

Акционерное Общество
«Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»

На правах рукописи

Малых Евгения Александровна

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

1.5.7 – Генетика

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Стойнова Наталия Викторовна

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Лившиц Виталий Аркадьевич

Москва 2022

Оглавление

1. Введение	5
1.1. Актуальность проблемы.....	5
1.2. Цели и задачи работы.....	6
1.3. Научная новизна и практическая ценность работы.....	6
1.4. Положения, выносимые на защиту.....	7
2. Обзор литературы	9
2.1. L-гистидин: применение, дальнейшие перспективы использования, путь биосинтеза и его регуляция в клетках энтеробактерий.....	9
2.1.1. L-гистидин: применение, перспективы использования и получение путем микробиологического синтеза.....	9
2.1.2. Биосинтез L-гистидина и его регуляция в клетках энтеробактерий.....	14
2.1.2.1. Путь биосинтеза L-гистидина и его связь с биосинтезом пуринов. <i>His</i> -оперон <i>E. coli</i>	14
2.1.2.2. Регуляция биосинтеза L-гистидина в клетках <i>E. coli</i>	17
2.1.2.3. Регуляторная роль АИКАР в клеточном метаболизме.....	21
2.1.3. Штаммы-продуценты L-гистидина: получение, особенности и перспективы применения методов рационального дизайна в их конструировании.....	24
2.1.3.1. Получение штаммов-продуцентов L-гистидина.....	24
2.1.3.2. Потребность продуцентов L-гистидина в производных аденина.....	29
2.1.3.3. Потенциальные мишени для создания штаммов-продуцентов L-гистидина на основе <i>E. coli</i> методами рационального дизайна.....	31
2.2. Биоэнергетика бактериальной клетки и повышение обеспеченности клеток АТФ.....	33
2.2.1. Пути образования АТФ, протон-движущая сила и протонная H^+ -АТФ-синтаза <i>E. coli</i>	33
2.2.2. Дыхательная цепь в клетках <i>E. coli</i> . NADH убихинон-оксидоредуктаза I типа.....	37
2.2.3. Подходы к регуляции пула АТФ в клетках штаммов-продуцентов.....	41
2.2.4. Ассимиляция неорганического фосфата и обеспечение его гомеостаза в клетках <i>E. coli</i>	47
2.3. Неорганический пирофосфат (PP_i), ферменты, осуществляющие его гидролиз, их функции и применение.....	50
2.3.1. Неорганический пирофосфат (PP_i) как энергетический компонент клетки.....	50
2.3.2. Цитоплазматические (растворимые) пирофосфатазы.....	51
2.3.3. Мембранные пирофосфатазы.....	53
2.3.4. H^+ -переносящая пирофосфатаза из <i>Rhodospirillum rubrum</i> и её практическое применение.....	57
3. Материалы и методы	59
3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды.....	59

3.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе.....	62
3.3. Работа с бактериальными культурами.....	64
3.4. Стандартные генно-инженерные методики.....	64
3.5. Электротрансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	65
3.6. Получение препарата фага P1 ^{vir} для трансдукции в клетки <i>E. coli</i>	66
3.7. λ Red-зависимая интеграция двухцепочечных фрагментов ДНК в хромосому <i>E. coli</i>	66
3.8. λ Int/Xis-зависимое удаление селективного маркера из хромосомы <i>E. coli</i>	66
3.9. ϕ 80-зависимая интеграция двухцепочечных фрагментов ДНК в хромосому <i>E. coli</i>	67
3.10. Гибридизация по Саузерну.....	67
3.11. Получение мембранных везикул.....	68
3.12. Измерение активности аспаратаминотрансферазы AspC.....	69
3.13. Экспрессия и очистка белка HisG.....	69
3.14. Измерение активности АТФ-ФРТ HisG.....	70
3.15. Измерение активности щелочной фосфатазы PhoA.....	71
3.16. Измерение неорганического фосфата P _i	72
3.17. Измерение активности неорганической растворимой пирофосфатазы Ppa <i>E. coli</i>	72
3.18. Измерение активности мембранной H ⁺ -пирофосфатазы из <i>R. Rubrum</i>	73
3.19. Измерение активности NADH: убихинон оксидоредуктазы I.....	74
3.20. Пробирочная ферментация штаммов-продуцентов гистидина и анализ накопления продукта методом ТСХ.....	75
3.21. Культивирование в ферментерах (периодический процесс).....	76
3.22. Мутагенез гена <i>puoF</i> для получения замены E183A, обеспечивающей двойную кофакторную специфичность комплекса NAD(P)H: убихинон-оксидоредуктазы I типа.....	77
3.23. Конструирование интегративных кассет.....	78
3.24. Конструирование рекомбинантных плазмид.....	84
4. Результаты и обсуждение.....	86
4.1. Поиск новых мишеней для АИКАР в клетках <i>E. coli</i> и усиление превращения его в нуклеотиды аденина для повышения продукции L-гистидина.....	86
4.1.1. Ингибирование АТФ-ФРТ побочным продуктом пути биосинтеза L-гистидина, АИКАР, как механизм контроля образования гистидина в клетках <i>E. coli</i>	87
4.1.2. Усиление превращения АИКАР в нуклеотиды аденина путем сверхэкспрессии генов <i>purA</i> и <i>purH</i> приводит к увеличению накопления L-гистидина.....	91
4.1.3. Инактивация гена <i>pitA</i> , кодирующего систему транспорта неорганического фосфата P _i , приводит к увеличению продукции L-гистидина.....	95

4.1.4. Влияние инактивации PitA на экспрессию <i>pho</i> -регулона и потребление неорганического фосфата P _i штаммом-продуцентом L-гистидина.....	97
4.1.5. Понижение уровня активности PhoA в ответ на сверхсинтез АИКАР; P _i -независимая активация экспрессии гена <i>phoA</i> в клетках <i>E. coli</i> , продуцирующих L-гистидин.....	99
4.2. Увеличение числа копий оперонов, кодирующих H ⁺ -АТФ-синтазу и NDH-1, с целью повышения уровня синтеза/регенерации АТФ. Положительное влияние NDH-1 с измененной субстратной специфичностью на синтез L-гистидина.....	102
4.2.1. Влияние увеличения числа копий генов NADH: убихинон оксидоредуктазы I (NDH-1) и H ⁺ -АТФ-синтазы в клетках <i>E. coli</i> на рост и выход биомассы в различных физиологических условиях.....	103
4.2.2. Влияние мутантного комплекса NAD(P)H: убихинон-оксидоредуктазы I (NDH-1) с измененной субстратной специфичностью на продукцию L-гистидина.....	108
4.2.2.1. Конструирование штаммов <i>E. coli</i> , содержащих мутантный комплекс NAD(P)H: убихинон-оксидоредуктазы I типа с измененной субстратной специфичностью.....	109
4.2.2.2. Анализ активности NADH: убихинон-оксидоредуктаз у штаммов, содержащих комплекс NDH-1 с различной субстратной специфичностью.....	110
4.2.2.3. Влияние экспрессии NDH-1 с измененной субстратной специфичностью на продукцию L-гистидина.....	112
4.3. Влияние инактивации гена <i>yjjK</i> (<i>ettA</i>), кодирующего трансляционный фактор EttA, на уровень накопления L-гистидина.....	113
4.4. Экспрессия гена мембранной H ⁺ -пирофосфатазы <i>Rhodospirillum rubrum</i> (H ⁺ -PPase ^{Rru}) в клетках <i>E. coli</i> и оценка возможности её функционирования в качестве единственной пирофосфатазы. Влияние экспрессии гена мембранной H ⁺ -PPase ^{Rru} на продукцию L-гистидина.....	115
4.4.1. «Гармонизация» кодонов гена мембранной пирофосфатазы H ⁺ -PPase ^{Rru} для экспрессии в <i>E. coli</i>	116
4.4.2. Замена гена неорганической пирофосфатазы PPase на H ⁺ -PPase ^{Rru} в хромосоме <i>E. coli</i> . Подтверждение Саузерн-блоттингом.....	118
4.4.3. Характеристики роста штаммов <i>E. coli</i> , содержащих экспрессионные кассеты с геном H ⁺ -PPase ^{Rru}	120
4.4.4. Анализ пирофосфатазной активности штаммов <i>E. coli</i> , содержащих растворимую PPase ^{Eco} и мембранную H ⁺ -PPase ^{Rru}	123
4.4.5. Экспрессия гена H ⁺ -PPase ^{Rru} приводит к увеличению выхода белка YFP.....	125
4.4.6. Экспрессия гена H ⁺ -PPase ^{Rru} приводит к увеличению продукции L-гистидина штаммом-продуцентом <i>E. coli</i>	129
5. Заключение	131
Выводы.....	137
Список сокращений.....	138
Список цитируемой литературы.....	140

