

МАЛЫХ ЕВГЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью
обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях
сверхсинтеза L-гистидина.**

1.5.7 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в Лаборатории №4 Акционерного Общества «научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»)

Научный руководитель:

Стойнова Наталия Викторовна,
кандидат биологических наук, доцент,
директор по науке АО «АГРИ», г. Москва

Научный консультант:

Лившиц Виталий Аркадьевич,
доктор биологических наук, профессор,
научный консультант АО «АГРИ», г. Москва

Официальные оппоненты:

Синеокий Сергей Павлович,
доктор биологических наук, профессор, руководитель Курчатовского
комплекса генетических исследований, БРЦ ВКПМ Федерального
государственного бюджетного учреждения "Национальный
исследовательский центр "Курчатовский институт", г. Москва

Карпов Дмитрий Сергеевич,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории
регуляции внутриклеточного протеолиза Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в __ часов на заседании
диссертационного совета 24.1.088.01 в Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки Институте общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской
академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте
Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Горячева И.И.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы

В настоящее время незаменимая аминокислота L-гистидин (*L*- α -амино- β -имидазоллилпропионовая кислота; далее гистидин, или ГИС) находит всё более широкое применение в медицине, сельском хозяйстве фармацевтической и пищевой промышленности (DiNicolantonio et al., 2018, Holeċek, 2020, Хлыбова и Циркин, 2006; Rao et al., 2018; Suzuki et al., 2006; Derave et al., 2010; Smolik et al., 2010; Kanarek et al., 2018).

ГИС получают путем микробного синтеза из сахаров. На сегодняшний день известен ряд промышленных штаммов - продуцентов ГИС на основе *Corynebacterium glutamicum*, *Serratia marcescens* и *Escherichia coli* (Ikeda, 2003, Araki and Nakayama, 1975, Kulis-Horn, 2014, Клячко и др., 1998). Промышленное получение ГИС представляет значительный коммерческий интерес; данная аминокислота остается одной из самых дорогостоящих на мировом рынке.

Таким образом, конструирование высокопродуктивных штаммов создаст возможность для увеличения производства ГИС и снижения его цены, что расширит его доступность для применения в различных областях медицины, промышленности и сельского хозяйства.

Актуальным является поиск новых подходов к созданию на основе *E. coli* эффективных штаммов - продуцентов данной аминокислоты. Как известно, биосинтез ГИС является АТФ-зависимым процессом. При этом, АТФ используется в биосинтезе ГИС не только как источник энергии, но и как субстрат ключевой реакции. В процессе биосинтеза ГИС молекула АТФ как нуклеотид аденина целиком выводится из клеточного пула с образованием 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотида (АИКАР). АИКАР является побочным продуктом пути биосинтеза ГИС, предшественником пуринов, сигналом стресса и глобальным клеточным регулятором. Важной задачей является обнаружение новых мишеней АИКАР, влияющих на биосинтез ГИС, рециркуляция АИКАР в нуклеотиды аденина и поиск новых подходов к обеспечению клеток *E. coli* аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза этой аминокислоты.

1.2. Цели и задачи работы

Целью настоящей работы являлись:

1. Поиск новых мишеней регуляторного воздействия АИКАР, усиление его превращения в нуклеотиды аденина.

2. Изучение новых подходов к обеспечению клеток *Escherichia coli* аденозинтрифосфатом в условиях сверхпродукции L-гистидина.

Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

- Исследовать роль АИКАР в биосинтезе L-гистидина. Повысить конверсию АИКАР в нуклеотиды аденина в условиях сверхсинтеза данной аминокислоты.

- Усилить экспрессию оперонов, кодирующих комплексы дыхательной цепи *E. coli*. Изучить влияние на продукцию L-гистидина мутантной NADH: убихинон оксидоредуктазы I (NDH-1), способной генерировать протон-движущую силу за счёт окисления как NADH, так и NADPH.

- Экспрессировать ген мембранной H^+ -пирофосфатазы *Rhodospirillum rubrum* в клетках *E. coli* и оценить возможности её функционирования в качестве единственной пирофосфатазы. Изучить влияние экспрессии гена мембранной H^+ -пирофосфатазы на сверхсинтез L-гистидина.

1.3. Научная новизна и практическая ценность работы

В настоящей диссертационной работе впервые показано, что у *E. coli* побочный продукт биосинтеза гистидина, АИКАР, подавляет активность ключевого фермента пути биосинтеза, АТФ-фосфорибозилтрансферазы (АТФ-ФРТ). Получены также данные, свидетельствующие о том, что АИКАР негативно влияет на индукцию *rho*-регулона, контролирующего усвоение фосфора. Таким образом, установлены новые мишени для АИКАР, воздействуя на которые это соединение может снижать сверхсинтез ГИС. С другой стороны, подтверждается роль АИКАР как глобального регулятора.

Для повышения сверхсинтеза ГИС на основе ранее описанного штамма-продуцента ГИС *E. coli* KF37 был получен штамм, способный к увеличенному накоплению указанной аминокислоты. С этой целью осуществлена сверхэкспрессия генов *purH* и *purA*, выводящая АИКАР из клеточного пула и превращающая его в нуклеотиды аденина. Впервые обнаружено положительное влияние на продукцию ГИС инактивации транспортера PitA, переносящего

неорганический фосфат в комплексе с двухвалентными катионами металлов ($Me^{2+}-P_i$) в клетку и из клетки.

Показано, что увеличение в хромосоме *E. coli* числа копий *atp* и *nuo* оперонов, кодирующих H^+ -АТФ-синтазу и NADH:убихинон-оксидоредуктазу I (NDH-1), соответственно, может стимулировать накопление биомассы и/или скорость роста культуры как при высокой, так и при низкой аэрации.

Были сконструированы штаммы *E. coli*, содержащие мутацию *nuoF*^{E183A}, придающую NDH-1 способность окислять как NADH, так и NADPH, что в свою очередь позволит задействовать в процессе образования протон-движущей силы, необходимой для регенерации АТФ, избыточный NADPH, образующийся при синтезе целевого соединения. Показано, что эта мутация повышает продукцию ГИС штаммом-продуцентом.

Впервые продемонстрирована возможность замены в клетках *E. coli* гена жизненно необходимой цитоплазматической пирофосфатазы на ген мембранной пирофосфатазы *hprpA*^{Rtu} из *R. rubrum*. Такая замена в штамме - продуценте ГИС на 30% увеличила накопление аминокислоты.

Полученные данные нашли практическое применение при создании промышленного продуцента ГИС и могут быть использованы при конструировании продуцентов биологически активных веществ, синтез которых сопровождается высоким потреблением АТФ.

Достоверность полученных в настоящей работе результатов обеспечена осуществлением всех экспериментов современными методами исследований и статистики.

1.4. Положения, выносимые на защиту

1. У *E. coli* активность ключевого фермента биосинтеза ГИС АТФ-фосфорибозилтрансферазы и индукция *rho*-регулона подавляются образующимся в процессе биосинтеза данной аминокислоты побочным продуктом – 5-аминоимдазол-4-карбоксамидрибонуклеотидом (АИКАР).

2. Следующие факторы оказывают у *E. coli* положительное влияние на сверхсинтез ГИС:

- сверхэкспрессия генов *purH* и *purA*, превращающих АИКАР в нуклеотиды аденина;
- инактивация *PitA*, транспортера, переносящего неорганический фосфат в комплексе с двухвалентными катионами ($Me^{2+}-P_i$) в клетку и из клетки;

- ранее описанная мутация *nuoF*^{E183A}, придающая NAD(P)H: убихинон оксидоредуктазе I способность окислять как NADH, так и NADPH.

- делеция гена *yjjK* (*ettA*), кодирующего белок EttA, который регулирует процесс трансляции в зависимости от соотношения АДФ/АТФ в клетке.

3. В клетках *E. coli* возможна замена гена цитоплазматической пирофосфатазы, существенного для жизнедеятельности, на ген мембранной пирофосфатазы *Rhodospirillum rubrum*. Такая замена в штамме - продуценте ГИС на 30% увеличила накопление аминокислоты.

