. Поэтому исследование данной проблемы представляется актуальным.

Нами была продемонстрирована возможность изменения кофакторной специфичности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *E. coli* и получен набор ферментов с двойной кофакторной специфичностью, характеризующихся различной степенью сродства к НАД⁺/НАДФ⁺, которые продемонстрировали положительное влияние на увеличение продукции аминокислот штаммами-продуцентами *E. coli*.

Описанные аминокислотные замены D34K и P189K способны вносить дополнительные сайты ацетилирования фермента, что, в свою очередь, может влиять на энзиматическую активность ГАФД.

9.1 Конструирование реципиентных штаммов для наработки мутантных форм белков ГАФД (с делецией гена *gapA*)

Рядом авторов было показано, что клетки *E. coli*, несущие делецию гена *gapA*, не способны к росту ни на богатой, ни на минимальной среде с глюкозой в качестве источника углерода (Vaba et al., 2006). Исходя из этого, конструирование целевого штамма осуществлялось в два этапа. На первом этапе в *ubhB*-локус MG1655 были введены гены *gapA*^{WT}, *gapA*^{D34K} и *gapA*^{D34AG188TP189K} с собственной регуляторной областью в качестве второй копии гена. Выбранный ген *ubhB* не является значимым для *E. coli*, то есть с делецией этого гена штаммы способны расти как на богатой среде LB, так и на минимальной – M9. И, как видно на рисунке 8, удаление данного гена не приводило к изменениям в ростовых характеристиках штамма. Описанные плазмиды (см. материалы и методы) были использованы в качестве матрицы для амплификации мутантных генов. После этого для инактивации природной копии *gapA* в полученные штаммы MG1655 $\Delta ubhB::gapA$ ^{WT}, MG1655 $\Delta ubhB::gapA$ ^{D34K} и MG1655 $\Delta ubhB::gapA$ ^{D34AG188TP189K} была интегрирована кассета $\Delta gapA$ ^{native}::kan с помощью системы Red-зависимой рекомбинации и отобраны канамицин-устойчивые клоны.

Полученные штаммы MG1655 $\Delta ybhB::gapA^{WT}\Delta gapA^{native}::kan$, MG1655 $\Delta ybhB::gapA^{D34K}\Delta gapA^{native}::kan$ и MG1655 $\Delta ybhB::gapA^{D34AG188TP189K}\Delta gapA^{native}::kan$ обладали способностью расти как на богатой среде LB, так и на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного углеродного субстрата. Однако, как видно на рисунке 8, наличие мутантных генов *gapA* в локусе *ybhB* в качестве единственной копии *gapA* не было способно полностью супрессировать делецию нативного гена *gapA*, тем самым восстанавливая скорость роста до уровня штамма дикого типа.

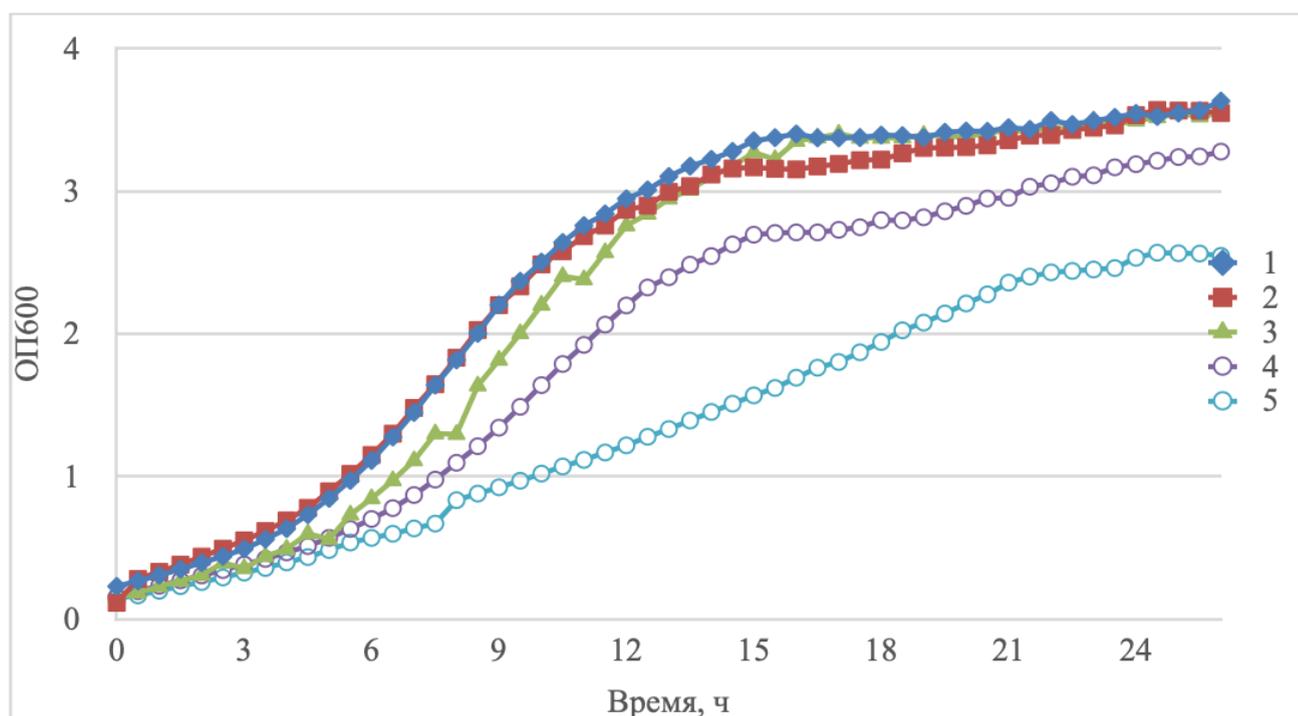


Рисунок 8. Рост штаммов на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода. Начальная оптическая плотность OP_{600} составляла 0,1. (Plekhanova et al., 2023).

- 1 – штамм MG1655;
- 2 – MG1655 $\Delta ybhB$;
- 3 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA^{WT}}\Delta gapA^{native}$;
- 4 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA^{D34K}}\Delta gapA^{native}$;
- 5 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA^{D34AG188TP189K}}\Delta gapA^{native}$

Как уже отмечалось выше, ацетилирование аминокислотных остатков лизина может происходить по двум механизмам: неферментативному и ферментативному, опосредованному ацетилтрансферазами. Единственным

известным ферментом-ацетилтрансферазой у *E. coli* является N-ацетилтрансфераза, кодируемая геном *patZ* (ранее *yfiQ*).

Независимо от того, по какому из двух механизмов происходит ацетилирование аминокислотного остатка лизина, сделать этот процесс обратимым способна деацетилаза CobV из сиртуинового семейства НАД⁺-зависимых деацетилаз, кодируемая геном *cobV*. CobV является гомологом эукариотических сиртуинов, регулирующих различные клеточные процессы, такие, как метаболизм, реакцию на стресс и старение.

9.2 Влияние процессов ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *in vitro*

Для проведения реакций ацетилирования и деацетилирования *in vitro*, ферменты ацетилтрансфераза PatZ и деацетилаза CobV, содержащие His-Taq последовательности, были очищены с помощью метало-афинной хелатной хроматографии (МАХ).

В реакционную смесь, содержащую ГАФД, добавляли фермент PatZ, после реакции PatZ удаляли, используя МАХ, Удаление белка PatZ из раствора контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Для проведения деацетилирования модифицированного ГАФД в реакционную смесь добавляли фермент CobV и после реакции проводили описанные выше процедуры. Удаление модифицирующих ГАФД ферментов PatZ и CobV из раствора контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, после чего во фракции свободного объема измеряли энзиматическую активность ГАФД. Результаты измерений приведены в таблице 6.

Таблица 6. НАД⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ubhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Белок	НАД ⁺ - специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	520,7 ± 0,75	912,4 ± 0,57	637,1 ± 0,66
ГАФД ^{D34K}	20 ± 0,65	13,7 ± 0,54	26,4 ± 1,2
ГАФД ^{D34AG188TP189K}	139 ± 0,80	224 ± 0,40	121 ± 0,60

In vitro обработка фермента ГАФД дикого типа ацетилтрансферазой PatZ приводила к двукратному увеличению ее ферментативной активности. При деацетилировании активность белка снижалась до уровня, близкого к исходному.

Наибольший интерес представляют показатели активности белков ГАФД^{D34AG188TP189K} и ГАФД^{D34K}, имеющих потенциальный дополнительный сайт ацетилирования. При ацетилировании мутантного фермента ГАФД^{D34AG188TP189K} активность, как и в случае белка дикого типа, увеличивалась (на 60%), а при деацетилировании снижалась. При этом достигнутое значение активности было несколько ниже, чем до ацетилирования, что может объясняться удалением не только дополнительной ацетильной группы, но и одной из ацетильных групп, исходно присутствовавших в белке дикого типа.

Как видно из полученных данных, обработка мутантного фермента ГАФД^{D34K} ацетилтрансферазой PatZ *in vitro* приводила, в отличие от белка дикого типа, к уменьшению удельной активности, а деацетилирование увеличивало активность белка до величины, незначительно превышающей исходное значение.

Поскольку мутантные ферменты ГАФД обладают двойной кофакторной специфичностью, нами также была проанализирована их удельная активность при использовании НАДФ⁺ в качестве кофактора. Результаты измерений представлены в таблице 7.

Таблица 7. НАДФ⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ubhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Белок	НАДФ ⁺ -специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	<0.01	<0.01	<0.01
ГАФД ^{D34K}	9 ± 0,45	18,2 ± 0,40	8,3 ± 0,25
ГАФД ^{D34AG188TP189K}	58,9 ± 0,36	56 ± 0,32	87,5 ± 0,44

Как мы видим из представленных таблиц, исследуемые белки демонстрировали различное сродство к кофакторам после ацетилирования.

Поскольку процесс *in vivo* ацетилирования белков в клетках может давать другие результаты по сравнению с условиями *in vitro*, нами была предложена схема анализа активности ГАФД в клетках при изменении уровней ацетилирования *in vivo*.

Для осуществления этого эксперимента была сконструирована плазида, несущая ген ацетилтрансферазы *E. coli patZ*, под регуляцию промотора фага T5, который узнается полимеразой *E. coli*, а копияность плазмиды аналогична копияности плазмиды, несущий ген, кодирующий ГАФД.

Таблица 8. НАДФ⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ubhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Белок	НАД ⁺ -специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	372,8 ± 3,80	813,0 ± 1,10	468,0 ± 2,00
ГАФД ^{D34K}	24,4 ± 1,46	15,5 ± 0,25	38,7 ± 0,65
ГАФД ^{D34AG188TP189K}	164 ± 3,00	218,0 ± 0,30	139,3 ± 1,30

Таблица 9. НАДФ⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ubhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Белок	НАДФ ⁺ -специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	<0.01	<0.01	<0.01
ГАФД ^{D34K}	10,9 ± 0,35	17,0 ± 0,15	10,0 ± 0,30
ГАФД ^{D34AG188TP189K}	66,0 ± 0,36	45,7 ± 2,00	53,9 ± 1,00

Как видно из таблиц 8 и 9, ферментативная активность ГАФД в результате ацетилирования изменялась таким же образом, как и в случае ацетилирования *in vitro*.

9.3 Идентификация ацетилированных аминокислотных остатков лизина в белках ГАФД

Для идентификации ацетилированных аминокислотных остатков лизина после *in vitro* и *in vivo* обработки целевых белков ГАФД ацетилтрансферазой PatZ был проведен масс-спектрометрический анализ.