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность проблемы

В настоящее время незаменимая аминокислота L-гистидин (*L*- α -амино- β -имидазолпропионовая кислота; далее: гистидин или ГИС) находит всё более широкое применение в медицине, сельском хозяйстве фармацевтической и пищевой промышленности (DiNicolantonio et al., 2018, Holeček, 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 исходный субстрат. 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 являлось:

1. Поиск новых мишеней регуляторного воздействия АИКАР, усиление его превращения в нуклеотиды аденина.
2. Изучение новых подходов к обеспечению клеток *E. 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 он 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 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 пиррофосфатазы на ген мембранной пиррофосфатазы *hppa*^{Rru} 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+} -Pi) 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 продуктивность и накопление аминокислоты.

2. Обзор литературы

2.1. L-гистидин: применение, дальнейшие перспективы использования, путь биосинтеза и его регуляция в клетках энтеробактерий

2.1.1. L-гистидин: применение, перспективы использования и получение путем микробиологического синтеза

L-гистидин (*L*- α -амино- β -имидазолилпропионовая кислота, далее: гистидин или ГИС) – гетероциклическая протеиногенная аминокислота. Он входит в состав белков всех живых организмов, в частности, его содержание в гемоглобине составляет до 10%. Долгое время ГИС относили к условно-незаменимым аминокислотам; в настоящее время установлено, что он не синтезируется в организме *de novo*, т. е. является незаменимой аминокислотой, которая должна обязательно поступать с пищей (Kopple and Swendseid, 1975). Поэтому ГИС является существенным компонентом питательных смесей для новорожденных детей, а также входит в состав препаратов для парентерального питания. Кроме того, ГИС добавляют в корм животных (Araki and Nakayama, 1971). Следует отметить, что как дефицит ГИС в крови, так и его избыток, связанные с некоторыми наследственными заболеваниями, вызывают у детей задержку психического и интеллектуального развития, приводят дефектам речи и психическим нарушениям (Хлыбова и Циркин, 2006).

У взрослых недостаточное поступление в организм ГИС, особенно в сочетании с дефицитом фолиевой кислоты (фолата), в связи со снижением синтеза гемоглобина способствует развитию анемии, а также экземы (Хлыбова и Циркин, 2006). С другой стороны, как было выявлено при геномном секвенировании, люди, несущие мутации, частично снижающие активность гистидин аммониалязы (гистидазы), и имеющие вследствие этого повышенное содержание в крови гистидина, в меньшей степени подвержены заболеваниям коронарных сосудов и инфаркту миокарда (Yu et al., 2015).

ГИС как природное органическое соединение имеет важные и уникальные свойства. Из всех боковых цепей аминокислот только имидазольное кольцо ГИС обладает буферной способностью, присущей также гистидин-содержащим пептидам

(ГСД), в частности, карнозину (β -аланил-L-гистидину, далее, КАР). Именно эти соединения при интенсивной физической нагрузке в значительной степени обеспечивают способность скелетных мышц и мышцы сердца выдерживать накопление в них кислоты во время анаэробного гликолиза (Abe, 2000, Boldyrev et al., 2013). По этой причине ГИС и КАР применяют в спортивной медицине для повышения выносливости при физической нагрузке (Suzuki et al., 2006, Derave et al., 2010). С буферной способностью ГИС связано и его использование в качестве компонента растворов для сохранения трансплантируемых органов и растворов, применяемых в сердечной хирургии (Rao et al., 2018). Благодаря имидазольному кольцу ГИС и КАР образуют комплексы с ионами металлов, такими, как железо, никель, медь, кобальт, кадмий, ртуть и цинк. Именно с высоким содержанием ГИС связана способность молекул гемоглобина и миоглобина присоединять железо; ГИС всегда присутствует в активных центрах металлсодержащих ферментов. Поскольку ряд металлов проявляют свою токсичность, в частности, способствуя образованию свободных радикалов в реакции Фентона, ГИС и ГСД, образуя с ними комплексы, хелатируют их и тем самым ослабляют их вредное действие (Velez et al., 2018, Smolik et al., 2010). Антиоксидантная активность ГИС и ГСД обусловлена также их способностью обезвреживать активные формы кислорода (ROS), азота (RNS) и пероксильные радикалы, предотвращать перекисное окисление липидов (ПОЛ) (Lee et al., 1999, Decker et al., 2001, Fresta et al., 2020). В этом отношении более эффективен КАР, поэтому его специально синтезируют и используют как антиоксидант в медицине и как пищевую добавку. Однако при поступлении в кровь он быстро расщепляется ферментом карнозиназой до своих компонентов – β -аланина и ГИС. В клетках соответствующих органов из них под воздействием карнозинсинтазы снова образуется КАР, который обычно здесь более стабилен (Boldyrev et al., 2013).

В организме ГИС может декарбоксилироваться с образование гистамина, который способен взаимодействовать с 4 типами рецепторов разных клеток, оказывая многообразные физиологические эффекты (Thangam et al., 2018).

В частности, в клетках мозга гистамин выполняет роль нейротрансмиттера. Через воздействие на гипоталамус гистамин изменяет углеводный метаболизм и,

вызывая чувство насыщения, влияет на потребность в пище (Yoshimatsu et al., 2002, Gotoh et al., 2009; Li et al., 2016; DiNicolantonio et al., 2018), а также повышает психическую активность и интеллектуальную трудоспособность (Попова и др, 2010, Sasahara et al., 2015, Babizhayev et al., 2015). Кроме того, гистамин является медиатором аллергических реакций (Parsons et al., 2006, Thangam et al., 2018).