Публикации и апробации работы

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из них 1 в журнале, рекомендованном ВАК, 2 патента, 1 патентная заявка. Материалы диссертации были представлены на VIII Российском Симпозиуме «Белки и пептиды», 18–22 сентября 2017, Москва, Россия; на 5-ой Конференции по прикладной системной биологии, 2-5 ноября 2020. Делфт, Нидерланды (OnLine); на Международной конференции «Метаболическая инженерия 14», July 11-15 июля, 2021. Гонолулу, США (OnLine). Апробация работы проводилась на межлабораторном семинаре АО «Научно-исследовательского Института Аджиномото-Генетика».

Структура и объем работы

Диссертация состоит из 7 разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Работа изложена на 163 страницах, включая 39 рисунков и 19 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 300 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходные штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в

Таблице 1:

Штамм или плаزمида	Генотип, характеристика	Источник
Штаммы		
MG1655	F ⁻ , <i>ilvG</i> , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	ВКИМ; Blattner et al., 1997
BW25113	<i>rrnB3</i> , Δ <i>lacZ</i> 4787, <i>hsdR514</i> , Δ (<i>araBAD</i>)567, Δ (<i>rha-BAD</i>)568, <i>rph-1</i>	Datsenko and Wanner, 2000
KF37	MG1655 ⁺ Δ <i>purR</i> <i>Phis</i> - Δ <i>hisL</i> <i>hisG</i> ^{R(E271K)} <i>DCBHAFI</i> – продуцент гистидина	Дорошенко и соавт., 2013
Штамм или плазмида	Генотип, характеристика	Источник
MG1655 Δ <i>purR</i> ::Cm ^R	MG1655 <i>E. coli</i> K-12, but Δ <i>purR</i> :: λ <i>attR-cat-λattL</i>	Лабораторная коллекция
BW25113 Δ <i>purH</i> ::Km ^R	<i>lacI</i> ^q <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{АН33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78} , Δ <i>purH</i> :: <i>FRT-kan-FRT</i>	Baba et al., 2006
MG1655 Δ (ϕ 80- <i>attB</i>)	MG1655 с делецией природного (ϕ 80- <i>attB</i>) сайта	Minaeva et al., 2008
MG1655 Δ (ϕ 80- <i>attB</i>) IS 5.11:: ϕ 80- <i>attB</i>	MG1655 с делецией природного (ϕ 80- <i>attB</i>) сайта и искусственным <i>attB</i> сайтом в локусе IS 5.11	Minaeva et al., 2008
MG1655 Δ (ϕ 80- <i>attB</i>) IS5.8:: ϕ 80- <i>attB</i>	MG1655 с делецией природного (ϕ 80- <i>attB</i>) сайта и искусственным <i>attB</i> сайтом в локусе IS5.8	Minaeva et al., 2008
Плазмиды		
pKD46	<i>oriR101</i> , <i>repA101ts</i> , <i>araC</i> , <i>P_{araB}</i> -[γ , β , <i>exo</i> of phage λ], Ap ^R	Datsenko, Wanner, 2000
pMWts- λ Int/Xis	<i>oriR101</i> , <i>repA101ts</i> , λ <i>CIts857</i> , λ P _R → λ <i>xis-int</i> , Ap ^R	Minaeva et al., 2008
pET15b	Ap ^R , pBR322 origin, <i>P_{lacI-lacI}</i> , and T7 promoter/ <i>O_{lac}</i> , His6-Tag, T7 терминатор	«Novagen» (США)
pMW118-Km ^R	<i>oriR101</i> , <i>repA</i> , MCS, Ap ^R , λ <i>attR-kan-λattL</i> , Km ^R	Datsenko, Wanner, 2000
pMW118-Cm ^R	<i>oriR101</i> , <i>repA</i> , MCS, Ap ^R , λ <i>attR-kan-λattL</i> , Cm ^R	Datsenko, Wanner, 2000
пАН123	<i>oriR101</i> , <i>repA101ts</i> , λ <i>CIts857</i> , λ P _R → ϕ 80- <i>int</i> , Ap ^R	Haldimann and Wanner, 2001
пАН162-Tc ^R -2Ter	<i>attP phi80</i> , пАН162, λ <i>attL-tetA-tetR-λattR</i>	Gene Bank AY048738; Minaeva et al., 2008
pGL2-atp	<i>attP phi80</i> , pGL2, pSC101, CmR	Hook et al., 2016

Штаммы *E. coli* культивировали аэробно на полноценной или минимальной средах при 37°C. В качестве полноценной использовали среду LB, в качестве минимальной – среду M9 с глюкозой (Miller, 1972), а также среду MOPS. Для культивирования продуцентов ГИС использовалась специальная ферментационная среда с глюкозой в качестве источника углерода.

Генетические манипуляции, рестрикцию, лигирование, электрофорез ДНК в геле 0,8% агарозы, электротрансформацию клеток *E. coli*, а также ДНК-ДНК гибридизацию по Саузерну осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами (Miller, 1972; Sambrook and Russel, 2001) и рекомендациями компаний – производителей. Выделение плазмидной ДНК проводили, используя Qiaprep spin kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Геномная ДНК выделялась набором «Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA).

Определение нуклеотидной последовательности проводили в лаборатории «Евроген» (Россия) на коммерческой основе. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного пакета DNASTAR SeqMan и банка данных NCBI. Введение генетических модификаций в хромосому *E. coli* с помощью λ Red-зависимой системы рекомбинации проводили по методике (Datsenko and Wanner, 2000). Для удаления маркера устойчивости к антибиотикам, фланкированного *attL* и *attR* сайтами фага λ из хромосомы *E. coli*, штаммы трансформировали с помощью электропорации хелперной плазмидой pMW- λ Int/Xis, обеспечивающей экспрессию генов сайт-специфической рекомбинации фага λ (Minaeva et al., 2008).

Φ 80-зависимая интеграция двухцепочечных фрагментов ДНК в хромосому *E. coli* осуществлялась при помощи хелперной плазмиды pAN123, содержащей ген ϕ 80-Int интегразы фага ϕ 80 (Haldimann and Wanner, 2001).

Получение препарата мембранных везикул *E. coli* и измерение активности NADH: убихинон оксидоредуктазного комплекса осуществляли по описанной методике (Noda et al., 2006).

Ферментативную активность АТФ-ФРТ (HisG) и начальную скорость прямой фосфорибозилтрансферазной реакции измеряли путем мониторинга образования фосфорибозил-АТФ (ФР-АТФ, $\epsilon_{290}=3600/\text{M}/\text{cm}$) (Ames et al., 1961) в присутствии неорганической пирофосфатазы *E. coli* (Sigma-Aldrich, США). Ферментативную активность щелочной фосфатазы *E. coli* PhoA измеряли по известной методике (Brickman and Beckwith, 1975) с модификациями.

Ферментативную активность неорганической растворимой пирофосфатазы PPase *E. coli* измеряли по описанной методике (Heinonen and Lahti, 1981) с модификациями. Ферментативную активность мембранной H^+ -пирофосфатазы из *R. rubrum* в мембранных везикулах определяли с помощью коммерчески доступного набора PiPer™ (Molecular Probes, США).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Поиск новых мишеней для АИКАР в клетках *E. coli* и превращения его в нуклеотиды аденина для повышения продукции гистидина.

1.1. Ингибирование АТФ-ФРТ побочным продуктом пути биосинтеза гистидина - АИКАР как механизм контроля образования гистидина в клетках *E. coli*.

Синтез каждой молекулы ГИС сопровождается образованием одной молекулы АИКАР, который одновременно является интермедиатом биосинтеза пуриновых нуклеотидов (Рисунок 1). Учитывая определённое структурное сходство между АИКАР и АМФ, можно предположить, что образующийся АИКАР, так же как и АМФ, выступает в роли конкурентного ингибитора первого фермента пути биосинтеза – АТФ-ФРТ (HisG), регулируя тем самым и свой собственный синтез.

Была измерена ферментативная активность двух очищенных His₆-меченных (НТ) белков АТФ-ФРТ: дикого типа (НТ-АТФ-ФРТ) и мутантного, устойчивого к ретроингибированию (НТ-АТФ-ФРТ^{E271K}), в присутствии АМФ (Таблица 2) или АИКАР (Таблица 3).

Таблица 2 – Ферментативная активность очищенного белка дикого типа НТ-АТФ-ФРТ в присутствии АМФ.