Таблица 10. Идентифицированные аминокислотные остатки лизина в исследуемых формах белка ГАФД в результате ацетилирования *in vitro* и *in vivo*

ГАФД	Ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД										
ГАФД (WT)	N-	4		70	71	108	115	116	124		-C
ГАФД (D34K)		4	24	70	71	108	115	116	124		
ГАФД (D34AG188TP189K)		4		70	71	108	115	116	124	184	

В белке ГАФД дикого типа было идентифицировано 7 сайтов ацетилирования. В случае белков с аминокислотными заменами было обнаружено

еще два ацетилированных лизиновых остатка, в позиции 23 в белке $\text{GapA}^{\text{D34K}}$ и в позиции 184 в случае белка $\text{GapA}^{\text{D34AG188TP189K}}$.

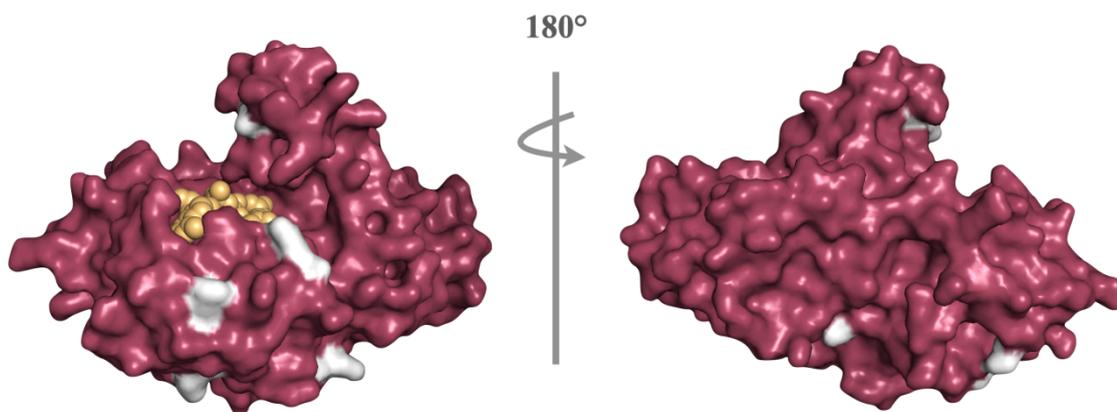


Рисунок 9. Распределение ацетилированных аминокислотных остатков лизина по белковой поверхности ГАФД (PDB 1S7C). Серым цветом выделены ацетилированные аминокислотные остатки лизина на поверхности белка ГАФД (Plekhanova et al., 2023).

Для глубокого понимания происходящих процессов были проведены процедура молекулярного докинга и анализ образованных комплексов белок-кофактор. На первом этапе были построены 3D модели белков с аминокислотными заменами $\text{GapA}^{\text{D34AG188TP189K}}$ и $\text{GapA}^{\text{D34K}}$ с помощью сервера I-TASSER (см. Метериалы и методы). С помощью методов молекулярного моделирования к аминокислотным остаткам лизина в определенных позициях были добавлены ацетильные группы, а полученные структуры были оптимизированы с помощью силового поля Charmm 36M (см. Методика).

Данные молекулярного докинга отлично коррелировали с результатами измерений активности белков. Построенные в программе DockingServer комплексы фермент-кофактор позволили объяснить изменения в значениях активности ферментов $\text{GapA}^{\text{D34AG188TP189K}}$ и $\text{GapA}^{\text{D34K}}$. В случае белка $\text{GapA}^{\text{D34K}}$ стабилизация образуемых связей с кофакторами обеспечена аминокислотными

остатками лизина в позициях 124 и 192 для кофактора НАДФ⁺ и только аминокислотным остатком лизина в позиции 124, для кофактора НАД⁺.

Логотип консенсусной последовательности, показывающий аминокислотный состав в положениях от -10 до +10 относительно чувствительных к ацелированию остатков лизина, был создан с использованием онлайн сервиса WebLogo (рисунок 10). Для его построения были использованы аминокислотные последовательности 100 белков *E. coli* из опубликованного протеомного анализа ацелированных белков.

Равномерность распределения аминокислотных остатков лизина в пептидах была оценена с помощью критерия согласия Колмогорова. Данная метрика используется для сравнения эмпирической функции распределения остатков лизина в белковой последовательности с теоретической функцией равномерного распределения. Нулевая гипотеза состоит в том, что аминокислотные остатки лизина распределены равномерно по всей белковой последовательности. Альтернативная гипотеза состоит в том, что аминокислотные остатки лизина не распределены равномерно по белковой последовательности.

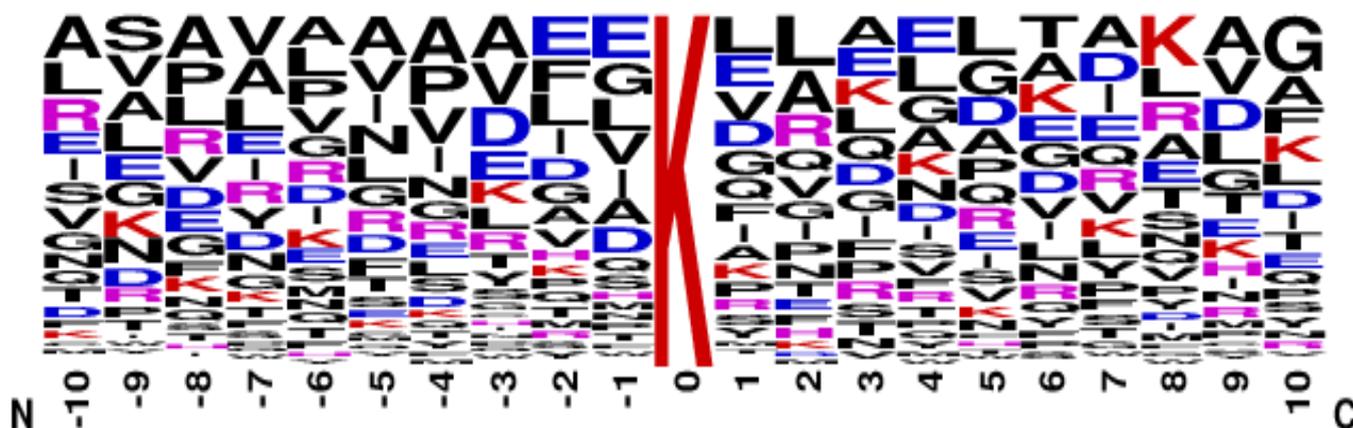


Рисунок 10. Вероятностное распределение аминокислотных остатков в белках *E. coli* в непосредственной близости ацелированных аминокислотных остатков лизина (Plekhanova et al., 2023).

Критерий Колмогорова вычисляет максимальное отклонение между двумя функциями распределения относительно стандартного распределения и преобразует его в p-value – вероятность получения отклонения при верности нулевой гипотезы. В данном случае было получено значение p-value, равное $1 \cdot 10^{-6}$, что свидетельствует об очень низкой вероятности равномерного распределения остатков лизина. Поэтому была принята альтернативная гипотеза с уровнем значимости 95%, заключающаяся в том, что ацелилированные остатки лизина не распределены равномерно в пептидах, а имеется определенная закономерность в их окружении другими аминокислотными остатками. Для вычисления критерия Колмогорова была использована библиотека `scipy`, которая предоставляет различные статистические функции для Python.

Из полученной диаграммы вероятности аминокислотного окружения ацелилированного остатка лизина видно, что в наибольшей вероятностью в соседнем положении от ацелилированного остатка лизина находится аминокислотный остаток глутаминовой кислоты, который, вероятнее всего, служит основным катализатором для инициирования реакции ацелилирования, а через 4 аминокислоты с высокой степенью вероятности находится еще один аминокислотный остаток лизина, что и наблюдается как в случае белка `GapAD34AG188TP189K`, так и в случае белка `GapAD34K`.

Из сопоставления полученных данных масс-спектрометрии и анализа аминокислотных последовательностей белков можно сделать вывод, что аминокислотные замены на лизин в позициях 34 и 189 обеспечивают необходимое окружение для создания дополнительных сайтов ацелилирования в позициях 23 и 184 соответственно.

ГЛАВА X. ВЛИЯНИЕ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО N_E-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ *ESCHERICHIA COLI*

Неферментативное ацетилирование — это самопроизвольно протекающая химическая реакция, в результате которой расходуются энергетически значимые субстраты (Weinert et al., 2014). Основными ацетилирующими белки химическими агентами, донорами ацетильных групп, являются ацетил-КоА и ацетилфосфат. Исследователи использовали количественную масс-спектрометрию для измерения изменений степени ацетилирования лизина в *Saccharomyces cerevisiae*. Было показано, что задержка роста в сочетании с высоким «уровнем» метаболизма приводило к накоплению в клетках ацетил-КоА, посредством которого происходило ацетилирование аминокислотных остатков лизина по неферментативному механизму (Weinert et al., 2013). Также было установлено, что по количеству модифицированных лизинов ацетилфосфат-зависимое ацетилирование превосходит ацетилирование лизинов, катализируемое ацетилтрансферазами. Кристаллографические данные показывают, что ацетилфосфат может связываться с белками в их активных центрах и сайтах связывания кофакторов, а также потенциально везде, где могут связываться с белком молекулы с фосфатной группой (Kuhn et al., 2014).

У неферментативного ацетилирования есть преимущество. Для принимающих в нем участие молекул, таких как АсР, и АсСоА, существует тенденция к экспонированию на поверхность чувствительных лизинов (Baeza et al., 2015). Из-за их относительно небольшого размера они могут получить доступ к некоторым остаткам лизина, доступ к которым пространственно затруднен для ацетилтрансфераз. Таким образом, белковые структуры могут использовать неферментативное ацетилирование для регуляции функций белка в сайтах, недоступных для ферментативного ацетилирования.

До сих пор не вполне ясно, в каких условиях регулируется неферментативное ацилирование и каковы его функции, но известно, что на неферментативное ацилирование влияют реакционная способность донора ацетильной группы и его концентрация в клетках, доступность различных остатков лизина в белке и локальный pH.

Для оценки влияния неферментативного ацетилирования *in vitro* на ферментативную активность ГАФД была очищена ацетилфосфат синтаза, которая, используя ацетат и АТФ в качестве субстратов и катализирует реакцию образования ацетилфосфата. Предполагалось, проведение реакции синтеза ацетилфосфата *in situ*, который в дальнейшем будет ацетилировать аминокислотные остатки ГАФД. Для полного исключения ферментативного ацетилирования ГАФ синтезировали в штамме с делецией гена, кодирующего ацетилтрансферазу PatZ (MG1655 $\Delta patZ$).

Таблица 11. НАД⁺-зависимая активность ГАФД при неферментативном ацетилировании *in vitro*. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Белок	НАД ⁺ -специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	550 ± 1,6	117 ± 0,7	300 ± 1,0

Для усиления неферментативного ацетилирования в живой клетке была проведена коэкспрессия генов, кодирующих ГАФД и ацетилфосфатсинтазу на эквивалентных по копияности плазидах. Синтез белка ГАФД также осуществляли в штамме с делецией ацетилтрансферазы, для полного исключения ферментативного ацетилирования.

Таблица 12. НАД⁺-зависимая активность ГАФД при неферментативном ацетилировании *in vivo*. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Белок	НАД ⁺ -специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	485 ± 2,0	110 ± 0,6	297 ± 0,9

Неферментативное ацетилирование многократно снижало активность ГАФД, причем таким образом, что реакция деацетилирования не восстанавливало ее до прежнего уровня. Это может объясняться тем, что ацетилфосфат способен ацетилировать труднодоступные аминокислотные остатки лизинов, к которым нет имеют доступа ацетилтрансфераза и деацетилаза.

Таблица 13. Идентифицированные аминокислотные остатки лизина в исследуемых формах белка ГАФД в результате неферментативного ацетилирования *in vitro* и *in vivo*

ГАФД	Неферментативно ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД								
<i>In vitro</i>	N-	124	184	213	217	225	257	269	-C
<i>In vivo</i>		124	184	213	217	225	257	269	

Обнаруженный способ влияния на энзиматическую активность представляет собой потенциальный механизм регулирования энергетического статуса клетки, так как в процессе ацетилирования задействованы ацетил-КоА и НАД⁺, две молекулы, которые непосредственно участвуют в метаболических процессах. Такого рода метаболическая регуляция посредством ацетилирования может быть консервативным механизмом у разных организмов.