Катаболизм ГИС, начинающийся с его дезаминирования, приводит к образованию *trans*-урокианиновой кислоты (урокианата). Этот процесс интенсивно протекает в коже, где источником ГИС является богатый этой аминокислотой барьерный белок кожи филаггрин. Накапливающийся здесь урокианат участвует в формировании «природного увлажняющего фактора» (Scott et al., 1982, Kezic, 2009,) и действует как основное УФ-поглощающее соединение. Следует отметить, что урокианат, в связи с его солнцезащитными свойствами, широко используется в косметической промышленности (Araki and Nakayama, 1975, Gibbs et al., 2008). Дальнейший катаболизм урокианата сопровождается образованием глутамата с использованием тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФ, THF). С этим связано применение ГИС для уменьшения дозы и, следовательно, токсичности противоракового препарата метотрексата, подавляющего синтез THF (Kanarek et al., 2018).

ГИС уменьшает образование провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α ; TNF- α) и интерлейкинов IL-1 β и IL-6 (Feng et al., 2013, Fresta et al., 2020). Механизм такого действия остаётся неизвестным. Следует отметить, что, в свою очередь, неспецифическое системное воспаление стенок сосудов способствует развитию атеросклероза. Свободный ГИС и поступающие с пищей в организме человека его сульфурированное производное, эрготионеин (2-меркапто-гистидин триметил-бетаин) (Vorodina et al., 2020), а также ГСД, к которым кроме КАР относятся менее подверженные действию карнозиназы N-ацетилкарнозин (N-ацетил- β -аланил-L-гистидин), гомокарнозин (гамма-аминобутирил-L-гистидин) и ансерин (β -аланил-1-метил-L-гистидин) как естественные метаболиты живых организмов не токсичны, не имеют мутагенной активности и, в то же время, обладают перечисленными выше уникальными биохимическими и физиологическими свойствами. В связи с этим они

находят всё более широкое применение в современной медицине, пищевой и фармацевтической промышленности.

Полезные физиологические эффекты, первоначально установленные в опытах на модельных животных (мышах и крысах), свидетельствовали о перспективности применения ГИС и КАР для профилактики и лечения ряда заболеваний.

Исследования, проведенные на людях, всё ещё не многочисленны, но уже можно считать доказанным эффективность использования ГИС, КАР и других ГСД при возрастных патологиях, которые приобрели большое значение в связи с возросшей продолжительностью жизни (Cararo et al., 2015). Это – метаболический синдром (DiNicolantonio et al., 2018), атеросклероз, сердечнососудистая недостаточность (Попова и др, 2010) катаракта (Babizhayev et al., 2009), болезни Альцгеймера (Cornelli et al., 2010) и Паркинсона (Boldyrev et al., 2008), злокачественные опухоли (Kanarek et al., 2018), нарушение когнитивных функций и физических возможностей (Szczesniak et al., 2014). Метаболический синдром характеризуется несколькими признаками, опасными для здоровья и жизни, такими как устойчивость к инсулину, ожирение, дислипидемия, повышенное давление и увеличение уровня провоспалительных цитокинов (Huang, 2009). Он включает подгруппу пациентов с высоким риском развития сердечнососудистых заболеваний и диабета 2 типа. Сравнительно недавно проведенное исследование показало положительный эффект от приёма ГИС (по 2 г, 2 раза в день, в течение 12 недель) у группы пожилых женщин с метаболическим синдромом. По сравнению с контрольной группой, у принимавших ГИС повысилась чувствительность к инсулину, заметно снизилась масса тела, улучшились показатели крови в отношении холестерина и жирных кислот, а маркеры системного воспаления (TNF- α и IL-6) и окислительного стресса в крови уменьшились (Feng et al., 2013 Sun et al., 2014). Было также вновь продемонстрировано, что добавка ГИС защищает от оксидативного стресса при анемии, вызванной хронической болезнью почек (Vera-Aviles et al., 2018), и оказывает позитивный эффект при атопическом дерматите (экземе) (Tan et al., 2017).

Важной физиологической роли ГИС и ГСД в жизнедеятельности организма, их применению для профилактики и лечения заболеваний, повышения физической и

умственной работоспособности посвящён ряд обзоров отечественных (Хлыбова. и Циркин, 2006, Попова и др, 2010, Boldyrev et al., 2013, Babizhayev et al., 2015, Prokorieva et al., 2016) и зарубежных авторов (DiNicolantonio et al., 2018, Holeček, 2020).

В последние годы появляются новые оригинальные исследования, объясняющие механизм действия ГИС и ГСД и подтверждающие их ценные лечебно-профилактические свойства, позволяющие расширить область применения этих соединений в медицине (Fresta et al., 2020). В частности, КАР и другие ГСД улучшают состояние пациентов при гриппе и короновирусных инфекциях (Babizhayev et al., 2014), поскольку в патогенезе этих заболеваний большое значение имеют мощный выброс провоспалительных интерлейкинов и окислительный стресс, которые этими пептидами подавляются.

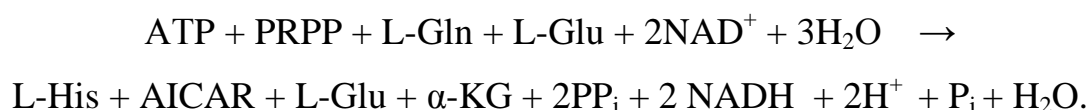
Таким образом, ГИС представляет несомненный коммерческий интерес, и его получают в промышленных масштабах. Основная часть производимого в мире ГИС доступна на рынке в виде гистидин гидрохлорида, либо свободного основания (Ikeda, 2003). Промышленное получение ГИС осуществляется двумя основными способами: гидролизом белоксодержащих субстратов и микробиологическим (микробным) синтезом. Современный процесс получения ГИС из глюкозы путем микробного синтеза является наиболее перспективным методом для коммерческого производства данной аминокислоты. К настоящему времени известен ряд промышленных штаммов-продуцентов ГИС на основе *Corynebacterium glutamicum*, *Serratia marcescens* и *Escherichia coli* (Ikeda, 2003, Araki and Nakayama, 1975, Kulis-Horn, 2014, Kisumi et al., 1987, Клячко а соавт, 1998). Тем не менее, ГИС на сегодняшний день остается одной из самых дорогостоящих на рынке аминокислот. Поэтому, конструирование высокопродуктивных штаммов создаст возможность для увеличения производства ГИС и снижения его цены, что расширит доступность его для дальнейших исследований и применения в различных областях медицины, промышленности и сельского хозяйства.

2.1.2. Биосинтез L-гистидина и его регуляция в клетках энтеробактерий

1.1.2.1. Путь биосинтеза L-гистидина и его связь с биосинтезом пуринов. *his*-оперон *E. coli*

Путь биосинтеза ГИС был впервые установлен у *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) (Brenner, Ames, 1971), а позднее был подробно описан и для *E. coli* (Winkler, 1987, Winkler, Ramos-Montañez, 2009). Этот путь состоит из 10 ферментативных реакций, которые катализируются 7-ю ферментами, кодируемыми 8-ю генами *his*-оперона (см. ниже). Продукты 3-х из них – *hisI*, *hisB* и *hisD* – это бифункциональные ферменты, катализирующие по 2 реакции, а 2 гена – *hisH* и *hisF* кодируют две субъединицы одного гетеродимерного фермента HisHF, имидазолглицеролфосфат синтазы, который катализирует две ступени одной реакции (Рисунок 1). Этот фермент относится к семейству глутаминамидотрансфераз, образующихся путем соединения двух разрозненных субдоменов - акцепторного домена и домена гидролиза глутамина (Myers et al., 2005).