Фермент	Активность НТ-АТФ-ФРТ, мкмоль/мин/мг			Ингибирование, %	
	АМФ				
	-	1 мМ	20 мМ	1 мМ	20 мМ
НТ-АТФ-ФРТ	184 ± 9	195 ± 1	120 ± 15	0	35

Представлены усредненные результаты 6 независимых экспериментов.

Активность АТФ-ФРТ дикого типа подавлялась при высокой концентрации АМФ и не подавлялась при низкой, близкой к физиологической, концентрации АМФ (1 мМ) (Таблица 2), что согласуется с литературными данными (Tebar and Ballesteros, 1976; Bennet et al., 2009).

Предположение о том, что АИКАР ингибирует АТФ-ФРТ, было подтверждено экспериментально. Выяснилось, что уровень ингибирования оказался даже более значительным для мутантного фермента АТФ-ФРТ^{E271K} (Таблица 3). Более того, ингибирование АИКАР наблюдалось при низких его концентрациях (0,5÷1 мМ), при которых ингибирование АМФ отсутствовало (Таблицы 2, 3).

Таблица 3 – Ферментативная активность очищенных белков дикого (НТ-АТФ-ФРТ) и мутантного типа (НТ-АТФ-ФРТ^{E271K}) в присутствии АИКАР.

Фермент	Активность НТ-АТФ-ФРТ, мкмоль/мин/мг			Ингибирование, %	
	АИКАР				
	-	0,5 мМ	1 мМ	0,5 мМ	1 мМ
НТ-АТФ-ФРТ	184±9	151±9	120±5	18	35
НТ-АТФ-ФРТ ^{E271K}	120±1	67±4	58±8	44	52

Представлены усредненные результаты 6 независимых экспериментов.

Таким образом, впервые было показано, что биосинтез ГИС регулируется не только гистидином – конечным продуктом, но также АИКАР. Это означает, что образование самого АИКАР негативно регулируется на самом первом этапе биосинтеза ГИС (Рисунок 1).

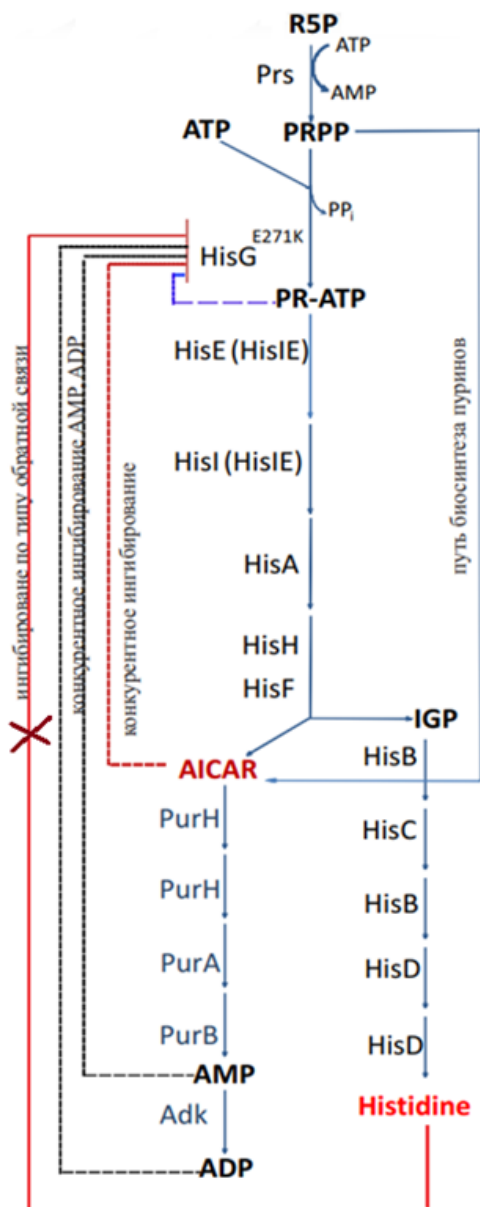


Рисунок 1 – Путь биосинтеза гистидина в клетках *E. coli*, его связь с биосинтезом пуринов и регуляция активности АТФ-ФРТ.

R5P, рибозо-5-фосфат; PRPP, фосфорибозил пирофосфат; PR-АТФ, фосфорибозил-АТФ; PP_i, неорганический пирофосфат; АИКАР, 5-аминоимдазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид; AMP, аденозинмонофосфат; ADP, аденозиндифосфат; АТФ, аденозин трифосфат; IGP, имдазол глицеролфосфат; Histidine, L-гистидин; Prs, рибозо-фосфат дифосфокиназа; HisG^{E271K}, устойчивый к ретроингибированию фермент АТФ-ФРТ; HisIE, бифункциональный фермент фосфорибозил-АТФ пирофосфатаза/ фосфорибозил-АМФ циклогидролаза; HisA, фосфорибозилформимино-5-аминоимдазол карбоксамид рибонуклеотид изомеразы; HisHF, имдазолглицеринфосфат синтаза; HisB, бифункциональный фермент имдазол-глицеринфосфат дегидрогеназа/гистидинол-фосфатаза; HisC, гистидинол-фосфат аминотрансфераза; HisD, бифункциональный фермент гистидинол/гистидиналь денидрогеназа; PurH, бифункциональный фермент АИКАР трансформилаза/ИМФ циклогидролаза; PurA, аденилосукцинат синтаза; PurB, аденилосукцинат лиаза; Adk, аденилат киназа; Ингибирование HisG обозначено: гистидином – сплошной красной, PR-АТФ – синей, АМФ и АДФ - штриховой черной, АИКАР - штриховой красной линиям.

Известно, что АМФ ингибирует ферментативную активность АТФ-ФРТ, конкурируя с одним из его природных субстратов, АТФ. Можно было предположить, что подавление активности фермента молекулами АИКАР происходит по тому же механизму, что и ингибирование молекулами АМФ (конкурентное ингибирование). Данное предположение было подтверждено при построении графиков в координатах Лайнуивера-Берка. При этом уровень ингибирования АИКАР выше, чем АМФ (Рисунок 2).

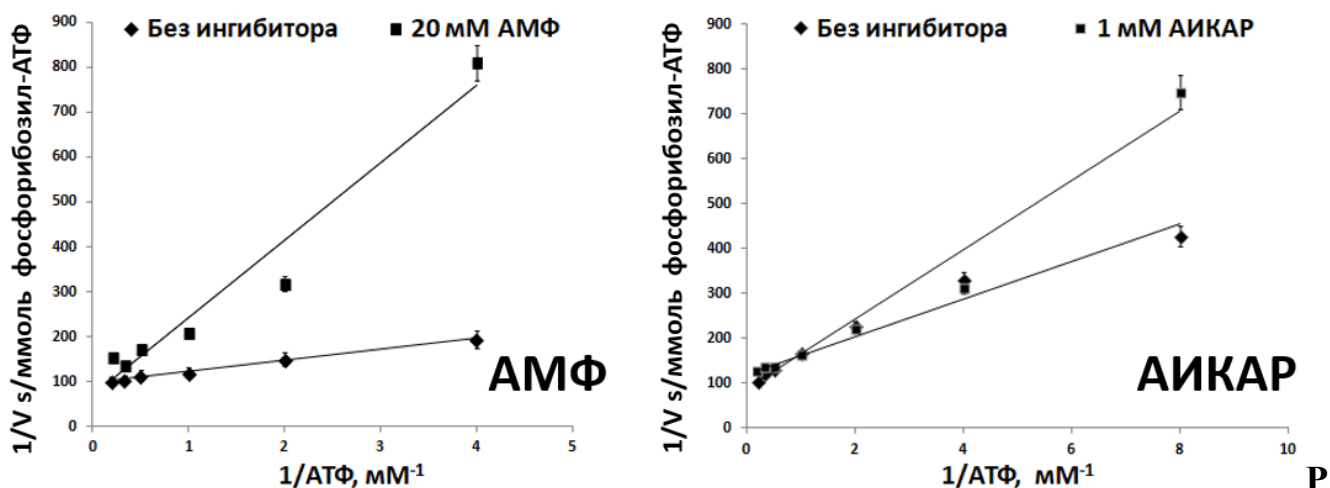


Рисунок 2 – График Лайнуивера-Берка. Ингибирование фермента дикого типа НТ-АТФ-ФРТ в присутствии АМФ и в присутствии АИКАР.

1.2. Усиление превращения АИКАР в нуклеотиды аденина и инактивация гена *pitA*, кодирующего транспортер комплексов фосфата с двухвалентными катионами металлов, приводят к увеличению продукции гистидина.