ГЛАВА XI. СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ШТАММАХ MG1655 И BL21(DE3)

В разных бактериальных штаммах процессы ацетилирования протекают по-разному. Не является исключением и штаммы *E. coli*, которых на сегодняшний день существует огромное множество. Одними из самых распространенных являются штаммы линии К MG1655 и штаммы линии В BL21.

Эти штаммы имеют различный метаболизм, различные показатели скорости роста и они по-разному склонны к накоплению ацетата, а это в свою очередь может по-разному сказываться на процессах ацетилирования и активностях различных ферментов.

Ключевая характеристика штамма – скорость удвоения клеток. Зависимость оптической плотности от времени представленная на рисунке 11 показывает превосходство штамма MG1655 над штаммом BL21(DE3) по накоплению биомассы.

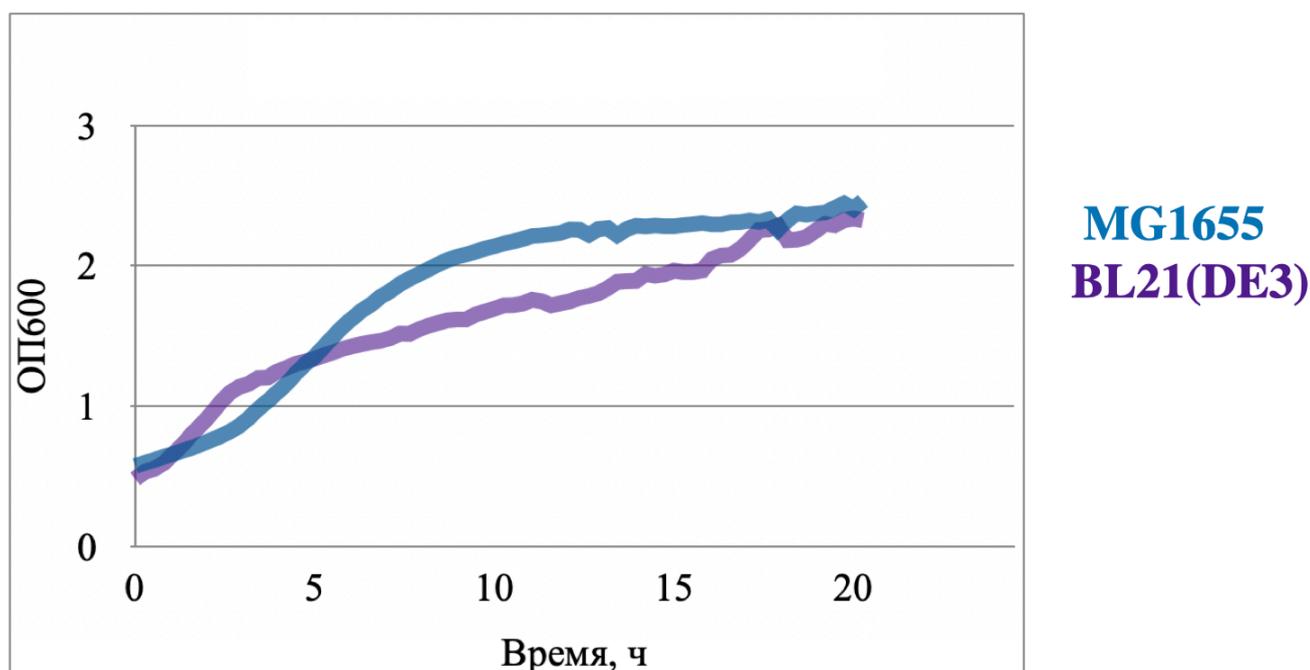


Рисунок 11. Рост штаммов *E. coli* MG1655 и BL21 (DE3) на минимальной среде М9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода (Плеханова и др, 2024 а).

Штамма MG1655 имеет более высокую скорость роста и более короткую лаг-фазу по сравнению со штаммом BL21(DE3).

Для изучения влияния процессов ацетилирования на свойства штаммов *E. coli* в качестве объекта была также выбрана глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Мы оценивали активности ГАФД, кодируемой хромосомной копией гена *gapA* в штаммах *E. coli* MG1655 и BL21(DE3). Результаты измерений представлены на рисунке 12.

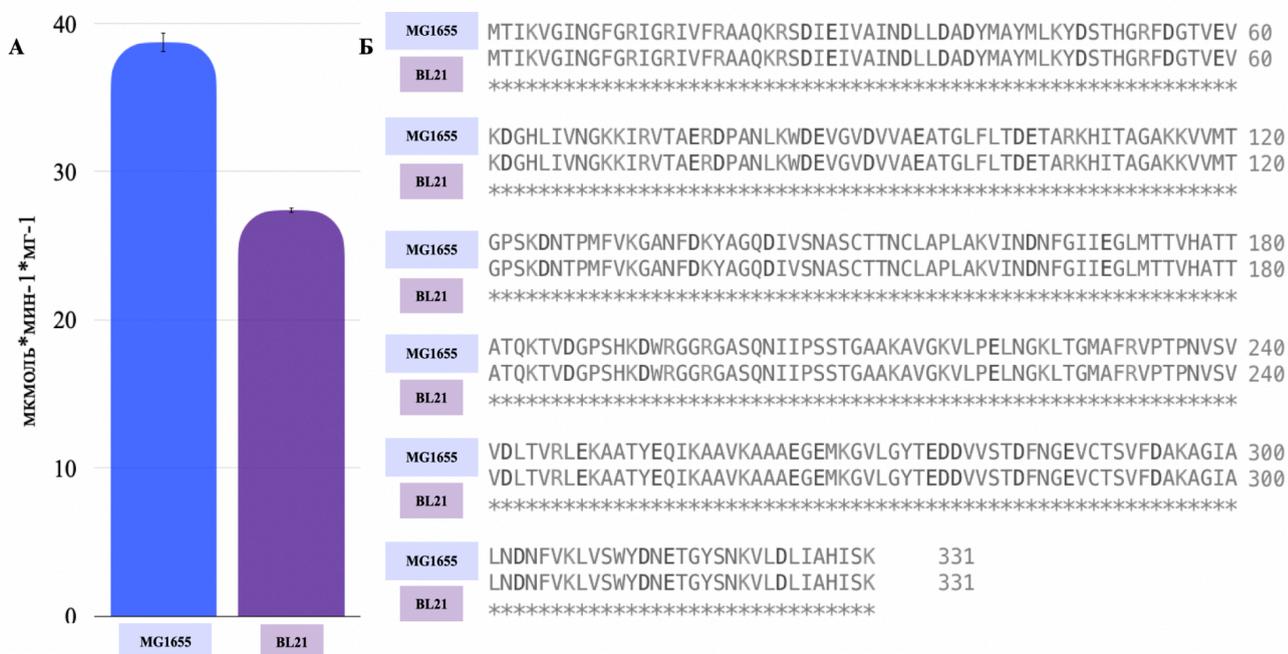


Рисунок 12. Сравнение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в штаммах MG1655 и BL21(DE3) (Плеханова и др, 2024 а).

А – НАД⁺-зависимая активность ГАФД исходных штаммов MG1655 и BL21(DE3); представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах; Б – сравнительное выравнивание аминокислотных последовательностей ферментов ГАФД штаммов MG1655 и BL21

Как следует из рисунка 12 А, показатели удельной активности ГАФД, у этих штаммов значительно различаются. При полной идентичности аминокислотных последовательностей белков в обоих штаммах (рисунок 12Б), показатель удельной активности белкового препарата ГАФД в штамме MG1655 линии К-12 на 35% превышает удельную активность того же белка в штамме линии В.

Многочисленные исследования показали, что ацетилирование остатков лизина преимущественно нацелено на ферменты, участвующие в центральном метаболизме. Поскольку некоторые из этих остатков лизина каталитически активны, их ацетилирование может регулировать метаболизм бактерий. Эта гипотеза подтверждается несколькими исследованиями *in vitro*, показывающими, что ацетилирование остатков лизина действительно изменяет активность некоторых ферментов, участвующих в центральном метаболизме.

Для подтверждения *in vivo* полученных ранее результатов была сконструирована плазида, несущая ген охарактеризованной ацетилтрансферазы *E. coli* и позволяющая производить совместную экспрессию в одной клетке с плазмидой рКК-*gapA*^{WT}. Плазида сконструирована таким образом, что позволяет производить экспрессию в клетках *E. coli* линии К и В. Кодированный ацетилтрансферазу ген находится под регуляцией промотора T5, который узнается пролимеразами *E. coli*, а копияность данной плазмиды аналогична копияности плазмиды, несущей ген *gapA*.

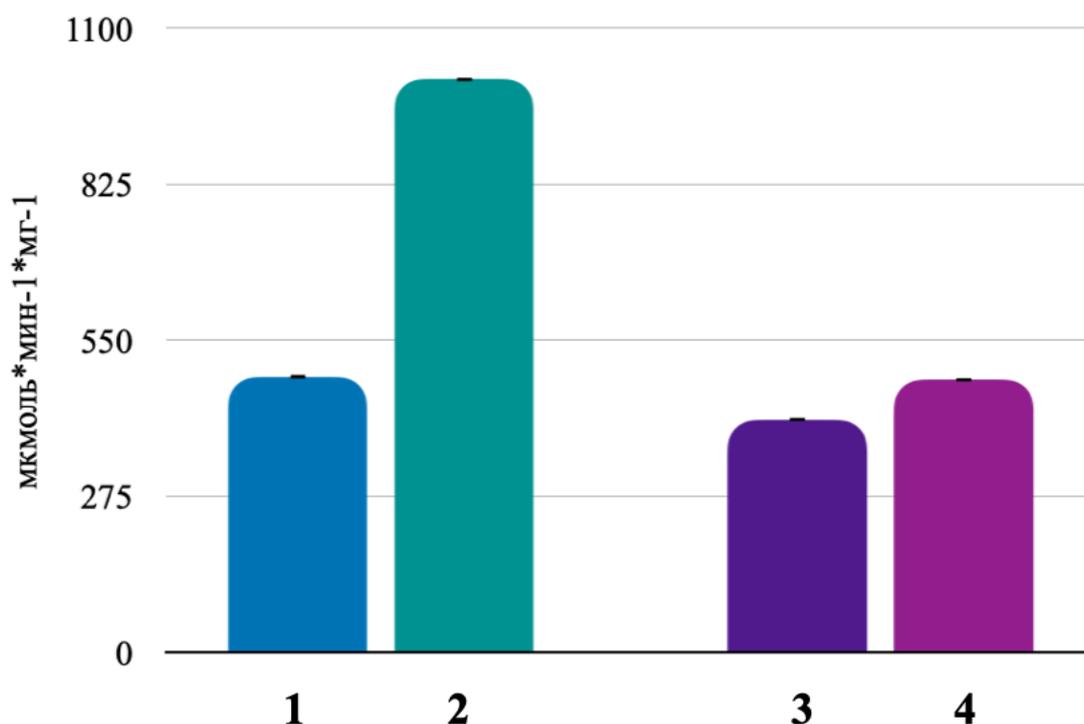


Рисунок 13. Влияние плазмид $pKK-gapA^{WT}$ и $pNSP1-patZ$ на активность НАД⁺-зависимой ГАФД штаммов MG1655 и BL21(DE3). (1) - штамм MG1655/ $pKK-gapA^{WT}$; (2) - штамм MG1655/ $pKK-gapA^{WT}$ + $pNSP1-patZ$; (3) - штамм BL21(DE3)/ $pKK-gapA^{WT}$; (4) - штамм BL21(DE3)/ $pKK-gapA^{WT}$ + $pNSP1-patZ$. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах (Плеханова и др, 2024а).