Суммарная реакция биосинтеза ГИС:



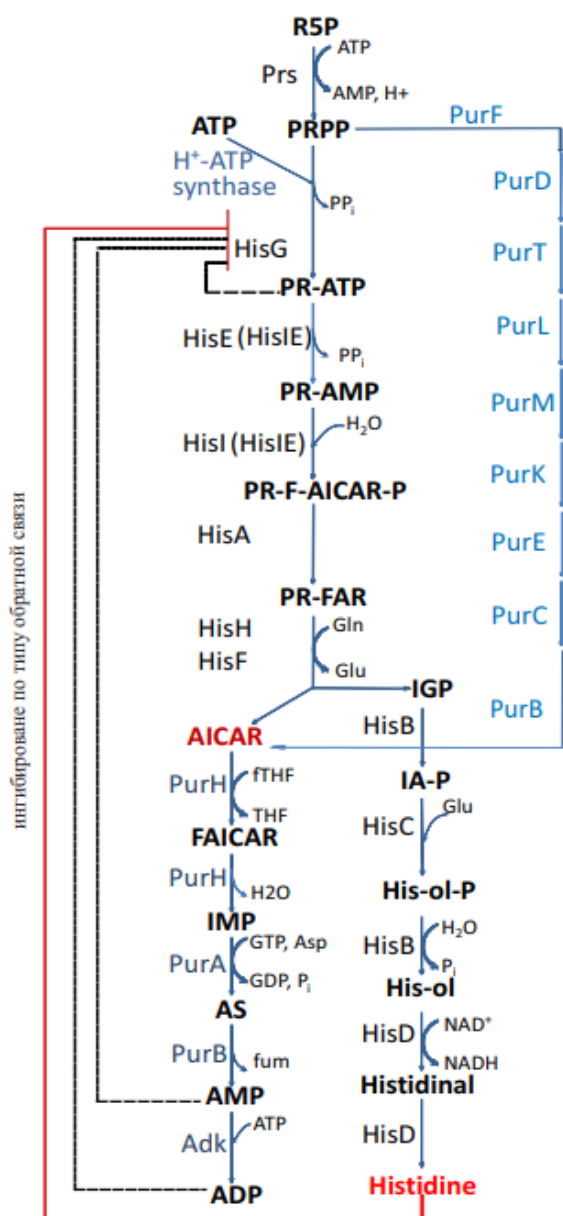


Рисунок 1 – Путь биосинтеза ГИС в клетках *E. coli*, его аллостерическая регуляция и связь с биосинтезом пуринов.

R5P, рибозо-5-фосфат; PRPP, фосфорибозил пирозофосфат; PR-АТФ, фосфорибозил-АТФ; PR-АМФ, фосфорибозил-АМФ; PR-F-AICAR-P, фосфорибозилформимино-АИКАР-фосфат; PR-FAR, фосфорибозилформимино-АИКАР-фосфат; AICAR, 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид; FAICAR, 5-фосфорибозил-формамидо-карбоксамид; IMP, инозин-5-монофосфат; AS, аденилосукцинат;

АМФ, аденозинмонофосфат; АДФ, аденозиндифосфат; АТФ, аденозин трифосфат; IGP, имидазол глицеролфосфат; IA-P, имидазол ацетолфосфат; His-ol-P, L-гистидинолфосфат; His-ol, L-гистидинол; Histidinal, L-гистидиналь; Histidine, L-гистидин; Prs, рибозо-фосфат дифосфокиназа; HisG, АТФ-фосфорибозилтрансфераза; HisIE, бифункциональный фермент фосфорибозил-АТФ пирозофатаза/фосфорибозил-АМФ циклогидролаза; HisA, фосфорибозилформимино-5-аминоимидазол карбоксамид рибонуклеотид изомеразы; HisHF, имидазолглицеринфосфат синтаза; HisB, бифункциональный фермент имидазолглицеринфосфат дегидрогеназа/гистидинол-фосфатаза; HisC, гистидинол-фосфат аминотрансфераза; HisD, бифункциональный фермент гистидинол/гистидиналь дегидрогеназа; PurH, бифункциональный фермент АИКАР трансформилаза/ИМФ циклогидролаза; PurA, аденилосукцинат синтаза; PurB, аденилосукцинат лиаза; PurF, амидофосфорибозилтрансфераза; PurD, фосфорибозиламин-глицин лигаза; PurT, фосфорибозил-глицинамид формил трансфераза; PurL, фосфорибозил-формилглицинамид синтаза; PurM, фосфорибозил-формилглицинамид циклолигаза; PurK, 5-(карбоксо амино)-имидазол-рибонуклеотид синтаза; PurE, N⁵-карбоксоаминоимидозол рибонуклеотид мутаза; PurC, фосфорибозил амиоимидазол-сукцинат карбоксамид синтаза; Adk, аденилат киназа; Gln, L-глутамин; Glu, L-глутамат; fTHF, формил-тетрагидрофолат; THF, тетрагидрофолат; Asp, L-аспартат; GTP, гуанозинтрифосфат; GDP, гуанозиндифосфат; PPi, неорганический пирозофосфат; Pi, неорганический фосфат; NAD⁺/NADH, никотинамидадениндинуклеотид окисленная/восстановленная форма; fum, фумаровая кислота. Ретроингибирование фермента HisG обозначено красной линией; конкурентное ингибирование АТФ-ФРТ, АМФ и АДФ обозначено черной пунктирной линией.

Субстратами для первой реакции синтеза гистидина являются

фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) и АТФ. В свою очередь, ФРПФ синтезируется из рибозо-5'-фосфата (R5P) и АТФ. Эту реакцию катализирует фермент фосфорибозилпирофосфат синтетаза (или рибозо-фосфат дифосфокиназа, у *E. coli* – PpsA). При этом ФРПФ участвует также в биосинтезе пуриновых, пиримидиновых и пиридиновых нуклеотидов, тиамина и триптофана.

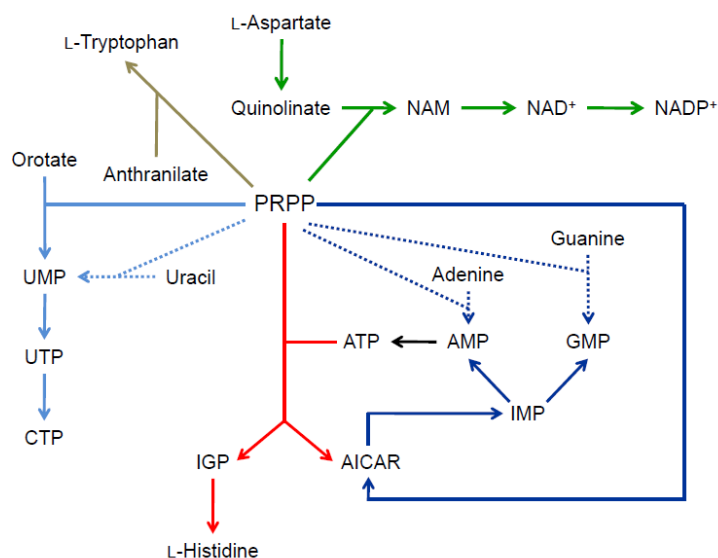


Рисунок 2 – Связь путей биосинтеза L-гистидина, L-триптофана, пуриновых, пиримидиновых и пиридиновых нуклеотидов.