Как следует из приведенных выше результатов, продукция аминокислоты ГИС непосредственно регулируется АИКАР – побочным продуктом его биосинтеза и интермедиатом пуринового пути. Поэтому выведение АИКАР из клеточного пула с одновременным превращением его в нуклеотиды аденина, а также последующая регенерация АТФ являются важной задачей для обеспечения сверхсинтеза ГИС (Рисунок 1).

В процессе её решения, на основе ранее описанного продуцента этой аминокислоты *E. coli* KF37 (MG1655⁺ *hisG*^{E271K} *DCBHAFI* *P_{his}-ΔhisL'* *ΔpurR*, Дорошенко и соавт., 2013), был получен новый штамм EA83 с повышенной продукцией ГИС. Стратегия конструирования включала в себя повышение уровня

синтеза отдельных ферментов, преобразующих АИКАР в АМФ, – АИКАР трансформилазы/ИМФ циклогидролазы (PurH) и аденилсукцинат-синтазы (PurA) за счёт усиления экспрессии соответствующих генов.

Для усиления транскрипции гена *purA*, была получена экспрессионная кассета IS5.11::Cm^R-P_{tac21}-*purA*. Для проверки эффекта от увеличения экспрессии *purA* на синтез ГИС, полученная генетическая конструкция IS5.11::Cm^R-P_{tac21}-*purA* была интегрирована на более раннем этапе в геном различных модельных штаммов-продуцентов ГИС, сконструированных на основе штамма дикого типа *E. coli* MG1655. Один из таких Cm-устойчивых штаммов, который впоследствии подвергался нескольким этапам отбора методом традиционной селекции с целью увеличения продукции ГИС, использовали в данном исследовании в качестве донора для переноса трансдукцией кассеты IS5.11::Cm^R-P_{tac21}-*purA* в реципиентный штамм KF37 – ранее охарактеризованный продуцент ГИС (Дорошенко с соавт., 2013).

Надо отметить, что в ходе данного эксперимента, были исходно отобраны две группы трансдуктантов в соответствии с их способностью накапливать ГИС в ферментационной среде. Основная группа трансдуктантов (более 70% от всех проанализированных клонов) накапливала в среднем на 20% больше ГИС по сравнению с уровнем его накопления исходным штаммом KF37. Один из таких трансдуктантов был обозначен как штамм EA79. Минорная группа трансдуктантов (менее 30% от всех проверенных клонов) также демонстрировала повышенное накопление продукта по сравнению с исходным штаммом KF37, однако это значение не превышало 6% (Таблица 4).

Таблица 4 – Влияние сверхэкспрессии гена *purA* на продукцию ГИС в зависимости от *pitA* аллеля.

Штамм	<i>pitA</i> аллель	ОП ₅₅₀	ГИС	
			г/л	%
KF37	<i>pitA</i> ⁺	14,9 ± 0,4	3,3 ± 0,1	100
KF37 IS5.11::Cm ^R -P _{tac21} - <i>purA</i> , <i>pitA</i> ⁺	<i>pitA</i> ⁺	16,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	106
KF37 IS5.11::Cm ^R -P _{tac21} - <i>purA</i> <i>pitA</i> ⁻ (EA79)	<i>pitA</i> ⁻	15,6 ± 0,4	4,0 ± 0,1	121

Культивирование в пробирках на среде, содержащей 5% глюкозы; приведены усредненные результаты 4-6 независимых экспериментов.

В результате полногеномного секвенирования было установлено, что данный феномен можно объяснить наличием нонсенс мутации, приводящей к инактивации гена *pitA*, который тесно сцеплен с точкой интеграции *purA*-содержащей кассеты в исходном штамме-доноре, а также в полученных трансдуктантах, продуцирующих большее количество ГИС. Тем самым было обнаружено, что инактивация гена *pitA*, кодирующего низкоаффинный транспортёр фосфатов двухвалентных металлов ($Me^{2+}-P_i$) в клетку и из клетки, приводила к увеличению синтеза ГИС. Более подробный анализ эффекта инактивации PitA на синтез ГИС и метаболизм P_i у *E. coli* изложен ниже в п. 1.3.

Таким образом, сверхэкспрессия гена *purA* приводит к увеличению накопления ГИС на 6% (а в комбинации с инактивацией транспортной системы PitA – на 20%).

Для последующего усиления конверсии АИКАР в АМФ, осуществляли сверхэкспрессию гена *purH*. С этой целью была получена экспрессионная кассета P_L-purH , где природная регуляторная область гена была заменена на «сильный» конститутивный промотор P_L бактериофага λ ; кассету интегрировали в геном полученного на предыдущем этапе штамма EA79 (Таблица 4). Очевидное увеличение уровня синтеза PurH у полученного штамма EA83 приводило к повышению продукции ГИС на 6% (данные в автореферате не приведены).

Таким образом, эффективное превращение АИКАР в нуклеотиды аденина, обеспеченное сверхэкспрессией генов *purA* и *purH*, очевидно, снижает его внутриклеточный пул и положительно влияет на продукцию ГИС.

1.3. Дальнейшее изучение роли PitA в продукции гистидина. Уменьшение активности щелочной фосфатазы у штамма-продуцента гистидина в условиях дефицита фосфора.

Для анализа влияния PitA на синтез ГИС была получена делеция гена *pitA* в исходном штамме-продуценте KF37; указанная модификация приводила к увеличению продукции ГИС на 12% (Таблица 5). В то же время, введение экспрессионной кассеты $Sm^R-P_{Lac}-pitA$, очевидно, усиливающей экспрессию *pitA*, в штамм KF37, снижало накопление ГИС более чем в 2 раза (Таблица 5).

Таким образом, любая экспрессия PitA негативно влияет на продукцию ГИС, и это может быть связано с его функцией транспортёра $Me^{2+}-P_i$.

Таблица 5 – Влияние инактивации или усиления синтеза PitA на продукцию гистидина.

Штамм	ОП ₅₄₀	ГИС	
		г/л	%
KF37	14,9 ± 0,3	3,4 ± 0,1	100
KF37 $\Delta pitA::Km^R$	11,3 ± 0,5	3,8 ± 0,3	112
KF37 Cm ^R -P _{Llac} - <i>pitA</i>	7,1 ± 0,2	1,4 ± 0,2	41

Культивирование в пробирках на среде, содержащей 5% глюкозы; приведены усредненные результаты 6 независимых экспериментов.

Как известно, обеспечение клеток фосфором осуществляется через синтез АТФ, который опосредует передачу P_i между органическими молекулами, является донором энергии и необходим для сверхсинтеза ГИС. Поэтому интересно было оценить у продуцента ГИС активность основной системы транспорта P_i в клетки, контролируемой *rho*-регулоном. Входящий в состав этого регулона ген *rhoA* кодирует фермент щелочную фосфатазу (PhoA). Уровень активности PhoA отражает степень индукции *rho*-регулона, которая происходит в условиях недостатка фосфора (Wanner et al., 1996).

Активность PhoA определяли через 24 часа роста культуры – после исчерпания фосфатов в среде (Таблица 6).

Таблица 6 – Ферментативная активность щелочной фосфатазы PhoA в условиях лимита по P_i у штамма дикого типа MG1655 и штамма-продуцента ГИС KF37 в зависимости от аллельного состояния *pitA*.

Штамм	Активность PhoA, мкмоль/мин/мг
MG1655	228 ± 10
MG1655 $\Delta pitA$	225 ± 5
KF37	23 ± 1
KF37 $\Delta pitA$	25 ± 1

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Неожиданно оказалось, что активность PhoA в условиях лимита по P_i у ГИС-продуцирующего штамма KF37 была значительно ниже, чем у штамма дикого типа, причем в обоих случаях – вне зависимости от характера аллеля *pitA*.

Полученные результаты позволяют предположить, что АИКАР негативно влияет на индукцию *rho*-регулона.

1.4. Понижение уровня активности PhoA в ответ на сверхсинтез АИКАР.