Как показано на рисунке 13, удельная активность ГАФД в штамме линии K12 MG1655 зависит от ацетилирования. Показатели активности фермента увеличивались вдвое при совместной экспрессии двух плазмид. Однако такое поведение ГАФД не наблюдалось в штамме линии В BL21(DE3). В данном штамме уровень удельной активности ГАФД сохранялся постоянным, независимо от уровня экспрессии ацетилтрансферазы. Для внесения ясности в реализацию данного процесса были идентифицированы ацетилированные аминокислотные остатки лизина в белках ГАФД, синтезированных в штаммах MG1655 и BL21(DE3). Результаты анализа представлены в таблице 14.

Таблица 14. Ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД, полученные в разных штаммах

Штамм	Ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД																
MG1655	N-			115	116	124	132	138		213			249	257			-C
BL21		70	71	115	116	124			192	213	217	225		257	261	321	

Как видно из представленных данных, аминокислотные остатки в белках ацетилированы по-разному, что демонстрирует взаимосвязь процессов ацетилирования и особенностей метаболизма штамма. Возможно, аминокислотные остатки в белках ацетилированы по-разному, что демонстрирует корреляцию этих процессов с особенностями метаболизма штаммов. При этом реакция, вероятнее всего, проходила по обоим механизмам, ферментативному и неферментативному. Можно предположить, что ферментативному ацетилированию подвергаются одни и те же аминокислотные остатки лизина в анализируемых штаммах. Различие в модификации лизиновых остатков ГАФД в этих штаммах, вероятно, связано с неферментативным механизмом и может быть объяснено особенностями метаболических процессов.

Ацетилирование аминокислотных остатков лизина, локализованных на поверхности мономеров белка, может как увеличивать, так и снижать образование активных форм фермента. На рисунке 14 и 15 приведены 3D-модели фермента ГАФД с распределенными несовпадающими уникальными ацетилированными аминокислотными остатками лизина, полученного в штаммах *E. coli*, MG1655 и BL21(DE3), соответственно.

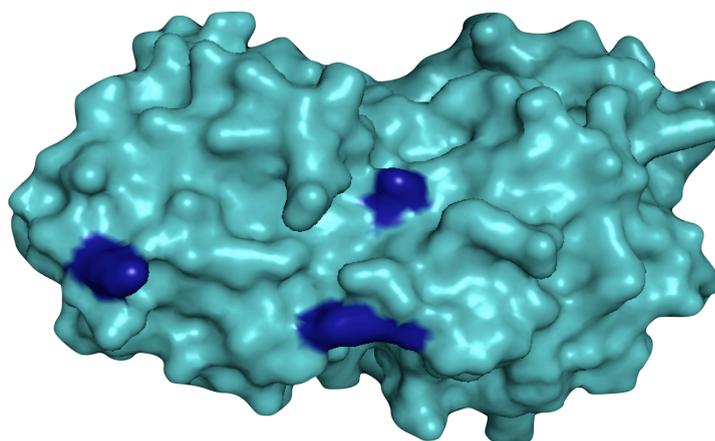


Рисунок 14. Распределение несовпадающих (уникальных для штамма) ацетилированных аминокислотных остатков лизина по белковой поверхности ГАФД (PDB 1S7C), полученный в штамме MG1655 (Плеханова и др, 2024 а).

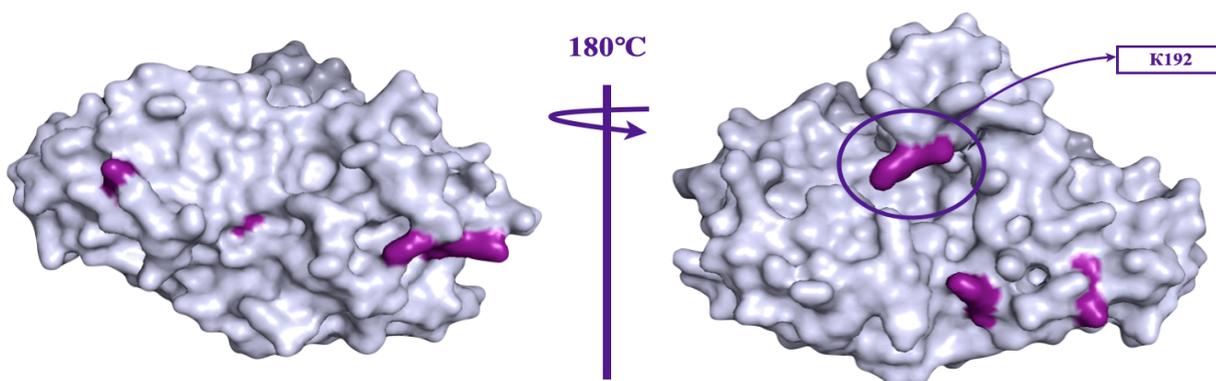


Рисунок 15. Распределение несовпадающих ацетилированных аминокислотных остатков лизина по белковой поверхности ГАФД (PDB 1S7C), полученный в штамме BL21(DE3) (Плеханова и др, 2024 а).

Идентифицированные ферментативно ацетилированные *in vitro* и *in vivo* (таблица 10) аминокислотные остатки лизина ГАФД, полученного в штамме MG1655, и было показано, что эта модификация увеличивает активность фермента в 2 раза, как и в случае ферментативного ацетилирования *in vivo* в этом штамме. В данной работе для ферментов ГАФД из штаммов MG1655 и BL21(DE3) показано, что некоторые из ранее идентифицированных аминокислотных остатков лизина также ацетилированы, а именно, 115 и 124 остатки для обоих штаммов и

70, 71 остатки для штамма BL21. С другой стороны, в С-концевой части белков также присутствуют ацетилированные аминокислотные остатки лизина. Визуализация распределения ацетилированных остатков лизина показала их локализацию на поверхности белковой глобулы, что позволяет предположить неферментативный механизм их модификации посредством переноса ацетильной группы с молекулы ацетилфосфата. Фермент из штамма BL21(DE3) обладает пониженной активностью. На рисунке 15 выделен ацетилированный аминокислотный остаток лизина 192. Он находится в непосредственной близости к сайту связывания кофактора, и это может объяснять снижение энзиматической активности. Следовательно, неферментативно ацетилированные аминокислотные остатки лизина могут быть причиной снижения активности фермента. Различия в процессах ацетилирования могут быть связаны с различными внутриклеточными концентрациями ацетилфосфата и ацетата в двух штаммах, что может стать серьезной проблемой при промышленном культивировании штаммов *E. coli*, в том числе продуцентов аминокислот. Образование значительного количества ацетата на средах с глюкозой снижает конверсию моносахарида в целевой продукт и угнетает рост клеток. Данный факт необходимо принимать во внимание при выборе штамма в качестве платформы при создании штаммов-продуцентов аминокислот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В развивающейся области изучения ацетилирования белков существует еще множество нерешенных вопросов и потенциальных возможностей для использования в фундаментальной и прикладной областях науки. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что ферментативная активность белка — не единственный аспект, на который влияет ацетилирование аминокислотных остатков лизина, и, возможно, нам необходимо уделять больше внимания влиянию ацетилирования на структуру, олигомеризацию, белок-белковое взаимодействие и многое другое.

На сегодняшний день нет исследований, посвященных ацетилированию белков, как инструменту создания бактериальных штаммов-продуцентов. Детальное изучение этой посттрансляционной модификации у бактерий позволит разработать новые подходы «тонкой настройки» метаболизма путем влияния на уже синтезированные белки. В этой работе мы продемонстрировали возможность комплексного подхода для усовершенствования штаммов-продуцентов аминокислот, используя как традиционные методы селекции штаммов и методы генной инженерии, так и возможности процессов ацетилирования.

Предложенный метод, основанный на усилении процессов ацетилирования на различных стадиях ферментационного процесса, имеет ряд преимуществ, основным из которых является его универсальность. Увеличения продуктивности штамма-продуцента треонина от 14 до 30% можно добиться при использовании различных источников углерода. Это делает возможным создание универсальных по потреблению различных субстратов штаммов-продуцентов, что, в свою очередь, позволит производить целевой продукт независимо от постоянного изменения цен на углеродное сырье и невзирая на их локальную доступность. Также, как уже говорилось выше, обнаруженный способ позволяет воздействовать на уже синтезированные белки, изменяя их энзиматическую активность, как в случае фермента ГАФД. Дополнительные исследования влияния процессов ацетилирования на ключевые ферменты, участвующие в метаболическом пути целевого продукта, позволят создать оптимальные условия реализации этих процессов для повышения продуктивности создаваемых штаммов-продуцентов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что усиление процесса ферментативного ацетилирования в начальной фазе ферментации позволяет добиться повышения продуктивности штамма-продуцента *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода от 8 до 33%.
2. Показано, что усиление деацетилирования на поздней стадии ферментации, в частности, в штаммах с повышенной устойчивостью к ацетату, позволяет добиться повышения продуктивности штамма-продуцента треонина *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода от 14 до 30%.
3. Показано, что ферментативное ацетилирование приводит к двукратному увеличению активности ключевого фермента центрального метаболизма ГАФД *E. coli* как *in vitro*, так и *in vivo*.
4. Установлено, что уровень удельной активности ГАФД *E. coli* регулируется с помощью деацетилазы CobV как в случае ферментативного, так и неферментативного ацетилирования.
5. Уровень активности ГАФД зависит как от характеристик самого штамма, так и от уровня ацетилирования этого фермента.
6. Установлено, что ферменты, участвующие в процессах ацетилирования, не являются жизненно важными для клеток *E. coli*, однако их делеции приводят к снижению скорости роста и накоплению биомассы штаммами, однако в случае штаммов-продуцентов аминокислот не приводят к снижению уровня продукции L-треонина и L-пролина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AcP – ацетилфосфата;

Ap – ампициллин;

Cm – хлорамфеникол;

G3P – глицеральдегид-3-фосфат;

Km – канамицин

PEP — фосфоенолпируват;

PPP – пентозофосфатный путь;

PTS – фосфотрансферазная система;

SDS – додецилсульфат натрия;

АДФ – аденозиндифосфат;

АТФ – аденозин трифосфат;

ГАФД — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;

КоА – Коэнзим А;

НАД⁺/НАДН – никотинамидадениндинуклеотид окисленная/восстановленная форма;

НАДФ⁺/НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;

ОП – оптическая плотность;

ПТМ — посттрансляционные модификации;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот;

п.н. – пар нуклеотидов;

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плеханова Н.С., Лившиц В.А., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние ацетилирования и деацетилирования белков на метаболизм штаммов *Escherichia coli* // Биотехнология. – 2024. – Т.40. – № 3. – С. 36-46.
2. Плеханова Н.С., Лившиц В.А., Хижняк Т.В., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние процесса деацетилирования на продукцию треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli* // Биотехнология. – 2024. – Т.40. – № 4. – С. 1-11.
3. Akesson M., Karlsson E.N, Hagander P., Axelsson J.P., Tocaj A. On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients // Biotechnology and bioengineering. – 1999. – V. 64. – №. 5. – P. 590-598.
4. Šoškić V., Groebe K., Schrattenholz A. Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing // Experimental gerontology. – 2008. – V. 43. – №. 4. – P. 247-257.
5. Abdel-Hamid A.M., Attwood M.M., Guest J.R. Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli* // Microbiology. – 2001. – V. 147. – №. 6. – P. 1483-1498.
6. AbouElfetouh A., Kuhn M.L., Hu L.I., Scholle M.D., Sorensen D.J., Sahu A.K., Becher D., Antelmann H., Mrksich M., Anderson W.F., Gibson B.W., Schilling B., Wolfe A.J. The *E. coli* sirtuin CobB shows no preference for enzymatic and nonenzymatic lysine acetylation substrate sites // Microbiologyopen. – 2015. – V. 4. – №. 1. – P. 66-83.
7. Aguilar C., Martínez-Batallar G., Flores N., Moreno-Avitia F., Encarnación S., Escalante A., Bolívar F. Analysis of differentially upregulated proteins in *ptsHI^{err}*– and *rppH*– mutants in *Escherichia coli* during an adaptive laboratory evolution experiment // Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – V. 102. – P. 10193-10208.