Путь биосинтеза *de novo* каждого соединения обозначен сплошными линиями разного цвета. В частности, красным цветом обозначен путь биосинтеза ГИС, а синим - путь биосинтеза пуринов.

Как показано на Рисунках 1, 2 и видно из приведенной реакции, в процессе биосинтеза ГИС образуется побочный продукт – АИКАР, который является также промежуточным соединением в пути биосинтеза пуринов *de novo* и должен превратиться в этом пути в АМФ и далее в АДФ для восстановления пула АТФ. Если же по какой-то причине это превращение не осуществляется, внутриклеточный пул АТФ может резко снижаться (см. ниже), что нарушает жизнеспособность клеток. В норме такого снижения не происходит благодаря наличию механизмов строгой регуляции биосинтеза ГИС. Таким образом, пути биосинтеза гистидина и пуринов тесно взаимосвязаны.

У представителей семейства *Enterobacteriaceae* – *S. typhimurium*, *E. coli* и *Serratia*

marcescens гены, кодирующие все необходимые ферменты для биосинтеза ГИС, сосредоточены в одном опероне и регулируются совместно (Winkler, 1987; Carlomagno et al., 1988, Winkler and Ramos-Montañez, 2009). Опероны *E. coli* и *S. typhimurium* содержат 7389 п.н. и 7438 п.н., соответственно, с общей гомологией 81%. Последовательность генов в опероне не соответствует порядку, в котором ферменты, кодирующие эти гены, принимают участие в биосинтезе ГИС (Рисунок 3).

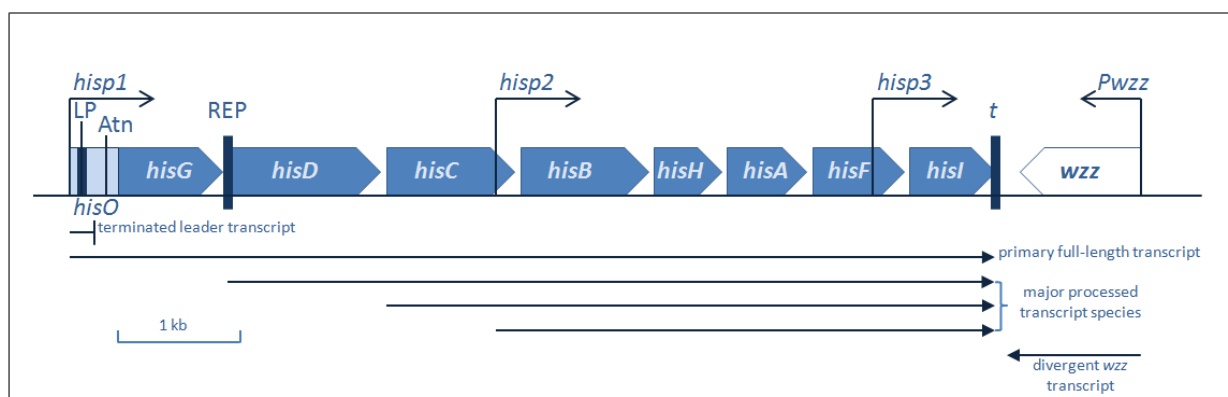


Рисунок 3 – Схема организации *his*-оперона *E. coli* и *S. typhimurium*.

hisp1, основной промотор *his* оперона; LP, лидерный пептид; Atn, *his* аттенюатор; *hisp2* и *hisp3*, внутренние промоторы *his* оперона; t, терминатор оперона; REP, повторяющаяся внегенная палиндромная последовательность между *hisG* и *hisD* у *S. typhimurium*, но отсутствующая у *E. coli*; *Pwzz*, промотор гена *wzz*. Стрелки внизу диаграммы показывают длину транскриптов (Winkler and Ramos-Montañez, 2009. Адаптировано).

2.1.2.2. Регуляция биосинтеза L-гистидина в клетках *E. coli*

Разнообразные регуляторные механизмы, обеспечивающие сбалансированный синтез клеточных метаболитов и, в частности, аминокислот, имеют огромное значение для адаптации живых организмов к меняющимся условиям. Их наличие позволяет предотвращать нерациональное использование углерода и энергии при благоприятных условиях, они важны для выживания в экстремальных условиях и реализуются путем временной активации того или иного биосинтетического пути. Эти регуляторные механизмы разнообразны и, как правило, включают контроль активности ключевого фермента пути биосинтеза, а также контроль транскрипции и трансляции соответствующих генов или оперонов. Ключевым ферментом пути биосинтеза ГИС является Mg^{2+} -зависимая АТФ-фосфорибозилтрансфераза (АТФ-ФРТ; ЕС 2.4.2.17),

катализирующая конденсацию АТФ с ФРПФ с образованием фосфорибозил-АТФ (PR-АТР) и пирогосфата (PP_i); у *E. coli* этот фермент кодируется геном *hisG* (Рисунки 1 и 3). После раскрытия пуринового кольца на третьем этапе биосинтеза, последующего использования на пятом этапе фрагмента аденина для формирования имидазольного кольца гистидина и образования на основе аденинового имидазольного кольца побочного продукта – АИКАР (Moyed and Magasanik, 1960; Winkler and Ramos-Montañez, 2009; Vázquez-Salazar et al., 2018), АТФ фактически целиком выводится из клеточного пула. Это определяет исключительную важность обеспечения его регенерации в случае сверхпродукции данной аминокислоты.

Фермент АТФ-ФРТ принадлежит к суперсемейству ферментов фосфорибозилтрансфераз (ФРТаз), которые катализируют реакцию конденсации ФРПФ с азотистыми основаниями в присутствии бивалентных катионов. Выделяют две формы этого фермента: длинную форму белка (HisGL), обнаруженного в растениях, грибах и большинстве бактерий, в том числе *E. coli*, и короткую форму (HisGS), присутствующую в археях и некоторых бактериях. К настоящему времени известны пространственные структуры некоторых фосфорибозилтрансфераз, в том числе, АТФ-ФРТазы из *E. coli* (Lohkamp et al., 2004, Pedreño et al., 2012, Mittelstädt et al., 2018).

АТФ-ФРТ (HisG) как ключевой фермент пути биосинтеза подвержен различным типам модуляции его активности продуктами и субстратами реакции. Ряд работ указывает на то, что данный субъединичный белок активен в виде гомогексамера и способен при связывании с ГИС менять конформацию, блокируя доступ субстрата к активному центру с переходом в неактивное состояние (Pedreño et al., 2012, Mittelstädt et al., 2016).

АМФ и АДФ являются конкурентными ингибиторами для обоих субстратов, ФРПФ и АТФ, тогда как ГИС ингибирует фермент по аллостерическому механизму, и область связывания с ингибитором пространственно удалена от активного центра фермента. При этом ингибирование АМФ и ГИС является синергическим, и ГИС вызывает подавление связывания с АТФ в пользу ко-ингибиторов АМФ и АДФ (Morton and Parsons, 1977a, 1977b).