Для проверки данного предположения был сконструирован штамм *E. coli* MG1655 $\Delta purR::Cm^R \Delta purH::Km^R$, способный к сверхсинтезу АИКАР. Сверхсинтез был обеспечен за счёт удаления репрессора генов пути биосинтеза пуринов PurR. При этом последующая конверсия АИКАР в нуклеотиды аденина была блокирована введением делеции гена *purH*. Соответственно, в полученном мутантном штамме, внутриклеточный пул АИКАР был увеличен, о чем свидетельствовало накопление его дефосфорилированной формы (АИКАр) в среде (Таблица 7). У полученного штамма проверяли способность к активации щелочной фосфатазы PhoA в условиях лимита по P_i .

Ферментативная активность PhoA была измерена спустя 2 часа после исчерпания P_i в среде. Как и ожидалось, уровень активности PhoA был существенно ниже в штамме, продуцирующем АИКАр, по сравнению со штаммом дикого типа (Таблица 7).

Таблица 7 – Корреляция между способностью к накоплению АИКАр и активностью PhoA.

Штамм	АИКАр, мг/л	Активность PhoA, %
MG1655	< 0,1	100 %
MG1655 $\Delta purR::Cm^R \Delta purH::Km^R$	7,6 ± 0,3	64 %

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии повышенного внутриклеточного пула АИКАР (у штамма, способного к сверхсинтезу АИКАР и, по всей вероятности, в еще большей степени, у штамма-продуцента ГИС), на индукцию *pho*-регулона. В рамках существующей модели регуляции *pho*-регулона (Hsieh and Wanner, 2010) нами предложена гипотеза о механизме такого влияния.

2. Увеличение числа копий оперона *atp*, кодирующего H⁺-АТФ-синтазу, и оперона *nuo*, кодирующего NAD(P)H: убихинон-оксидоредуктазу I (NDH-1), с целью повышения уровня синтеза/регенерации АТФ. Положительное влияние NDH-1 с измененной субстратной специфичностью на синтез гистидина.

2.1. Влияние увеличения числа копий оперонов *atp* и *nuo* в клетках *E. coli* на рост и выход биомассы в различных физиологических условиях.

После усиления конверсии АИКАР в АМФ следующим этапом в настоящей работе являлось повышение синтеза/регенерации АТФ. Как известно, в клетке наиболее энергозависимыми являются процессы, связанные с синтезом белка. Поэтому скорость роста культуры и выход клеточной массы обусловлены эффективностью синтеза/регенерации АТФ. В связи с этим, мы исследовали, как влияет введение в хромосому дополнительных копий оперонов *atp* (*atp*IBEFHAGDC) и *nuo* (*nuo*ABCDEFGHIJMN), кодирующих белковые комплексы, H⁺-АТФ-синтазу и NDH-1, соответственно (что, очевидно, повышает уровень их экспрессии), на рост и выход биомассы в различных физиологических условиях. При помощи метода «PCR-free» клонирования протяженных фрагментов ДНК ранее был получен штамм MG1655 Δ aroG::*atp*, содержащий дополнительную копию функционально активного *atp* оперона (Hook et al., 2016). Аналогичным образом, в данной работе был сконструирован штамм, содержащий дополнительную копию *nuo* оперона со своей природной регуляторной областью. Полученная для этого экспрессионная кассета IS5.11::*cat*-P_{*nuo*}-*nuo* была интегрирована в хромосому *E. coli* и была показана её способность компенсировать делецию соответствующего оперона на среде, содержащей ацетат в качестве единственного источника углерода (Prüss et al., 1994). С этой целью указанная кассета была перенесена в штамм MG1655 Δ *nuo* с делецией всех генов (Δ *nuo*), кодирующих NDH-1. Оценка роста сконструированного в результате штамма MG1655 Δ *nuo* IS5.11::*Cm*^R-P_{*nuo*}-*nuo* на минимальной среде M63 с ацетатом 0,2% показала, что интегрированная экспрессионная кассета комплементирует делецию *nuo* оперона, что подтверждало генетически ее функциональность (Таблица 8).

Таблица 8 – Восстановление с помощью кассеты IS5.11::Cm^R-P_{nuo}-nuo роста штамма MG1655 Δnuo на среде с ацетатом в качестве источника углерода.

Штамм	Удельная скорость роста, 1/ч
MG1655	0,179 ± 0,008
MG1655 Δnuo	0,092 ± 0,001
MG1655 ΔnuoA-N IS5.11::Cm ^R -nuo	0,181 ± 0,006

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Кроме того, функциональность дополнительной копии *nuo* оперона была подтверждена биохимически, о чем свидетельствовало увеличение активности NADH: убихинон-оксидоредуктазы в 2 раза (данные не приведены).

Для дальнейшего изучения влияния увеличения числа копий генов, кодирующих NDH-1 и H⁺-АТФ-синтазу, был сконструирован штамм MG1655 ΔaroG::atp IS5.11::Cm^R-P_{nuo}-nuo, содержащий в хромосоме одновременно дополнительные копии *atp* и *nuo* оперонов. Далее, изучался рост штаммов MG1655, MG1655 ΔaroG::atp и MG1655 ΔaroG::atp IS5.11::Cm^R-P_{nuo}-nuo при культивировании в ферментерах (периодический процесс) в условиях высокой и низкой аэрации (Рисунок 4).

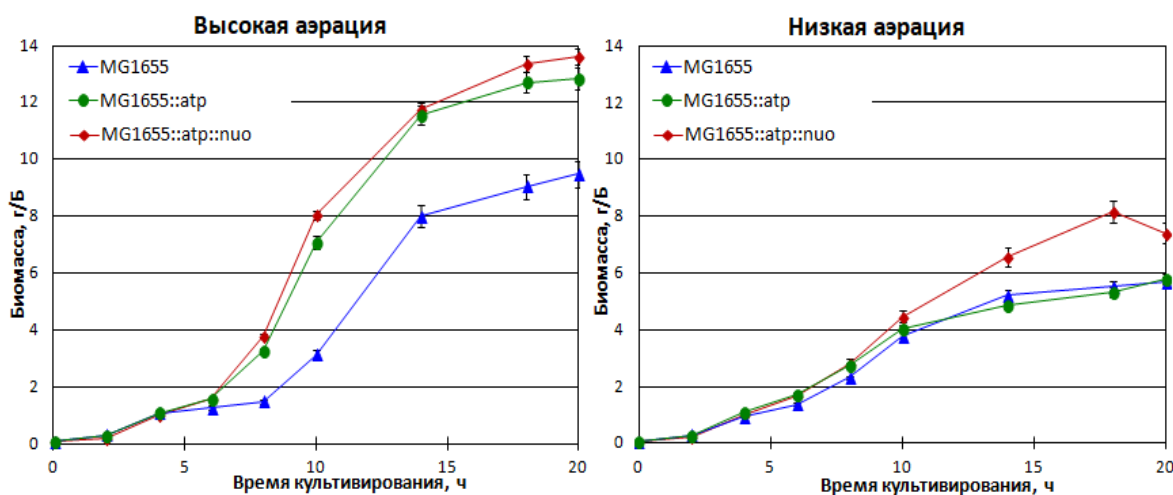


Рисунок 4 – Влияние увеличения копийности *nuo* и *atp* оперонов на рост и выход биомассы *E. coli* при высокой и низкой аэрации. Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Для обеспечения высокой аэрации перемешивание осуществляли с контролем уровня растворенного кислорода, $pL > 5\%$. Для обеспечения низкой аэрации, клетки культивировали при 170 об/мин; при этом уровень растворенного кислорода падал до значений $pL < 2\%$, лимит по кислороду наступал после ~10 часов культивирования.

При высокой аэрации амплификация генов *atp* оперона, как в отдельности, так и в комбинации с амплификацией *nuo* оперона, приводит к увеличению скорости роста и выхода биомассы, очевидно, за счет усиления синтеза АТФ. В условиях лимита по кислороду повышения экспрессии *atp* оперона не достаточно, и только совместное удвоение числа копий обоих оперонов приводит к небольшому увеличению выхода биомассы (Рисунок 4).

Более детальный анализ результатов этого эксперимента показал, что при высокой аэрации усиление экспрессии только одного *atp* оперона за счёт введения в хромосому второй его копии на 5% увеличивает потребление культурой глюкозы и выход биомассы. Одновременное увеличение копийности обоих оперонов ведёт к дальнейшему повышению потребления глюкозы; при этом выход биомассы практически не меняется, зато заметно повышается скорость роста культуры. В условиях лимита по кислороду само по себе усиление экспрессии генов *atp* оперона не влияет заметным образом на указанные характеристики роста, и только удвоение числа копий обоих оперонов приводит к увеличению по сравнению с контрольным штаммом потребления глюкозы и выхода биомассы (данные не приведены).