8. Aidelberg G., Towbin B.D., Rothschild D., Dekel E., Bren A., Alon U. Hierarchy of non-glucose sugars in *Escherichia coli* // BMC systems biology. – 2014. – V. 8. – P. 1-12.
9. Akesson M., Hagander P., Axelsson J.P. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding // Biotechnology and bioengineering. – 2001. – V. 73. – №. 3. – P. 223-230.
10. Alekshun M.N., Levy S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance // Cell. – 2007. – V. 128. – №. 6. – P. 1037-1050.
11. Allfrey V.G., Faulkner R., Mirsky A.E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1964. – V. 51. – №. 5. – P. 786-794.
12. Almeida Da Silva P.E., Palomino J.C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2011. – V. 66. – №. 7. – P. 1417-1430.
13. Alonso A., Sanchez P., Martínez J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes // Environmental microbiology. – 2001. – V. 3. – №. 1.
14. Andersen K.B., von Meyenburg K. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? // Journal of bacteriology. – 1980. – V. 144. – №. 1. – P. 114-123.
15. Anderson J.B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness // Nature Reviews Microbiology. – 2005. – V. 3. – №. 7. – P. 547-556.
16. Ardito F., Giuliani M., Perrone D., Troiano G., Lo M.L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy // International journal of molecular medicine. – 2017. – V. 40. – №. 2. – P. 271-280.
17. Aristidou A., Penttilä M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization // Current opinion in biotechnology. – 2000. – V. 11. – №. 2. – P. 187-198.

18. Aristidou A.A., San K.Y., Bennett G.N. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source // *Biotechnology progress*. – 1999. – V. 15. – №. 1. – P. 140-145.
19. Avison M.B., Horton R.E., Walsh T.R., Bennett P.M. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. – №. 29. – P. 26955-26961.
20. Awasthi D., Tang Y.H., Amer B., Baidoo E.E.K., Gin J., Chen Y., Petzold C.J., Kalyuzhnaya M., Singer S.W. Adaptive evolution of *Methylovibrio mobilis* to grow in the presence of rhamnolipids improves fatty acid and rhamnolipid production from CH₄ // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – V. 49. – №. 2. – P. kuac002.
21. Báez-Viveros J.L., Flores N., Juárez K., Castillo-España P., Bolivar F., Gosset G. Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine // *Microbial Cell Factories*. – 2007. – V. 6. – P. 1-20.
22. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection // *Molecular systems biology*. – 2006. – V. 2. – №. 1. – P. 2006.0008.
23. Baeza J., Smallegan M.J., Denu J.M. Site-specific reactivity of nonenzymatic lysine acetylation // *ACS chemical biology*. – 2015. – V. 10. – №. 1. – P. 122-128.
24. Bagwan N., El Ali H. H., Lundby A. Proteome-wide profiling and mapping of post translational modifications in human hearts // *Scientific reports*. – 2021. – V. 11. – №. 1. – P. 2184.
25. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* // *Current opinion in biotechnology*. – 1999. – V. 10. – №. 5. – P. 411-421.
26. Barrick J.E., Yu D.S., Yoon S.H., Jeong H., Oh T.K., Schneider D., Lenski R.E., Kim J.F. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli* // *Nature*. – 2009. – V. 461. – №. 7268. – P. 1243-1247.

27. Basan M., Hui S., Okano H., Zhang Z., Shen Y., Williamson J.R., Hwa T. Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation // *Nature*. – 2015. – V. 528. – №. 7580. – P. 99-104.
28. Becker R., Lari, I., Lucertini M., Simeone B. Max-min partitioning of grid graphs into connected components // *Networks: An International Journal*. – 1998. – V. 32. – №. 2. – P. 115-125.
29. Bi J., Wang Y., Yu H., Qian X., Wang H., Liu J., Zhang X. Modulation of central carbon metabolism by acetylation of isocitrate lyase in *Mycobacterium tuberculosis* // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 44826.
30. Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // *science*. – 1997. – V. 277. – №. 5331. – P. 1453-1462.
31. Blount Z.D., Borland C.Z., Lenski R.E. Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – V. 105. – №. 23. – P. 7899-7906.
32. Bock A. Biosynthesis of selenoproteins—an overview // *Biofactors*. – 2000. – V. 11.
33. Bommarreddy, R.R., Chen, Z., Rappert, S., Zeng, A.P. A de novo NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase // *Metabolic engineering*. – 2014. – V. 25. – P. 30-37.
34. Brosnan J.T. Amino acids, then and now — a reflection on Sir Hans Krebs's contribution to nitrogen metabolism // *IUBMB Life*. — 2001. — V. 52, № 3. — P. 265–270.
35. Buchinger S., Strösser J., Rehm N., Hänssler E., Hans S., Bathe B., Schomburg D., Krämer R., Burkovski A. A combination of metabolome and transcriptome analyses reveals new targets of the *Corynebacterium glutamicum* nitrogen

- regulator AmtR // Journal of biotechnology. – 2009. – V. 140. – №. 1-2. – P. 68-74.
36. Lozano Terol G., Gallego-Jara J., Sola Martínez R.A., Cánovas Díaz M., de Diego Puente T. Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N ϵ -lysine acetylation // Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – V. 99. – №. 8. – P. 3533-3545.
37. Castaño-Cerezo S., Bernal V., Blanco-Catalá J., Iborra J. L., Cánovas M. cAMP-CRP co-ordinates the expression of the protein acetylation pathway with central metabolism in *Escherichia coli* // Molecular microbiology. – 2011. – V. 82. – №. 5. – P. 1110-1128.
38. Castaño-Cerezo S., Bernal V., Post H., Fuhrer T., Cappadona S., Sánchez-Díaz N.C., Sauer U., Heck A.J., Altelaar A.F., Cánovas M. Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli* // Molecular systems biology. – 2014. – V. 10. – №. 11. – P. 762.
39. Cen P., Chen J. Enhanced production of human epidermal growth factor by a recombinant *Escherichia coli* integrated with in situ exchange of acetic acid by macroporous ion-exchange resin // Journal of bioscience and bioengineering. – 2005. – V. 100. – №. 5. – P. 579-581.
40. Chang D. E., Shin S., Rhee J. S., Pan J. G. Acetate metabolism in a pta mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival // Journal of bacteriology. – 1999. – V. 181. – №. 21. – P. 6656-6663.
41. Chang Y.Y., Cronan Jr J.E. Genetic and biochemical analyses of *Escherichia coli* strains having a mutation in the structural gene (poxB) for pyruvate oxidase // Journal of bacteriology. – 1983. – V. 154. – №. 2. – P. 756-762.
42. Darwin C. The Origin of Species: By Means of Natural Selection Or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. – Bantam Classics, 1999.
43. Cheng L.K., Wang J., Xu Q.Y., Xie X.X., Zhang Y.J., Zhao C.G., Chen N. Effect of feeding strategy on L-tryptophan production by recombinant *Escherichia coli* // Annals of microbiology. – 2012. – V. 62. – P. 1625-1634.

44. Chen R., Yap W.M., Postma P.W., Bailey J.E. Comparative studies of *Escherichia coli* strains using different glucose uptake systems: metabolism and energetics // *Biotechnology and bioengineering*. – 1997. – V. 56. – №. 5. – P. 583-590.
45. Chen Z., Bommareddy R.R., Frank D., Rappert S., Zeng A.P. Deregulation of feedback inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase for improved lysine production in *Corynebacterium glutamicum* // *Applied and environmental microbiology*. – 2014. – V. 80. – №. 4. – P. 1388-1393.
46. Cherrington C.A., Hinton M., Pearson G.R., Chopra I. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* without causing membrane perturbation // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1991. – V. 70. – №. 2. – P. 161-165.
47. Chou C.H., Bennett G.N., San K.Y. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures // *Biotechnology and bioengineering*. – 1994. – V. 44. – №. 8. – P. 952-960.
48. Christensen D.G., Baumgartner J.T., Xie X., Jew K.M., Basisty N., Schilling B., Kuhn M.L., Wolfe A.J. Mechanisms, detection, and relevance of protein acetylation in prokaryotes // *MBio*. – 2019. – V. 10. – №. 2. – P. 10.1128/mbio.02708-18.
49. Conrad T.M., Lewis N.E., Palsson B.Ø. Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science // *Molecular systems biology*. – 2011. – V. 7. – №. 1. – P. 509.
50. Borja G.M., Meza Mora E., Barrón B., Gosset G., Ramírez O.T., Lara A.R. Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli* // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2000. – V. 24. – №. 6. – P. 421-430.
51. Díaz-Guerra M., Esteban M., Martínez J. L. Growth of *Escherichia coli* in acetate as a sole carbon source is inhibited by ankyrin-like repeats present in the 2', 5'-linked oligoadenylate-dependent human RNase L enzyme // *FEMS microbiology letters*. – 1997. – V. 149. – №. 1. – P. 107-113.

52. Demerec M., Fano U. Bacteriophage-resistant mutants in *Escherichia coli* // Genetics. – 1945. – V. 30. – №. 2. – P. 119.
53. Diaz-Ricci J.C., Hitzmann B., Rinas U., Bailey J.E. Comparative studies of glucose catabolism by *Escherichia coli* grown in a complex medium under aerobic and anaerobic conditions // Biotechnology progress. – 1990. – V. 6. – №. 5. – P. 326-332.
54. Dittrich C.R., Vadali R.V., Bennett G.N., San K.Y. Redistribution of metabolic fluxes in the central aerobic metabolic pathway of *E. coli* mutant strains with deletion of the *ackA-pta* and *poxB* pathways for the synthesis of isoamyl acetate // Biotechnology progress. – 2005. – V. 21. – №. 2. – P. 627-631.
55. Dong X., Zhao Y., Hu J., Li Y., Wang X. Attenuating l-lysine production by deletion of *ddh* and *lysE* and their effect on l-threonine and l-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* // Enzyme and Microbial Technology. – 2016. – V. 93. – P. 70-78.
56. Dragosits M., Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution—principles and applications for biotechnology // Microbial cell factories. – 2013. – V. 12. – P. 1-17.
57. Eggeling L., Bott M.A. A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum* // Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – V. 99. – P. 3387-3394.
58. Eiteman M.A., Altman E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations // Trends in biotechnology. – 2006. – V. 24. – №. 11. – P. 530-536.
59. El-Mansi M. Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2004. – V. 31. – №. 7. – P. 295-300.
60. Engels V., Wendisch V. F. The DeoR-type regulator SugR represses expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum* // Journal of bacteriology. – 2007. – V. 189. – №. 8. – P. 2955-2966.

61. Enjalbert B., Coccagn-Bousquet M., Portais, J.C., Letisse F. Acetate exposure determines the diauxic behavior of *Escherichia coli* during the glucose-acetate transition // *Journal of bacteriology*. – 2015. – V. 197. – №. 19. – P. 3173-3181.
62. Fang Z., Lai F., Cao K., Zhang Z., Cao L., Liu S., Duan Y., Yin X., Ge R., He Q.Y., Sun X. Potential role of lysine acetylation in antibiotic resistance of *Escherichia coli* // *Msystems*. – 2022. – V. 7. – №. 6. – P. e00649-22.
63. Ferreira D.J.M., Noble J. Yeast strain optimization for enological applications // *Advances in Grape and Wine Biotechnology*. – 2019. – P. 1-17.
64. Fong S.S., Burgard A.P., Herring C.D., Knight E.M., Blattner F.R., Maranas C.D., Palsson B.O. *In silico* design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid // *Biotechnology and bioengineering*. – 2005. – V. 91. – №. 5. – P. 643-648.
65. Friso G., van Wijk K.J. Posttranslational protein modifications in plant metabolism // *Plant physiology*. – 2015. – V. 169. – №. 3. – P. 1469-1487.
66. Fuchs C., Köster D., Wiebusch S., Mahr K., Eisbrenner G., Märkl H. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli* // *Journal of biotechnology*. – 2002. – V. 93. – №. 3. – P. 243-251.
67. Fu Y., Zhang L., Song H., Liao J., Lin L., Jiang W., Wu X., Wang G. Acetylome and succinylome profiling of *Edwardsiella tarda* reveals key roles of both lysine acylations in bacterial antibiotic resistance // *Antibiotics*. – 2022. – V. 11. – №. 7. – P. 841.
68. Görke B., Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008. – V. 6. – №. 8. – P. 613-624.
69. Gallego-Jara J., Écija Conesa A., de Diego Puente T., Lozano Terol G., Cánovas Díaz M. Characterization of CobB kinetics and inhibition by nicotinamide // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – №. 12. – P. e0189689.
70. Gerdes K., Christensen S. K., Løbner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – V. 3. – №. 5. – P. 371-382.