Как было отмечено выше, 7 ферментов пути биосинтеза гистидина кодируются 8-ю структурными генами, входящими в состав оперона – *hisLGDCBHAFI* (далее *his*-оперон). Схема организации *his*-оперонов *E. coli* и *S. typhimurium* показана на Рисунке 3. Транскрипция генов биосинтеза ГИС у *E. coli* находится под т.н. «строгим контролем» (stringent control) и активируется в ответ на аминокислотное голодание (Winkler and Ramos-Montañez, 2009). Инициация транскрипции позитивно регулируется эффекторными молекулами – гуанозин тетрафосфатом (ppGpp) и гуанозин пентафосфатом (pppGpp), которые накапливаются в условиях аминокислотного голодания (Chatterji and Ojha, 2001).

Трансляционная регуляция является частью аттенуационного механизма, регулирующего транскрипцию генов биосинтеза ГИС у *E. coli*. К основным регуляторным элементам *his*-оперона относится участок связывания РНК полимеразы (промотор *hisP1*), участок аттенуации (Atn) и транскрибируемый и транслируемый участок между промотором и аттенуатором, который часто называют геном *hisL*, кодирующим лидерный пептид (LP).

Транскрипция всех генов биосинтеза ГИС сопряжена с трансляцией лидерного пептида (LP). В процессе трансляции этого пептида, рибосома реагирует на доступность аминоацилированной гистидином тРНК (гистидил-тРНК, тРНК^{Гис}), влияя таким образом на образование двух возможных вторичных альтернативных структур синтезируемой мРНК. Если тРНК^{Гис} доступна для осуществления высокой скорости трансляции лидерного пептида, транскрипция всего оперона прекращается за счет образования Rho-независимой терминирующей шпильки. Однако, при задержке трансляции лидерного пептида в связи с недоступностью гистидина и, соответственно, тРНК^{Гис}, происходит образование анти-терминирующей шпильки с последующим продолжением транскрипции всего *his*-оперона.

На Рисунок 4 продемонстрирован механизм аттенуации транскрипции *his*-оперона на примере *Salmonella enterica*. 5'-регуляторная область *his*-оперона кодирует лидерный пептид, состоящий из 16 аминокислот, включая 7 последовательных His кодонов, за которыми следует терминатор транскрипции. (А) В условиях высокого

уровня тРНК^{Гис}, рибосомная трансляция происходит через лидерный пептид к его стоп-кодону. Это приводит к образованию E : F аттенуаторной шпильки и ингибированию дальнейшей транскрипции структурных генов *his*-опреона. (Б) В условиях недостатка тРНК^{Гис}, трансляция через His кодоны замедляется, и остановленная рибосома позволяет сформировать альтернативную вторичную структуру РНК, которая препятствует образованию аттенуатора. Ингибирование образования аттенуатора позволяет РНК полимеразе продолжать транскрипцию структурных генов *his*-оперона. (С) В условиях, когда транскрипция с *his* промотора не сопряжена с трансляцией, предположительно образуется аттенуатор E : F, который ингибирует дальнейшую транскрипцию структурных генов *his*-оперона.

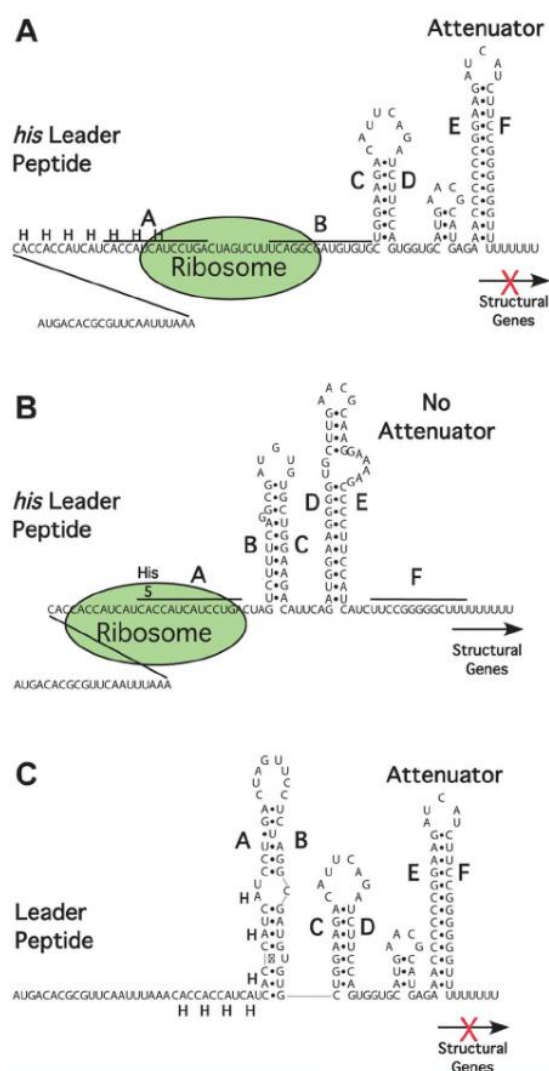


Рисунок 4 – Механизм аттенуации транскрипции *his*-оперона на примере *Salmonella enterica* (Johnston et al., 1980. Адаптировано).

2.1.2.3. Регуляторная роль АИКАР в клеточном метаболизме

Как уже было отмечено, АИКАР (также известный как ZMP) является интермедиатом в пути биосинтеза пуринов *de novo*, а также побочным продуктом в пути биосинтеза ГИС. В пути биосинтеза пуринов АИКАР превращается в ИМФ благодаря двум последовательным реакциям, катализируемым ферментами АИКАР-трансформилазой и ИМФ-циклогидролазой, которые обычно представлены одним белком PurH. Реакция трансформилирования зависит от 10-формил-тетрагидроfolата (10f-ТНФ). Следует отметить, что тетрагидроfolат и его производные являются важнейшими кофакторами, которые вовлечены в процесс формирования одноуглеродных фрагментов, необходимых при биосинтезе нуклеотидов и аминокислот.

В течение последних десятилетий установлена важная роль АИКАР как глобального регулятора клеточного метаболизма. Кроме того, будучи структурным аналогом АМФ, АИКАР может заменять его *in vivo* в некоторых регуляторных взаимодействиях (Bochner and Ames, 1982, Winkler and Ramos-Montañez, 2009, Daignan-Fornier and Pinson, 2012). Первоначально было показано, что при вызванном различными воздействиями дефиците фолиевой кислоты и, соответственно, кофактора 10f-ТНФ, в клетках *Salmonella enterica* всегда накапливается АИКАР (ZMP) и его пиррофосфорилированное производное – ZTP. В связи с этим было высказано предположение, что ZTP является алармоном (сигналом тревоги), сигнализирующими о нарушении синтеза 10f-ТНФ и одноуглеродного метаболизма в целом. Проведенные спустя много лет исследования с использованием метаболомики подтвердили данные о том, что при воздействии антиfolатов в клетках бактерий быстро накапливается АИКАР (ZMP) (Kwon et al., 2010, Wei et al., 2011, Chakraborty et al., 2013).