Важно отметить, что при дупликации *nuo* и *atp* оперонов в обоих условиях аэрации снижается накопление ацетата, который появляется в среде, в том числе, как следствие синтеза АТФ за счёт субстратного фосфорилирования при дефиците этого макроэрга. Таким образом, можно сделать вывод, что уровень экспрессии *atp* и *nuo* оперонов может являться лимитирующим фактором при аэробном росте клеток *E. coli*.

2.2. Влияние мутантного комплекса NDH-1 с измененной субстратной специфичностью на продукцию гистидина.

2.2.1. Конструирование штаммов *E. coli*, содержащих NDH-1 с измененной субстратной специфичностью.

В процессе переноса электронов NDH-1 задействована субъединица NuoF, которая обращена в цитоплазму и несет NADH-связывающий сайт. У *E. coli* аминокислотная замена E183A в этой субъединице приводит к появлению двойной субстратной специфичности NDH-1: ферментный комплекс, содержащий мутантную субъединицу NuoF^{E183A}, способен генерировать протон-движущую силу за счёт окисления как NADH, так и NADPH (Auriol et al., 2011). Известно, что при сверхсинтезе ГИС в клетках штаммов-продуцентов в пентозофосфатном

пути может происходить избыточное образование NADPH.

Для создания NDH-1 с измененной субстратной специфичностью, в ген *nuoF* при помощи сайт-направленного мутагенеза ввели мутацию E183A, сохранив природную регуляцию *nuo*-оперона, кодирующего все субъединицы фермента (NuoABCDEFGHIJMN). Полученный штамм MG1655 *nuoF*^{E183A} исследовали на эффективность аэробного роста в минимальной среде M9 с добавлением 0,4% глюкозы. Оказалось, что мутация E183A практически не влияет на рост клеток полученного штамма в указанных условиях.

2.2.2. Анализ активности NADH: убихинон-оксидоредуктаз у штаммов, содержащих комплекс NDH-1 с различной субстратной специфичностью.

Был проведен анализ влияния замены E183A в субъединице NuoF на общую активность NADH: убихинон-оксидоредуктаз (NDH). Ферментативную активность NDH в бесклеточных мембранных фракциях штаммов, содержащих ген *nuoF* дикого (*nuoF*^{wt}) и мутантного (*nuoF*^{E183A}) типа, определяли с использованием трёх субстратов: NADH – для определения общей активности NADH-дегидрогеназ (как NDH-1, так и NDH-2); deamino-NADH – для определения активности только NDH-1; и NADPH – для анализа изменения субстратной специфичности мутантной NDH-1. Для увеличения проницаемости мембран для указанных веществ измерения осуществляли в присутствии антибиотика-ионофора аламетицина (Milov et al., 2009).

Таблица 9 – Анализ активности NADH: убихинон-оксидоредуктаз (NDH-1, NDH-2) у штаммов *E. coli*, содержащих ген *nuoF* дикого и мутантного типа.

Штамм	<i>nuoF</i> аллель	Субстрат	Общая NDH активность, нмоль/мин*мг	NDH-1 активность, нмоль/мин*мг	NDH-2 активность, нмоль/мин*мг
MG1655	Дикий тип	NADH	470 ± 12	210 ± 5	260 ± 7
		deamino-NADH	210 ± 5	210 ± 5	< 5
		NADPH	< 5	< 5	< 5
MG1655 <i>nuoF</i> ^{E183A}	E183A	NADH	440 ± 11	130 ± 3	310 ± 8
		deamino-NADH	130 ± 3	130 ± 3	< 5
		NADPH	80 ± 2	79 ± 2	< 5

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Было показано, что удельная активность мутантной NDH-1 с использованием NADPH в качестве субстрата, в бесклеточном экстракте MG1655 составляла около 80 нмоль/(мин*мг), в то время как для NDH-1 дикого типа удельная активность в бесклеточном экстракте, измеренная в реакциях с NADPH в качестве субстрата не детектировалась, то есть составляла менее 5 нмоль/мин*мг (Таблица 9). Полученные данные указывают на появление двойной субстратной специфичности у мутантного комплекса NDH-1, что согласуется с литературными данными (Auriol et al., 2011). Таким образом, NADPH может быть задействован в дыхательной цепи полученного мутантного штамма MG1655 *nuoF*^{E183A}.

2.2.3. Влияние экспрессии NDH-1 с измененной субстратной специфичностью на продукцию гистидина.

При сверхсинтезе ряда клеточных метаболитов, сопровождающемся потреблением большого количества ФРПФ и АТФ, синтез NADPH может быть избыточным, что в ряде случаев сопровождается недостатком молекул АТФ и подавлением роста клеток. В соответствии с уравнением баланса, синтез ГИС из 1 молекулы глюкозы сопряжен с расходом 6 молекул АТФ и образованием 2,8 молекул NADPH.

Для проверки способности полученного мутантного фермента NDH-1, включающего субъединицу *NuoF*^{E183A}, использовать избыточный NADPH в процессе образования протон-движущей силы и регенерации АТФ в условиях сверхсинтеза ГИС, оценивали влияние модификации *nuoF*^{E183A} на продукцию ГИС штаммом EA92 (*ΔpurR Phis-ΔhisL' hisG*^{R(E271K)}*DCBHAFI IS5.11::P_{tac21}-purA pitA P_L-purH P_L-aspC*), который был получен в настоящей работе.

Была сконструирована экспрессионная кассета *Сm*^R-*nuoF*^{E183A}, которую перенесли в штамм EA92 методом общей трансдукции. При культивировании полученного штамма EA92 *Сm*^R-*nuoF*^{E183A}, содержащего мутантный *nuo* оперон, наблюдали увеличение накопления ГИС на 15% (Таблица 10).

Таблица 10 – Влияние мутантного гена *nuoF*^{E183A} на продукцию гистидина штаммом-продуцентом *E. coli* EA92.

Штамм	ОП ₅₅₀	ГИС, г/л	ГИС, г/л/ОП ₅₅₀
EA92	18,2 ± 0,2	6,6 ± 0,2	0,36 ± 0,02
EA92 <i>Сm</i> ^R - <i>nuoF</i> ^{E183A}	18,4 ± 0,8	7,6 ± 0,4	0,42 ± 0,01

Приведены усредненные результаты 3-6 независимых экспериментов.

Таким образом, мутация, придающая NDH-1 способность окислять как NADH, так и NADPH, положительно влияет на продукцию целевой аминокислоты.

3. Влияние инактивации гена *yjjK* (*ettA*), кодирующего трансляционный фактор EttA, на накопление гистидина.

В ранней работе, касающейся изучения локуса *flr* у *E. coli* было показано, что мутации в этом локусе, на тот момент не идентифицированные, приводят к увеличению уровня накопления отдельных аминокислот, включая ГИС (Kline, 1972). Используя появившуюся затем информацию о первичной нуклеотидной последовательности этого локуса, мы предположили, что указанные мутации могут быть связаны с геном *yjjK*. Позднее появились публикации, свидетельствующие о том, что этот ген кодирует новый, ранее неизвестный, фактор трансляции EttA (**energy-dependent translational throttle A**, Voël et al., 2014; Chen et al., 2014), ослабляющий трансляцию при снижении в клетке соотношения АТФ/АДФ.

Чтобы оценить влияние аллельного состояния гена *yjjK* на сверхсинтез ГИС, в штамме дикого типа *E. coli* MG1655 была получена делеция этого гена $\Delta yjjK$, которую перенесли трансдукцией в штамм KF37. Как показано в Таблице 11, по результатам пробирочной ферментации инактивация гена *yjjK* на 22% увеличивает продукцию ГИС.

Таблица 11 – Влияние инактивации *YjjK*(EttA) на продукцию гистидина штаммом-продуцентом *E. coli* KF37.

Штамм	ОП ₅₅₀	ГИС, г/л
KF37	18,3 ± 0,5	0,9 ± 0,05
KF37 $\Delta yjjK$	19,1 ± 1	1,1 ± 0,1

Приведены усредненные результаты 5-7 независимых экспериментов.

Таким образом, нами получены данные, свидетельствующие о том, что устранение фактора трансляции EttA положительно влияет на продукцию ГИС.