71. Godara A., Kao K.C. Adaptive laboratory evolution for growth coupled microbial production // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – V. 36. – P. 1-10.
72. Gordon A.H., Martin A.J.P., Synge R.L.M. Partition chromatography in the study of protein constituents // *Biochemical Journal*. – 1943. – V. 37. – №. 1. – P. 79.
73. Gorshkova N.V., Lobanova J.S., Tokmakova I.L., Smirnov S.V., Akhverdyan V.Z., Krylov A.A., Mashko S.V., Mu-driven transposition of recombinant mini-Mu unit DNA in the *Corynebacterium glutamicum* chromosome // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2018. – V. 102. – P. 2867-2884.
74. Gottesman S. Genetics of proteolysis in *Escherichia coli* // *Annual review of genetics*. – 1989. – V. 23. – №. 1. – P. 163-198.
75. Gottesman S. Proteases and their targets in *Escherichia coli* // *Annual review of genetics*. – 1996. – V. 30. – №. 1. – P. 465-506.
76. Hahm D.H., Pan J., Rhee J.S. Characterization and evaluation of a pta (phosphotransacetylase) negative mutant of *Escherichia coli* HB101 as production host of foreign lipase // *Applied microbiology and biotechnology*. – 1994. – V. 42. – P. 100-107.
77. Hallows W.C., Yu W., Smith B.C., Devries M.K., Ellinger J.J., Someya S., Shortreed M.R., Prolla T, Markley JL, Smith LM, Zhao S, Guan KL, Denu JM. Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction // *Molecular cell*. – 2011. – V. 41. – №. 2. – P. 139-149.
78. Han K., Lim H.C., Hong J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation // *Biotechnology and bioengineering*. – 1992. – V. 39. – №. 6. – P. 663-671.
79. Hasegawa S., Suda M., Uematsu K., Natsuma Y., Hiraga K., Jojima T., Inui M., Yukawa H.. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions // *Applied and environmental microbiology*. – 2013. – V. 79. – №. 4. – P. 1250-1257.
80. Hayashi K., Morooka N., Yamamoto Y., Fujita K., Isono K., Choi S., Ohtsubo E., Baba T., Wanner B.L., Mori H., Horiuchi T. Highly accurate genome sequences

- of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110 // Molecular systems biology. – 2006. – V. 2. – №. 1. – P. 2006.0007.
- 81.Helling R.B., Vargas C.N., Adams J. Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment // Genetics. – 1987. – V. 116. – №. 3. – P. 349-358.
- 82.Henrich A., Kuhlmann N., Eck A. W., Krämer R., Seibold, G.M. Maltose uptake by the novel ABC transport system MusEFGK2I causes increased expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum* // Journal of bacteriology. – 2013. – V. 195. – №. 11. – P. 2573-2584.
- 83.Hickman A.B., Namboodiri M.A.A., Klein D.C., Dyda F. The structural basis of ordered substrate binding by serotonin N-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog // Cell. – 1999. – V. 97. – №. 3. – P. 361-369.
- 84.Hong K.K., Vongsangnak W., Vemuri G.N., Nielsen, J. Unravelling evolutionary strategies of yeast for improving galactose utilization through integrated systems level analysis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – V. 108. – №. 29. – P. 12179-12184.
- 85.Horinouchi T., Tamaoka K., Furusawa C., Ono N., Suzuki S., Hirasawa T., Yomo T., Shimizu H. Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress // BMC genomics. – 2010. – V. 11. – P. 1-11.
- 86.Huang C.J., Lin H., Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2012. – V. 39. – №. 3. – P. 383-399.
- 87.Huang J., Wu Y., Wu W., Zhang Y., Liu D., Chen Z. Cofactor recycling for co-production of 1, 3-propanediol and glutamate by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 42246.
- 88.Huang J., Wang F., Ye M., Zou H. Enrichment and separation techniques for large-scale proteomics analysis of the protein post-translational modifications // Journal of Chromatography A. – 2014. – V. 1372. – P. 1-17.

89. Hyun Seo J., Gyun Kang D., Joon Cha H. Comparison of cellular stress levels and green-fluorescent-protein expression in several *Escherichia coli* strains // *Biotechnology and applied biochemistry*. – 2003. – V. 37. – №. 2. – P. 103-107.
90. Isogai S., Takagi H. Enhancement of lysine biosynthesis confers high-temperature stress tolerance to *Escherichia coli* cells // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2021. – V. 105. – №. 18. – P. 6899-6908.
91. Jarmander J., Hallström B.M., Larsson G. Simultaneous uptake of lignocellulose-based monosaccharides by *Escherichia coli* // *Biotechnology and bioengineering*. – 2014. – V. 111. – №. 6. – P. 1108-1115.
92. Jensen E.B., Carlsen S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts // *Biotechnology and bioengineering*. – 1990. – V. 36. – №. 1. – P. 1-11.
93. Jeong H., Barbe V., Lee C.H., Vallenet D., Yu D.S., Choi S.H., Couloux A., Lee S.W., Yoon S.H., Cattolico L., Hur C.G., Park H.S., Ségurens B., Kim S.C., Oh T.K., Lenski R.E., Studier F.W., Daegelen P., Kim J.F. Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3) // *Journal of molecular biology*. – 2009. – V. 394. – №. 4. – P. 644-652.
94. Johnston W.A., Stewart M., Lee P., Cooney M.J. Tracking the acetate threshold using DO-transient control during medium and high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* in complex media // *Biotechnology and bioengineering*. – 2003. – V. 84. – №. 3. – P. 314-323.
95. Jo S., Yoon J., Lee S.M., Um, Y., Han S.O., Woo H.M. Modular pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* to improve xylose utilization and succinate production // *Journal of biotechnology*. – 2017. – V. 258. – P. 69-78.
96. Kakuda H., Hosono K., Ichihara S. Identification and characterization of the ackA (acetate kinase A)-pta (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an ackA-pta deletion mutant of *Escherichia coli* // *The Journal of Biochemistry*. – 1994. – V. 116. – №. 4. – P. 916-922.

97. Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B.J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Krämer R., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Möckel B., Pfefferle W., Pühler A., Rey D.A., Rückert C., Rupp O., Sahm H., Wendisch V.F., Wiegräbe I., Tauch A. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins // *Journal of biotechnology*. – 2003. – V. 104. – №. 1-3. – P. 5-25.
98. Kang M.K., Lee J., Um Y., Lee T.S., Bott M., Park S.J., Woo H.M. Synthetic biology platform of CoryneBrick vectors for gene expression in *Corynebacterium glutamicum* and its application to xylose utilization // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2014. – V. 98. – P. 5991-6002.
99. Katashkina Zh.I., Skorokhodova A.Iu., Zimenkov D.V., Gulevich A.Iu., Minaeva N.I., Doroshenko V.G., Biriukova I.V., Mashko S.V. Tuning the expression level of a gene located on a bacterial chromosome // *Molecular Biology*. – 2005. – V. 39. – P. 719-726.
100. Katzman R., Terry R., DeTeresa R., Brown T., Davies P., Fuld P., Renbing X., Peck A. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 1988. – V. 23. – №. 2. – P. 138-144.
101. Kawaguchi H., Vertès A.A., Okino S., Inui M., Yukawa H. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum* // *Applied and environmental microbiology*. – 2006. – V. 72. – №. 5. – P. 3418-3428.
102. Ke M., Shen H., Wang L., Luo S., Lin L., Yang J., Tian R. Identification, quantification, and site localization of protein posttranslational modifications via mass spectrometry-based proteomics // *Modern proteomics—sample preparation, analysis and practical applications*. – 2016. – P. 345-382.
103. Keseler I.M., Mackie A., Peralta-Gil M., Santos-Zavaleta A., Gama-Castro S., Bonavides-Martínez C., Fulcher C., Huerta A.M., Kothari A., Krummenacker M.,

- Latendresse M., Muñiz-Rascado L., Ong Q., Paley S., Schröder I., Shearer A.G., Subhraveti P., Travers M., Weerasinghe D., Weiss V., Collado-Vides J., Gunsalus R.P., Paulsen I., Karp P.D. EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology // *Nucleic acids research*. – 2013. – V. 41. – №. D1. – P. D605-D612.
104. Ketema E.B., Lopaschuk G.D. Post-translational acetylation control of cardiac energy metabolism // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – 2021. – V. 8. – P. 723996.
105. Kim D., Yu B.J., Kim J. A., Lee Y.J., Choi S.G., Kang S., Pan J.G. The acetylproteome of Gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis* // *Proteomics*. – 2013. – V. 13. – №. 10-11. – P. 1726-1736.
106. Kleman G.L., Strohl W.R. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation // *Applied and environmental microbiology*. – 1994. – V. 60. – №. 11. – P. 3952-3958.
107. Kleman G.L., Chalmers J.J., Luli G.W., Strohl W.R. Glucose-stat, a glucose-controlled continuous culture // *Applied and environmental microbiology*. – 1991. – V. 57. – №. 4. – P. 918-923.
108. Ko C.H., Tsai C.H., Lin P.H., Chang K.C., Tu J., Wang Y.N., Yang C.Y. Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli* // *Bioresource technology*. – 2010. – V. 101. – №. 20. – P. 7882-7888.
109. Kosono S., Tamura M., Suzuki S., Kawamura Y., Yoshida A., Nishiyama M., Yoshida, M. Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source // *PloS one*. – 2015. – V. 10. – №. 6. – P. e0131169.
110. Krause F. S., Henrich A., Blombach B., Krämer R., Eikmanns B. J., Seibold G. M. Increased glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by use of maltose, and its application for the improvement of L-valine productivity // *Applied and environmental microbiology*. – 2010. – V. 76. – №. 1. – P. 370-374.
111. Kromer J.O., Sorgenfrei O., Klopprogge K., Heinzle E., Wittmann C. In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis

- of the transcriptome, metabolome, and fluxome // *Journal of bacteriology*. – 2004. – V. 186. – №. 6. – P. 1769-1784.
112. Kuhn M.L., Zemaitaitis B., Hu L.I., Sahu A., Sorensen D., Minasov G., Lima B.P., Scholle M., Mrksich M., Anderson W.F., Gibson B.W., Schilling B., Wolfe A.J. Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation // *PloS one*. – 2014. – V. 9. – №. 4. – P. e94816.
113. Kurihara K. Glutamate: from discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami) // *The American journal of clinical nutrition*. – 2009. – V. 90. – №. 3. – P. 719S-722S.
114. Lammers M. Post-translational lysine acetylation in bacteria: A biochemical, structural, and synthetic biological perspective // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – V. 12. – P. 757179.
115. Lee J.W., Na D., Park J.M., Lee J., Choi S., Lee S.Y. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals // *Nature chemical biology*. – 2012. – V. 8. – №. 6. – P. 536-546.
116. Lee K.H., Park J.H., Kim T.Y., Kim H.U., Lee S.Y. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production // *Molecular systems biology*. – 2007. – V. 3. – №. 1. – P. 149.
117. Lee S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* // *Trends in biotechnology*. – 1996. – V. 14. – №. 3. – P. 98-105.
118. Lenski R.E., Wiser M.J., Ribeck N., Blount Z.D., Nahum J.R., Morris J.J., Zaman L., Turner C.B., Wade B.D., Maddamsetti R., Burmeister A.R., Baird E.J., Bundy J., Grant N.A., Card K.J., Rowles M., Weatherspoon K., Papoulis S.E., Sullivan R., Clark C., Mulka J.S., Hajela N. Sustained fitness gains and variability in fitness trajectories in the long-term evolution experiment with *Escherichia coli* // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2015. – V. 282. – №. 1821. – P. 20152292.
119. Li L., Wang W., Zhang R., Xu J., Wang R., Wang L., Zhao X., Li J. First acetyl-proteome profiling of *Salmonella Typhimurium* revealed involvement of