Наконец, не так давно было продемонстрировано существование широко распространенного среди разных бактерий специального класса рибопереключателей (riboswitches), которые селективно связывают АИКАР (ZMP) и ZTP. Эти рибопереключатели – регуляторные элементы на основе РНК (Serganov and Patel, 2012) – чувствительны к наномолярным концентрациям в клетках указанных лигандов.

При увеличении, в частности, пула ZMP, они активируют как экспрессию генов, контролирующую образование одноуглеродных фрагментов, так и экспрессию генов биосинтеза пуринов *de novo* (Jones and Ferre-D'Amare, 2015, Kim et al., 2015, Ren et al., 2015). Таким образом, внутриклеточная концентрация фолата и, соответственно, 10f-THF регулируют синтез фолата и C1 метаболизм через 10f-THF-зависимую реакцию превращения АИКАР (ZMP) в ИМФ. Следует отметить, что у *E. coli* представители ZMP/ZTP-рибопереключателей не обнаружены. Поэтому возможно, что у данного организма эти нуклеотиды контролируют тот же самый процесс с помощью других, пока не установленных регуляторов (Kim et al., 2015). Интересно, что у *Bacillus subtilis* соединение ZTP взаимодействует, наряду с соответствующими рибопереключателями, также с регуляторным белком ZagA, который обеспечивает в клетках гомеостаз и распределение цинка, необходимого, в частности, для функционирования первого фермента пути биосинтеза фолата (Chandrangsu et al., 2019).

Физиологическая роль АИКАР исследовалась также у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Было обнаружено, что АИКАР участвует в регуляции генов пути биосинтеза пуринов и Pho-регулона, контролирующего утилизацию фосфатов. При этом в регуляцию биосинтеза пуринов вовлечён также предшественник АИКАР, сукцинил-АИКАР (С-АИКАР) (Rebora et al., 2005, Pinson et al., 2009). По результатам транскриптомного анализа, при увеличении внутриклеточной концентрации АИКАР, изменяется уровень экспрессии 50 генов, причем, у 41 из них он повышается. При этом, в большинстве случаев, действие АИКАР опосредовано его связыванием с транскрипционным фактором Pho2p, который, в свою очередь, взаимодействует с фактором Bas1p для активации экспрессии генов пути биосинтеза пуринов, и с фактором Pho4p для активации пути утилизации фосфатов. Таким образом, поскольку биосинтез пуринов ведёт к значительному расходу фосфата, ко-регуляция этих метаболических путей с помощью транскрипционного фактора Pho2p и молекулы АИКАР обеспечивает эффективный механизм поддержания в клетках дрожжей пурин-фосфатного гомеостаза (Pinson et al., 2009, Kim et al., 2015).

У млекопитающих АИКАР замещает АМФ в реакциях активации АМФ-киназы (АМР-активируемая протеинкиназа, АМРК). АМРК – глобальный регулятор

метаболических процессов, контролирующей энергетический статус организма эукариот (Hardie et al., 1998, Hardie et al., 1999). В связи с этим, дефосфорилированная форма АИКАР, рибозид АИКАР, также известный как «акадезин» (в отличие от нуклеотида его обозначают АИКАр (AICAr)), который можно получать с помощью микробиологического синтеза (Лобанов и др., 2011), обладает широким терапевтическим потенциалом. В организме он фосфорилируется аденозинкиназой в АИКАР, способный активировать АМРК.

Имитируя состояние энергетического стресса, АИКАР нормализуют углеводный (Rutter et al., 2003) и липидный обмен (Gaidhu et al., 2009), подавляет рост опухолевых клеток (Swinnen et al., 2005). Показана эффективность АИКАР в предупреждении сахарного диабета II типа (Pold et al., 2005). АИКАР индуцирует апоптоз, он эффективен при хронических (Campas et al., 2003) и острых лейкозах (Sengupta et al., 2007).

Как уже отмечалось, АИКАР является предшественником и аналогом АМФ. При этом он может заменять АМФ *in vivo* в некоторых регуляторных функциях и у бактерий. Так, было обнаружено, что у *Salmonella enterica* АИКАР, как и естественный аллостерический регулятор, АМФ, подавляет активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы, ключевого фермента глюконеогенеза (Dougherty et al., 2006). Кроме того, было показано негативное влияние накопления внутриклеточного АИКАР у мутантов PurH *S. enterica* на биосинтез тиамина (Allen et al., 2002). Как оказалось, это вызвано снижением пула кофермента А (CoA), в свою очередь, обусловленного подавлением активности пантоат-β-аланин лигазы (PanC) (Bazurto and Downs, 2014). В дальнейшем, при метаболомном исследовании было установлено, что этот эффект связан с тем, что с накоплением АИКАР в клетках увеличивается содержание глобального регулятора - циклического АМФ (цАМФ) (Bazurto et al., 2018).

Важно отметить, что АИКАР может проявлять как активирующее, так и ингибирующее действие. В давней работе (Kuramitsu et al., 1964) было показано, что АИКАР может индуцировать активность ИМФ-дегидрогеназы и КМФ-аминазы.

Более того, в некоторых работах было продемонстрировано, что у *S. cerevisiae* накопление АИКАР может репрессировать как биосинтез пуринов (Carmany et al.,

2003), так и потенциально одну или несколько реакций биосинтеза ГИС (Bachhawat et al., 2005); регуляторные механизмы, приводящие к подобным эффектам, остаются неизвестными.

Поскольку АИКАР образуется в качестве побочного продукта биосинтеза ГИС, и его образование связано с выведением АТФ из клеточного пула, что критично для клеток, можно предполагать, что его накопление может быть сигналом к ограничению биосинтеза ГИС. Таким образом, представляется важным изучение роли АИКАР в регуляции биосинтеза ГИС, а также в регуляции его собственного синтеза.

2.1.3. Штаммы-продуценты L-гистидина: получение, особенности и перспективы применения методов рационального дизайна в их конструировании

2.1.3.1. Получение штаммов-продуцентов L-гистидина

Исходно, ГИС получали путем гидролиза белков (Ikeda, 2003) или путем химического синтеза по Штреккеру (Harada, 1963, Shibasaki and Kanai, 2008). С ростом потребности в ГИС в связи с перспективами всё более широкого его применения (см. выше), а благодаря созданию достаточно эффективных бактериальных штаммов-продуцентов при крупнотоннажном производстве этой аминокислоты всё чаще используется микробиологический синтез. Мировой рынок ГИС оценивался в 211 млн долларов США в 2020 году; ожидается, что к концу 2026 года он достигнет 314 млн. долларов США, а в 2021-2026 годах будет расти в среднем на 5,8% (Market Report Titles; Global Histidine Market Research Report 2020; <https://www.marketstudyreport.com/reports>).