4. Экспрессия гена мембранной H⁺-пирофосфатазы *Rhodospirillum rubrum* (H⁺-PPase^{Rru}) в клетках *E. coli* и оценка возможности её функционирования в качестве единственной пирофосфатазы. Влияние экспрессии гена мембранной H⁺-PPase^{Rru} на продукцию гистидина.

4.1. «Гармонизация» кодонов гена мембранной пирофосфатазы H⁺-PPase^{Rru} для экспрессии в *E. coli*.

Неорганический пирофосфат (PP_i) образуется в более чем 200-х реакциях клеточного метаболизма, и его гидролиз необходим для того, чтобы сделать многие жизненно важные реакции необратимыми. Расщепление PP_i сопровождается выделением значительного количества энергии, и у большинства живых организмов происходит её последующее рассеивание в виде тепла. Мембранные H⁺-пирофосфатазы (H⁺-PPase) осуществляют реакцию гидролиза неорганического PP_i, сопряжённую с переносом протона H⁺ через мембрану против градиента концентраций, т.е. они участвуют в формировании протон-движущей силы, необходимой для регенерации/синтеза АТФ.

В данной части работы выяснялась возможность применения H⁺-PPase из *Rhodospirillum rubrum* (*hppa*^{Rru}) в микробиологических процессах, требующих высоких затрат АТФ, в т.ч., в процессе биосинтеза ГИС.

Для обеспечения эффективной экспрессии гена *hppa*^{Rru} из *R. rubrum* ATCC 11170 в клетках *E. coli*, была проведена «гармонизация» кодонов *hppa*^{Rru} в соответствии с данными о частотах встречаемости кодонов для кодирующих областей геномов *R. rubrum* и *E. coli* (<https://www.kazusa.or.jp/codon/>). Ген *hppa*^{Rru} с оптимизированной таким образом для *E. coli* структурой был химически синтезирован (TDK service, Russia) и клонирован в составе малокопийного интегративного вектора pAN162-Tc^R-2Ter.

Полученная в результате рекомбинантная плаزمида pAN162-Tc^R-2Ter-*hppa*^{Rru} была далее интегрирована в локус IS5.8 хромосомы ранее сконструированного штамма *E. coli* MG1655 IS5.8::(ϕ 80-*attB*)^{native} (Minaeva et al., 2008). Экспрессию гена *hppa*^{Rru} в хромосоме интегранта MG1655 Δ (ϕ 80-*attB*)^{native} IS5.8::*hppa*^{Rru} активировали путем введения конститутивных промоторов разной силы P_L, P_{tac} и P_{tac21} (Katashkina et al., 2005). В результате были получены штаммы с различным уровнем экспрессии указанного гена, в частности, штамм MG1655 Δ (ϕ 80-*attB*)^{native} IS5.8::P_L-SD1-*hppa*^{Rru}, который использовали в дальнейшей работе.

4.2. Замена гена неорганической пирофосфатазы PPase на H⁺-PPase^{Rru} в хромосоме *E. coli*. Подтверждение Саузерн-блоттингом.

Для подтверждения возможности функционирования *in vivo* H⁺-PPase^{Rru} из *R. rubrum* в клетках *E. coli* в качестве единственного PP_i-гидролизующего фермента, необходимо было инактивировать ген нативной цитоплазматической пирофосфатазы *ppa*, который относится к группе существенных (essential) генов и не может быть удалён в клетках *E. coli* дикого типа (Chen et al., 1990). Тем не менее, наличие функционирующего фермента H⁺-PPase^{Rru}, способного хотя бы частично компенсировать утрату пирофосфатазной активности, позволило осуществить делецию гена *ppa* в хромосоме штамма *E. coli* MG1655 IS5.8::P_L-*hppa*^{Rru}. Клоны штамма MG1655 IS5.8::P_L-*hppa*^{Rru} Δ*ppa*::*cat*, содержащие по результатам ПЦР-анализа делецию гена *ppa* в хромосоме, растут медленнее по сравнению с реципиентным штаммом (см. ниже). Факт делеции существенного гена *ppa* в штамме *E. coli* MG1655 IS5.8::P_L-SD1-*hppa*^{Rru} Δ*ppa*::*cat* был подтвержден также гибридизацией по Саузерну (данные в автореферате не приведены).

Таким образом, впервые была продемонстрирована возможность удаления существенного гена неорганической растворимой пирофосфатазы у *E. coli* и получен штамм бактерии, содержащий только мембран-связанную H⁺-PPase^{Rru}.

4.3. Характеристики роста штаммов *E. coli*, содержащих экспрессионные кассеты с геном H⁺-PPase^{Rru}.

Анализ кинетики роста штаммов, содержащих H⁺-PPase^{Rru}, показал, что при наличии в клетках функционально активного гена *ppa* экспрессия дополнительного гена *hppa*^{Rru} незначительно влияет на рост. В то же время, делеция гена собственной цитоплазматической пирофосфатазы заметно (на 35%) замедляла рост клеток на минимальной среде (Рисунок 5).

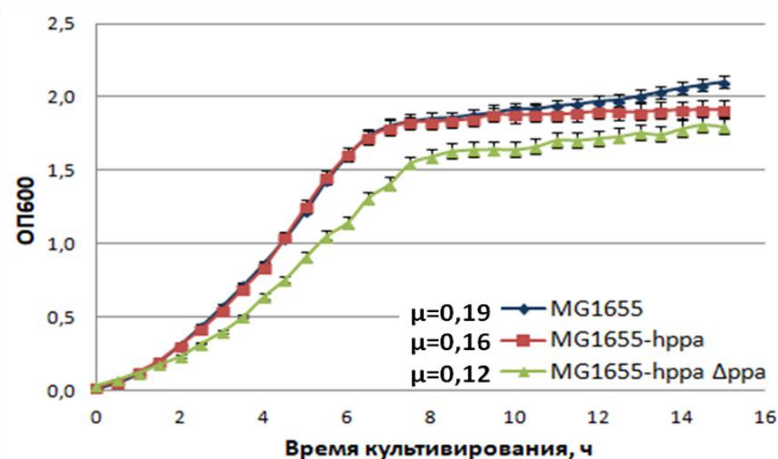


Рисунок 5 – Кинетика роста штаммов, содержащих экспрессионную кассету с геном $hppa^{Rru}$ в клетках *E. coli*. Представлены усредненные результаты 3 экспериментов.

Несмотря на это, мембранная пирофосфатаза при определённом уровне экспрессии способна компенсировать отсутствие цитоплазматической, в норме существенной, пирофосфатазы у *E. coli*.

4.4. Анализ пирофосфатазной активности штаммов *E. coli*, содержащих растворимую PPase^{Eco} и мембранную H⁺-PPase^{Rru} пирофосфатазы.

Для дополнительного подтверждения функциональности H⁺-PPase^{Rru} в клетках *E. coli* в качестве единственного PP_i-гидролизующего фермента, измеряли пирофосфатазную активность в растворимой фракции клеток штамма MG1655 (ppa^+) дикого типа, штамма MG1655 IS5.8::P_L- $hppa^{Rru}$ (ppa^+), экспрессирующего ген $hppa^{Rru}$, а также штамма MG1655 IS5.8::P_L- $hppa^{Rru}$ Δ ppa (Δ ppa $hppa^{Rru}$), у которого ген ppa заменен на ген $hppa^{Rru}$. Как и ожидалось, делеция гена ppa приводит к отсутствию детектируемой активности пирофосфатазы в растворимой фракции соответствующего штамма MG1655 ($hppa^{Rru}$ Δ ppa) (Таблица 12).

Таблица 12 – Активность растворимой пирофосфатазы Ppa в штаммах *E. coli*, содержащих гетерологичный ген $hppa^{Rru}$.

Штамм	Активность пирофосфатазы Ppa, мкмоль/мин*мг
MG1655	5,6 ± 0,3
MG1655 IS5.8::P _L -SD1- $hppa^{Rru}$	5,5 ± 0,5
MG1655 IS5.8::P _L -SD1- $hppa^{Rru}$ Δ ppa	< 0,5

Представлены усредненные значения 3 экспериментов.

Определение активности H⁺-PPase^{Rru} в штаммах *E. coli* осуществлялось в везикулах мембранной фракции. Было показано, что пирофосфатазная активность

в мембранной фракции штамма *E. coli* с заменой гена *ppa* на ген *hppa*^{Rru} была в 10 раз выше по сравнению со штаммом MG1655 (Рисунок 6).