- lysine acetylation in drug resistance // *Veterinary microbiology*. – 2018. – V. 226. – P. 1-8.
120. Lima B.P., Antelmann H., Gronau K., Chi B.K., Becher D., Brinsmade S.R., Wolfe A.J. Involvement of protein acetylation in glucose-induced transcription of a stress-responsive promoter // *Molecular microbiology*. – 2011. – V. 81. – №. 5. – P. 1190-1204.
121. Lindner S.N., Seibold G.M., Henrich A., Krämer R., Wendisch V.F. Phosphotransferase system-independent glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by inositol permeases and glucokinases // *Applied and environmental microbiology*. – 2011. – V. 77. – №. 11. – P. 3571-3581.
122. Lin H., Castro N.M., Bennett G.N., San K.Y. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2006. – V. 71. – P. 870-874.
123. Lin H.Y., Mathiszik B., Xu B., Enfors S.O., Neubauer P. Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch cultivations of *Escherichia coli* // *Biotechnology and bioengineering*. – 2001. – V. 73. – №. 5. – P. 347-357.
124. Li T., Liu M., Feng X., Wang Z., Das I., Xu Y., Zhou X., Sun Y., Guan K.L., Xiong Y., Lei Q.Y. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is activated by lysine 254 acetylation in response to glucose signal // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – V. 289. – №. 6. – P. 3775-3785.
125. Li Y., Cong H., Liu B., Song J., Sun X., Zhang, J., Yang Q. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methionine production by removing feedback inhibition and increasing NADPH level // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2016. – V. 109. – P. 1185-1197.
126. Lubitz D., Jorge J. M., Pérez-García F., Taniguchi H., Wendisch V. F. Roles of export genes *cgmA* and *lysE* for the production of L-arginine and L-citrulline by

- Corynebacterium glutamicum* // Applied microbiology and biotechnology. – 2016. – V. 100. – P. 8465-8474.
127. Luli G.W., Strohl W.R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations // Applied and environmental microbiology. – 1990. – V. 56. – №. 4. – P. 1004-1011.
128. Luo H., Hansen A.S.L., Yang L., Schneider K., Kristensen M., Christensen U., Christensen H.B., Du B., Özdemir E., Feist A.M., Keasling J.D., Jensen M.K., Herrgård M.J., Palsson B.O. Coupling S-adenosylmethionine-dependent methylation to growth: Design and uses // Plos biology. – 2019. – V. 17. – №. 3. – P. e2007050.
129. Macek B., Forchhammer K., Hardouin J., Weber-Ban E., Grangeasse C., Mijakovic I. Protein post-translational modifications in bacteria // Nature Reviews Microbiology. – 2019. – V. 17. – №. 11. – P. 651-664.
130. Majdalani N., Gottesman S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system // Annu. Rev. Microbiol. – 2005. – V. 59. – №. 1. – P. 379-405.
131. March J.C., Eiteman M.A., Altman E. Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli* // Applied and environmental microbiology. – 2002. – V. 68. – №. 11. – P. 5620-5624.
132. Marisch K., Bayer K., Scharl T., Mairhofer J., Krempl P.M., Hummel K., Razzazi-Fazeli E., Striedner G. A comparative analysis of industrial *Escherichia coli* K-12 and B strains in high-glucose batch cultivations on process-, transcriptome- and proteome level // PloS one. – 2013. – V. 8. – №. 8. – P. e70516.
133. Marshall C.J. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions // Science. – 1993. – V. 259. – №. 5103. – P. 1865-1866.
134. Meiswinkel T.M., Gopinath V., Lindner S.N., Nampoothiri K.M., Wendisch V.F. Accelerated pentose utilization by *Corynebacterium glutamicum* for

- accelerated production of lysine, glutamate, ornithine and putrescine // *Microbial biotechnology*. – 2013. – V. 6. – №. 2. – P. 131-140.
135. Metzgar D., Wills C. Evidence for the adaptive evolution of mutation rates // *Cell*. – 2000. – V. 101. – №. 6. – P. 581-584.
136. Meyer F., Keller P., Hartl J., Gröninger O.G., Kiefer P., Vorholt J.A. Methanol-essential growth of *Escherichia coli* // *Nature communications*. – 2018. – V. 9. – №. 1. – P. 1508.
137. Nakano K., Rischke M., Sato S., Märkl H. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor // *Applied microbiology and biotechnology*. – 1997. – V. 48. – P. 597-601.
138. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2003. – V. 67. – №. 4. – P. 593-656.
139. Ohnishi J., Mitsuhashi S., Hayashi M., Ando S., Yokoi H., Ochiai K., Ikeda M. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2002. – V. 58. – P. 217-223.
140. Okanishi H., Kim K., Masui R., Kuramitsu, S. Acetylome with structural mapping reveals the significance of lysine acetylation in *Thermus thermophilus* // *Journal of proteome research*. – 2013. – V. 12. – №. 9. – P. 3952-3968.
141. Paik W.K., Pearson D., Lee H.W., Kim S. Nonenzymatic acetylation of histones with acetyl-CoA // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. – 1970. – V. 213. – №. 2. – P. 513-522.
142. Pappolla M.A., Bryant-Thomas T.K., Herbert D., Pacheco J., Fabra Garcia M., Manjon M., Girones X., Henry T.L., Matsubara E., Zambon D., Wolozin B., Sano M., Cruz-Sanchez F.F., Thal L.J., Petanceska S.S., Refolo L.M. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology // *Neurology*. – 2003. – V. 61. – №. 2. – P. 199-205.
143. 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.
144. Pathak S.S., Sandhu S.S., Rajak R.C. Mutation studies on fungal glucoamylase: a review // Int. J. Pharma Bio Sci. – 2015. – V. 5. – №. 2. – P. 297-308.
145. Peebo K., Valgepea K., Maser A., Nahku R., Adamberg K., Vilu, R. Proteome reallocation in *Escherichia coli* with increasing specific growth rate // Molecular BioSystems. – 2015. – V. 11. – №. 4. – P. 1184-1193.
146. Peng B., Li H., Peng X. Proteomics approach to understand bacterial antibiotic resistance strategies // Expert Review of Proteomics. – 2019. – V. 16. – №. 10. – P. 829-839.
147. Pfeifer E., Gätgens C., Polen T., Frunzke J. Adaptive laboratory evolution of *Corynebacterium glutamicum* towards higher growth rates on glucose minimal medium // Scientific reports. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 16780.
148. Phillips D.M.P. The presence of acetyl groups in histones // Biochemical Journal. – 1963. – V. 87. – №. 2. – P. 258.
149. Phue J.N., Shiloach J. Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109) // Journal of biotechnology. – 2004. – V. 109. – №. 1-2. – P. 21-30.
150. Phue J.N., Noronha S.B., Hattacharyya R., Wolfe A.J., Shiloach J. Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses // Biotechnology and Bioengineering. – 2005. – V. 90. – №. 7. – P. 805-820.
151. Pinhal S., Ropers D., Geiselmann J., De Jong H. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate // Journal of bacteriology. – 2019. – V. 201. – №. 13. – P. 10.1128/jb.00147-19.
152. Plekhanova N.S., Altman I.B., Yurkova M.S., Fedorov A.N. The effects of Nε-acetylation on the enzymatic activity of *Escherichia coli*

- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2023. – V. 59. – №. 6. – P. 778-785.
153. Pontrelli S., Fricke R.C.B., Sakurai S.S.M., Putri S.P., Fitz-Gibbon S., Chung M., Wu H.Y., Chen Y.J., Pellegrini M., Fukusaki E., Liao J.C. Directed strain evolution restructures metabolism for 1-butanol production in minimal media // Metabolic engineering. – 2018. – V. 49. – P. 153-163.
154. Post D.M.B., Schilling B., Reinders L.M., D'Souza A.K., Ketterer M.R., Kiel S.J., Chande A.T., Apicella M.A., Gibson B.W. Identification and characterization of AckA-dependent protein acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* // PloS one. – 2017. – V. 12. – №. 6. – P. e0179621.
155. Qin T., Hu, X., Hu J., Wang X. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC13032 to produce L-methionine // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2015. – V. 62. – №. 4. – P. 563-573.
156. Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes // Drug resistance updates. – 2010. – V. 13. – №. 6. – P. 151-171.
157. Ren J., Sang Y., Lu J., Yao Y.F. Protein acetylation and its role in bacterial virulence // Trends in microbiology. – 2017. – V. 25. – №. 9. – P. 768-779.
158. Retanal C., Ball B., Geddes-McAlister J. Post-translational modifications drive success and failure of fungal–host interactions // Journal of Fungi. – 2021. – V. 7. – №. 2. – P. 124.
159. RiesenberG D., Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms // Applied microbiology and biotechnology. – 1999. – V. 51. – P. 422-430.
160. Rochet J.C. Novel therapeutic strategies for the treatment of protein-misfolding diseases // Expert reviews in molecular medicine. – 2007. – V. 9. – №. 17. – P. 1-34.
161. Rosenzweig R.F., Sharp R.R., Treves D.S., Adams J. Microbial evolution in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli* // Genetics. – 1994. – V. 137. – №. 4. – P. 903-917.

162. Ruiz N., Silhavy T.J. Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope // Current opinion in microbiology. – 2005. – V. 8. – №. 2. – P. 122-126.
163. Ryšlavá H., Doubnerová V., Kavan D., Vaněk O. Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly // Journal of proteomics. – 2013. – V. 92. – P. 80-109.
164. Ryu K., Kim K.H., Yoo S.Y., Lee E.Y., Lim K.H., Min M.K., Kim H., Choi S.I., Seong B.L. Production and characterization of active hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase // Protein expression and purification. – 2010. – V. 71. – №. 2. – P. 147-152.
165. SaiSree L., Reddy M., Gowrishankar J. IS 186 insertion at a hot spot in the lon promoter as a basis for Lon protease deficiency of *Escherichia coli* B: identification of a consensus target sequence for IS 186 transposition // Journal of bacteriology. – 2001. – V. 183. – №. 23. – P. 6943-6946.
166. Sano C. History of glutamate production // The American journal of clinical nutrition. – 2009. – V. 90. – №. 3. – P. 728S-732S.
167. Sauer U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes // Metabolic engineering. – 2001. – P. 129-169.
168. Schaechter M., View From Here Group. *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000: the view from here // EcoSal Plus. – 2004. – V. 1. – №. 1. – P. 10.1128/ecosalplus. 1.4.
169. Schilling B., Basisty N., Christensen D.G., Sorensen D., Orr J.S., Wolfe A.J., Rao C.V. Global lysine acetylation in *Escherichia coli* results from growth conditions that favor acetate fermentation // Journal of bacteriology. – 2019. – V. 201. – №. 9. – P. 10.1128/jb. 00768-18.
170. Schilling B., Christensen D., Davis R., Sahu A.K., Hu L.I., Walker-Peddakotla A., Sorensen D.J., Zemaitaitis B., Gibson B.W., Wolfe A.J. Protein acetylation dynamics in response to carbon overflow in *Escherichia coli* // Molecular microbiology. – 2015. – V. 98. – №. 5. – P. 847-863.

171. Schneider D., Duperchy E., Depeyrot J., Coursange E., Lenski R. E., Blot M. Genomic comparisons among *Escherichia coli* strains B, K-12, and O157: H7 using IS elements as molecular markers // BMC microbiology. – 2002. – V. 2. – P. 1-8.
172. Schröder S., Herker E., Itzen F., He D., Thomas S., Gilchrist D.A., Kaehlcke K., Cho S., Pollard K.S., Capra J.A., Schnölzer M., Cole P.A., Geyer M., Bruneau B.G., Adelman K., Ott M. Acetylation of RNA polymerase II regulates growth-factor-induced gene transcription in mammalian cells // Molecular cell. – 2013. – V. 52. – №. 3. – P. 314-324.
173. Sharma A.K., Mahalik S., Ghosh C., Singh A.B., Mukherjee K.J. Comparative transcriptomic profile analysis of fed-batch cultures expressing different recombinant proteins in *Escherichia coli* // AMB express. – 2011. – V. 1. – P. 1-12.
174. Shiloach J., Reshamwala S., Noronha S. B., Negrete A. Analyzing metabolic variations in different bacterial strains, historical perspectives and current trends—example *E. coli* // Current opinion in biotechnology. – 2010. – V. 21. – №. 1. – P. 21-26.
175. Shiloach J., Kaufman J., Guillard A. S., Fass R. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) and *Escherichia coli* JM109 // Biotechnology and bioengineering. – 1996. – V. 49. – №. 4. – P. 421-428.
176. Simic P., Sahn H., Eggeling L. L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum* // Journal of bacteriology. – 2001. – V. 183. – №. 18. – P. 5317-5324.
177. Smith K., Shen F., Lee H.J., Chandrasekaran S. Metabolic signatures of regulation by phosphorylation and acetylation // Iscience. – 2022. – V. 25. – №. 1.
178. Srinivasan G., James C.M., Krzycki J.A. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA // Science. – 2002. – V. 296. – №. 5572. – P. 1459-1462.

179. Starai V.J., Escalante-Semerena J.C. Identification of the protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica* // Journal of molecular biology. – 2004. – V. 340. – №. 5. – P. 1005-1012.
180. Starai V.J., Celic I., Cole R.N., Boeke J.D., Escalante-Semerena J.C. Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine // Science. – 2002. – V. 298. – №. 5602. – P. 2390-2392.
181. Striedner G., Pfaffenzeller I., Markus L., Nemecek S., Grabherr R., Bayer K. Plasmid-free T7-based *Escherichia coli* expression systems // Biotechnology and bioengineering. – 2010. – V. 105. – №. 4. – P. 786-794.
182. Studier F.W., Daegelen P., Lenski R.E., Maslov S., Kim, J.F. Understanding the differences between genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3) and comparison of the *E. coli* B and K-12 genomes // Journal of molecular biology. – 2009. – V. 394. – №. 4. – P. 653-680.
183. Studier F.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes // Methods Enzymol. – 1998. – V. 185. – P. 305-313.
184. Suenaga R., Tomonaga S., Yamane H., Kurauchi I., Tsuneyoshi Y., Sato H., Denbow D.M., Furuse M. Intracerebroventricular injection of L-arginine induces sedative and hypnotic effects under an acute stress in neonatal chicks // Amino acids. – 2008. – V. 35. – P. 139-146.
185. Sun L., Yao Z., Guo Z., Zhang L., Wang Y., Mao R., Lin Y., Fu Y., Lin X. Comprehensive analysis of the lysine acetylome in *Aeromonas hydrophila* reveals cross-talk between lysine acetylation and succinylation in LuxS // Emerging Microbes & Infections. – 2019. – V. 8. – №. 1. – P. 1229-1239.
186. Sun M., Guo H., Lu G., Gu J., Wang X., Zhang X. E., Deng J. Lysine acetylation regulates the activity of *Escherichia coli* S-adenosylmethionine synthase // Acta biochimica et biophysica Sinica. – 2016. – V. 48. – №. 8. – P. 723-731.

187. Tatarko M., Romeo T. Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli* // Current Microbiology. – 2001. – V. 43. – P. 26-32.
188. Tatum E.L., Lederberg J. Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli* // Journal of bacteriology. – 1947. – V. 53. – №. 6. – P. 673-684.
189. Thao S., Escalante-Semerena J.C. A positive selection approach identifies residues important for folding of *Salmonella enterica* Pat, an N ϵ -lysine acetyltransferase that regulates central metabolism enzymes // Research in microbiology. – 2012. – V. 163. – №. 6-7. – P. 427-435.
190. Thao S., Chen C.S., Zhu H., Escalante-Semerena J.C. N ϵ -Lysine Acetylation of a Bacterial Transcription Factor Inhibits Its DNA-Binding Activity // PloS one. – 2010. – V. 5. – №. 12. – P. e15123.
191. Thyer R., Shroff R., Klein D.R., d'Oelsnitz S., Cotham V.C., Byrom M., Brodbelt J.S., Ellington A.D. Custom selenoprotein production enabled by laboratory evolution of recoded bacterial strains // Nature biotechnology. – 2018. – V. 36. – №. 7. – P. 624-631.
192. Tong C., Liang, Y., Zhang Z., Wang S., Zheng X., Liu Q., Song B. Review of knockout technology approaches in bacterial drug resistance research // PeerJ. – 2023. – V. 11. – P. e15790.
193. Tucker A.C., Escalante-Semerena J.C. Acetoacetyl-CoA synthetase activity is controlled by a protein acetyltransferase with unique domain organization in *Streptomyces lividans* // Molecular microbiology. – 2013. – V. 87. – №. 1. – P. 152-167.
194. Valgepea K., Adamberg K., Nahku R., Lahtvee P.J., Arike L., Vilu R. Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase // BMC systems biology. – 2010. – V. 4. – P. 1-13.
195. VanDrisse C.M., Escalante-Semerena J.C. Protein acetylation in bacteria // Annual review of microbiology. – 2019. – V. 73. – №. 1. – P. 111-132.

196. Varma A., Palsson B.O. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110 // Applied and environmental microbiology. – 1994. – V. 60. – №. 10. – P. 3724-3731.
197. Ventura M., Mateo F., Serratosa J., Salaet I., Carujo S., Bachs O., Pujol M.J. Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated by acetylation // The international journal of biochemistry & cell biology. – 2010. – V. 42. – №. 10. – P. 1672-1680.
198. Vetting M.W., Magnet S., Nieves E., Roderick S. L., Blanchard J.S. A bacterial acetyltransferase capable of regioselective N-acetylation of antibiotics and histones // Chemistry & biology. – 2004. – V. 11. – №. 4. – P. 565-573.
199. Vogt M., Haas S., Klaffl S., Polen T., Eggeling L., van Ooyen J., Bott M. Pushing product formation to its limit: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction // Metabolic engineering. – 2014. – V. 22. – P. 40-52.
200. Waegeman H., Soetaert W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2011. – V. 38. – №. 12. – P. 1891-1910.
201. Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Gatto Jr G.J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications // Angewandte Chemie International Edition. – 2005. – V. 44. – №. 45. – P. 7342-7372.
202. Wang Q., Zhang Y., Yang C., Xiong H., Lin Y., Yao J., Li H., Xie L., Zhao W., Yao Y., Ning Z.B., Zeng R., Xiong Y., Guan K.L., Zhao S., Zhao G.P. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux // Science. – 2010. – V. 327. – №. 5968. – P. 1004-1007.
203. Wang Z., Chan S.H.J., Sudarsan S., Blank L.M., Jensen P.R., Solem C. Elucidation of the regulatory role of the fructose operon reveals a novel target for enhancing the NADPH supply in *Corynebacterium glutamicum* // Metabolic engineering. – 2016. – V. 38. – P. 344-357.

204. Weinert B.T., Iesmantavicius V., Wagner S.A., Schölz C., Gummesson B., Beli P., Nyström T., Choudhary C. Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli* // *Molecular cell*. – 2013. – V. 51. – №. 2. – P. 265-272.
205. Weinert B.T., Iesmantavicius V., Moustafa T., Schölz C., Wagner S.A., Magnes C., Zechner R., Choudhary C. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular systems biology*. – 2014. – V. 10. – №. 1. – P. 716.
206. Weinert B.T., Iesmantavicius V., Moustafa T., Schölz C., Wagner S.A., Magnes C., Zechner R., Choudhary C. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular Systems Biology*. – 2015. – V. 11. – №. 10. – P. 833.
207. Wolfe A.J. The acetate switch // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2005. – V. 69. – №. 1. – P. 12-50.
208. Duan Y., Zhao Y., Zhu Q., Cai Q., Li H., Yin Y., Wang Z., Kong X. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production // *Livestock science*. – 2007. – V. 112. – №. 1-2. – P. 8-22.
209. Xia L., Kong X., Song H., Han Q., Zhang S. Advances in proteome-wide analysis of plant lysine acetylation // *Plant Communications*. – 2022. – V. 3. – №. 1.
210. Xie X., Xu L., Shi J., Xu Q., Chen N. Effect of transport proteins on L-isoleucine production with the L-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – V. 39. – №. 10. – P. 1549-1556.
211. Xu H., Zhou Z., Wang C., Chen Z., Cai H. Enhanced succinic acid production in *Corynebacterium glutamicum* with increasing the available NADH supply and glucose consumption rate by decreasing H⁺-ATPase activity // *Biotechnology Letters*. – 2016. – V. 38. – P. 1181-1186.
212. Yao X.Z., Shen W.H. Crucial function of histone lysine methylation in plant reproduction // *Chinese Science Bulletin*. – 2011. – V. 56. – P. 3493-3499.

213. Yao Z., Guo Z., Wang Y., Li W., Fu Y., Lin Y., Lin X. Integrated succinylome and metabolome profiling reveals the crucial role of s-ribosylhomocysteine lyase in quorum sensing and metabolism of *aeromonas hydrophila* // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2019. – V. 18. – №. 2. – P. 200-215.
214. Yoon S.H., Han M.J., Jeong H., Lee C.H., Xia X.X., Lee D.H., Shim J.H., Lee S.Y., Oh T.K., Kim J.F. Comparative multi-omics systems analysis of *Escherichia coli* strains B and K-12 // *Genome biology*. – 2012. – V. 13. – P. 1-13.
215. Yu S., Zhao Q., Miao X., Shi J. Enhancement of lipid production in low-starch mutants *Chlamydomonas reinhardtii* by adaptive laboratory evolution // *Bioresource technology*. – 2013. – V. 147. – P. 499-507.
216. Zhang H., Zhao Y., Zhou D.X. Rice NAD⁺-dependent histone deacetylase OsSRT1 represses glycolysis and regulates the moonlighting function of GAPDH as a transcriptional activator of glycolytic genes // *Nucleic acids research*. – 2017. – V. 45. – №. 21. – P. 12241-12255.
217. Zhang J., Sprung R., Pei J., Tan X., Kim S., Zhu, H., Zhao Y. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli* // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2009. – V. 8. – №. 2. – P. 215-225.
218. Zhang Q.F., Gu J., Gong P., Wang X.D., Tu S., Bi L.J., Yu Z.N., Zhang Z.P., Cui Z.Q., Wei H.P., Tao S.C., Zhang X.E., Deng J.Y. Reversibly acetylated lysine residues play important roles in the enzymatic activity of *Escherichia coli* N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase // *The FEBS journal*. – 2013. – V. 280. – №. 9. – P. 1966-1979.
219. Zhang Y., Song L., Liang W., Mu P., Wang S., Lin Q. Comprehensive profiling of lysine acetylproteome analysis reveals diverse functions of lysine acetylation in common wheat // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 21069.
220. Zhao K., Chai X., Marmorstein R. Structure and substrate binding properties of PobB, a Sir2 homolog protein deacetylase from *Escherichia coli* // *Journal of molecular biology*. – 2004. – V. 337. – №. 3. – P. 731-741.