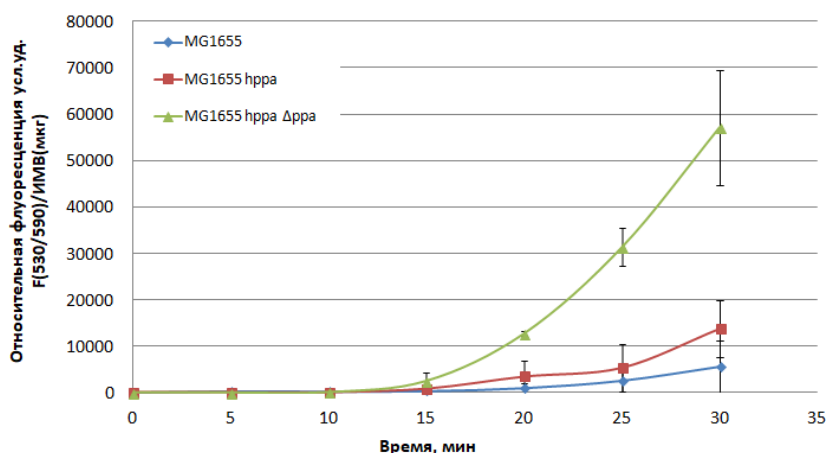


Рисунок 6 – Анализ пирофосфатазной активности в мембранных фракциях штаммов *E. coli*. Представлены усредненные результаты 3 экспериментов.

4.5. Экспрессия гена Н⁺-PPase^{Rru} приводит к увеличению продукции гистидина штаммом-продуцентом *E. coli*.

Проверка возможного влияния экспрессии гена Н⁺-PPase^{Rru} на продукцию ГИС осуществлялась в штамме-продуценте *E. coli* EA92. Полученные штаммы EA92 IS5.8::P_L-*hppa*^{Rru} и EA92 IS5.8::P_L-*hppa*^{Rru} Δ*ppa*::*cat* анализировали в пробирочной ферментации (Таблица 13). Было продемонстрировано, что штамм EA92 IS5.8::P_L-*hppa*^{Rru}, содержащий дополнительно Н⁺-PPase^{Rru}, продуцировал на 7% больше ГИС, чем контрольный, EA92. Последующая полная замена нативной PPase *E. coli* на Н⁺-PPase^{Rru} приводила к замедлению роста, однако продукция ГИС увеличивалась на 30% по сравнению с исходным штаммом.

Таким образом, мы показали принципиальную возможность использования Н⁺-PPase^{Rru} для увеличения продукции ГИС штаммом-продуцентом *E. coli*.

Таблица 13 – Влияние экспрессии гена мембранной пирофосфатазы Н⁺-PPase^{Rru} на продукцию ГИС штаммом-продуцентом *E. coli* EA92.

Штамм	ОП ₆₀₀	ГИС, г/л	ГИС, %	ГИС (г/л)/ОП ₆₀₀
EA92	19,3±0,2	5,7±0,1	100	0,295 ± 0,01
EA92 IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	18,7±0,8	6,1±0,2	107	0,33 ± 0,02
EA92 IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} Δ <i>ppa</i> :: <i>cat</i>	17,4±0,8	7,4±0,7	130	0,43 ± 0,02

Приведены усредненные результаты 6 независимых экспериментов.

Выводы

1. Установлено, что у *E. coli* активность ключевого фермента биосинтеза L-гистидина, АТФ-фосфорибозилтрансферазы, подавляется образующимся в процессе биосинтеза этой аминокислоты побочным продуктом – 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотидом (АИКАР).
2. Показано, что в условиях лимита по фосфору у штамма-продуцента L-гистидина, а также у штамма, способного к избыточному синтезу АИКАР, снижена активность щелочной фосфатазы (PhoA). Очевидно, *pho*-регулон является мишенью для АИКАР, который подавляет его индукцию.
3. Показано, что сверхэкспрессия генов *purH* и *purA*, контролирующих превращение АИКАР в нуклеотиды аденина, повышает продукцию L-гистидина ранее описанным штаммом продуцентом.
4. Обнаружено, что инактивация PitA, низкоаффинного переносчика неорганического фосфата, повышает продукцию L-гистидина.
5. Установлено, что делеция гена *yjjK* (*ettA*), устраняющая белковый фактор EttA, который регулирует процесс трансляции в зависимости от соотношения АДФ/АТФ в клетке, положительно влияет на продукцию L-гистидина.
6. Показано, что удвоение в хромосоме числа копий оперонов, кодирующих H^+ -АТФ-синтазу и NADH: убихинон оксидоредуктазу I, приводит к увеличению скорости роста и/или выхода биомассы при различных условиях аэрации культуры *E. coli*.
7. Сконструированы штаммы *E. coli*, содержащие ранее описанную мутацию *nuoF*^{E183A}, придающую NAD(P)H: убихинон оксидоредуктазе I способность окислять как NADH, так и NADPH. Показано, что эта мутация повышает продукцию L-гистидина штаммом-продуцентом.
8. Впервые продемонстрирована возможность замены в клетках *E. coli* гена жизненно необходимой цитоплазматической пирофосфатазы на ген мембранной пирофосфатазы из *R. rubrum*. Такая замена в штамме продуценте L-гистидина на 30% увеличила продуктивность и накопление аминокислоты.

Список публикаций

1. **Malykh E.A.**, Butov I.A., Ravcheeva A.B., Krylov A.A., Mashko S.V., Stoynova N.V. (2018). Specific features of l-histidine production by *Escherichia coli* concerned with feedback control of AICAR formation and inorganic phosphate/metal transport. *Microbial cell factories*, 17(1), 1-15.
2. Stoynova N.V., Samsonov V.V., Eremina N.S., **Polyakova (Malykh) E.A.** (2015). US9175319B2 (CN104120157B, JP6459203B2, EP2796560B1). Method for producing an L-amino acid using a bacterium of the family *Enterobacteriaceae* having attenuated expression of the *yjyK* gene.
3. Kuvaeva T.M., **Polyakova (Malykh) E.A.**, Stoynova N.V. (2018). US9873898B2 (EP3052637B1, JP6460100B2). Method for producing an L-amino acid using a bacterium of the family *Enterobacteriaceae* having attenuated expression of a phosphate transporter-encoding gene.
4. **Malykh E.**, Stoynova N., Golubeva L., Mashko S., Kovaleva E., Shupletsov M., Baboshin M., Krylov A., Zakataeva N., Andrianova E., Kharchenko M., Voroshilova E. (2020). WO2020071538A1. Method for producing target substance by bacterial fermentation.

Доклады и тезисы на научных конференциях

1. **Полякова (Малых) Е.А.**, Бутов И.А., Равчеева А.Б., Машко С.В., Стойнова Н.В. Регуляторная роль АИКАР и PitA-зависимого транспорта фосфатов двухвалентных металлов в процессе биосинтеза гистидина клетками *Escherichia coli*. VIII Российский Симпозиум «Белки и пептиды», Москва, 2017.
2. Козаева Е.С., **Полякова (Малых) Е.А.**, Игоница О.Н., Стойнова Н.В. Конструирование штаммов *Escherichia coli*, содержащих NAD(P)H: убихинон оксидоредуктазу I типа с измененной субстратной специфичностью. VIII Российский Симп. «Белки и пептиды», Москва, 2017.
3. **Malykh E.A.**, Golubeva L.I., Kovaleva E.S., Shupletsov M.S., Mashko S.V., Plekhanova N.S., Borzenko T., Ptitsyn L.R., Stoynova N.S. The H⁺-translocating membrane-bound pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum* fuels *E. coli* cells by alternative pathway for energy generation. 5-th Applied Synthetic Biology in Europe, November 2-4, 2020. Delft, the Netherlands. (OnLine).
4. **Malykh E.A.**, Golubeva L.I., Kovaleva E.S., Shupletsov M.S., Mashko S.V., Plekhanova N.S., Borzenko T., Ptitsyn L.R., Stoynova N.S. The H⁺-translocating membrane-bound pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum* fuels *E. coli* cells by alternative pathway for energy generation. *Metabolic Engineering*, 14, July 11-15, 2021, Honolulu, USA. (OnLine).