Первые продуценты ГИС были получены в 1970-х годах на основе штаммов *Corynebacterium glutamicum*, а затем и *Serratia marcescens* с использованием классического подхода, предполагающего нескольких циклов мутагенеза и селекции. После обработки мутагеном (обычно, нитрозогуанидином) отбирали мутанты, устойчивые к неметаболизируемым аналогам ГИС, таким как 1,2,4-триазол-3-аланин (TRA; репрессирует транскрипцию *his*-оперона, связываясь с тРНК^{Гис}, и подавляет

активность АТФ-ФРТ дикого типа), 2-метилгистидин (2МН), 2-тиазолаланин (2МН; ингибирует активность АТФ-ФРТ и/или гистидил-тРНК синтетазу) и другие (Araki and Nakayama, 1971, Araki et al., 1974). В результате были получены штаммы-продуценты *C. glutamicum*, у которых АТФ-ФРТ стала устойчивой к ингибированию конечным продуктом – гистидином, а синтез этого фермента - дерепрессирован (Araki and Nakayama, 1974). Дополнительные мутации, сообщающие аутокотрофность по лейцину, придающие устойчивость к аналогам пуриновых, пиримидиновых оснований и триптофана, а также к более высоким концентрациям ТРА привели к дальнейшему увеличению продукции ГИС (Araki et al., 1974, Araki, Nakayama, 1974).

При другом подходе, использующем традиционную селекцию, и методы генной инженерии, у *C. glutamicum* сначала получали мутантный вариант АТФ-ФРТ со снятым ретроингибированием, а затем ген *hisG^R*, несущий эту мутацию, экспрессировали на многокопийной плазмиде, что приводило к значительному накоплению ГИС в процессе ферментации полученного штамма (Araki and Nakayama, 1974, Mizukami et al., 1994). Этот штамм и его производные использовались для промышленного получения ГИС.

Следует отметить, что с созданием и разработкой новых генно-инженерных методов АТФ-ФРТ долгое время оставалась в центре внимания исследователей, которые стремились получить оптимальный вариант фермента, нечувствительный к регуляторным воздействиям. С этой целью использовали сайт-специфический мутагенез (Zhang et al., 2012), случайный мутагенез и рациональный дизайн фермента (Kulis-Horn et al., 2015). Дальнейшие попытки получения продуцента на основе *C. glutamicum* включали замену промотора перед геном *hisD* в сочетании со сверхэкспрессией с плазмиды генов *hisE* и *hisG*, что позволило увеличить накопление ГИС соответствующим штаммом (Cheng et al., 2013).

При создании продуцентов ГИС на основе *Serratia marcescens* сначала получили штамм, дефектный по гистидазе, не способный использовать эту аминокислоту в качестве источника углерода и азота. На его основе отбирали мутанты, устойчивые к аналогам ГИС. У одного из полученных мутантов, устойчивых к ТРА, были дерепрессированы ферменты пути биосинтеза гистидина, а у одного из мутантов,

устойчивого к 2МН было нарушено ингибирование АТФ-ФРТ конечным продуктом. При этом ни один из этих мутантов не накапливал значительного количества ГИС при ферментации. С помощью трансдукции фагом (PS20) эти мутации объединили в одном штамме, который стал продуцировать значительное количество аминокислоты (Kisumi et al., 1977; Sigiura and Kisumi, 1984, Kisumi et al., 1987). Наиболее эффективными продуцентами ГИС на основе *S. marcescens* являются плазмидные штаммы (патент Японии 61-271981). Эти продуценты содержат мутантный *his*-оперон или его фрагмент в составе малокопийной плазмиды (Патент Японии 61-271981) и использовались для промышленного получения указанной аминокислоты. Первый патент на использование *E. coli* для получения продуцента ГИС, связанный с клонированием генов, несущих мутацию устойчивости к аналогу гистидина, получен фирмой Ajinomoto (Sano and Tsuchida, 1980). В нашей стране продуценты ГИС на основе *E. coli* впервые были получены в лаборатории проф. Р.С. Шакулова во ВНИИгенетики. С этой целью сначала также отобрали мутант по АТФ-ФРТ ($HisG^R$), с нарушенным ингибированием фермента конечным продуктом. Это было сделано в специально сконструированном штамме, ауксотрофном по пуринам (*purF*) и дефектном по пуриннуклеозид фосфорилазе (*deoD*) и аденозин дезаминазе (*add*), не способном превращать аденин в нуклеотиды гуанина. Его рост на среде с аденином подавлялся ГИС, очевидно, в связи с прекращением синтеза АИКАР, который мог превращаться в гуанин. Среди мутантов, растущих в этих условиях, был отобран вариант, способный выделять небольшое количество ГИС в среду. Соответствующая мутация картировалась в гене *hisG* ($hisG^R$) (Аствацатурянц и др., 1998). На её основе после введения внеоперонных мутаций, вероятно, повышающих уровень экспрессии *his*-оперона, был получен штамм ВКПМ В-5945, который в процессе ферментации в лабораторных условиях накапливал в среде 10-12 г/л ГИС (Клячко и соавт., 1993). Более эффективный бесплазмидный продуцент ГИС на основе *E. coli*, штамм ВКПМ В-7270, был получен при отборе с использованием прежнего метода новой мутации в гене *hisG* и последующего введения дополнительных мутаций, вероятно, также повышающих экспрессию *his*-оперона и обеспечивающих биосинтез ГИС необходимыми кофакторами. Штамм В-7270 позволяет получать 16-17 г/л целевого

продукта со степенью конверсии глюкозы в ГИС 24-26% (Клячко и соавт., 1998). Мутация *hisG^R* в этом штамме была в дальнейшем охарактеризована. Она представляет собой единичную нуклеотидную замену в кодирующей области *hisG*, которая приводит к замене E271K в С-концевой части белка-фермента, состоящего из 299 аминокислотных остатков (Дорошенко и соавт., 2013).

В последующей работе Клячко и соавторов было показано, что сверхэкспрессия в таком штамме гена *purH*, кодирующего АИКАР трансформилазу/ИМФ циклогидролазу, улучшает продукцию ГИС (Клячко и соавт., 2006). Очевидно, что это связано с активацией превращения АИКАР в нуклеотиды пуринов. Кроме того, в клетки продуцента В-7270 на мультикопийной плазмиде вносили мутантный вариант фермента фосфорибозилпирофофосатсинтазы (PrsA), устойчивый к нуклеотидам пуринов, что, вероятно, повышало уровень синтеза ФРПФ. При этом также обнаружили позитивный эффект на продукцию ГИС (Klyachko et al., 2004a). Наконец, была предпринята успешная попытка повысить продукцию ГИС за счёт активации синтеза в пентозофосфатном цикле предшественника ФРПФ, рибозо-5-фосфата, путём клонирования на плазмиде гена *talB*, кодирующего трансальдолазу (Klyachko et al., 2004b).

Штаммы-продуценты, полученные описанными выше методами, имеют ряд существенных недостатков. В случае классического подхода, предполагающего неоднократные этапы мутагенеза и селекции, процесс отбора новых штаммов, даже в случае проведения полногеномного секвенирования, зачастую не позволяет установить причину повышенного уровня синтеза целевого продукта, а также приводит к возникновению множества однонуклеотидных замен (single-nucleotide polymorphism, SNPs), коротких и протяженных хромосомных делеций с неясными последствиями на рост биомассы и синтез целевого продукта. Подобная «генетическая отягощённость» может впоследствии явиться причиной нестабильности штамма-продуцента в процессе промышленного культивирования и, как следствие, снижения выхода целевого продукта. Общим недостатками плазмидных штаммов-продуцентов ГИС является необходимость добавления антибиотиков в ферментационную среду для

поддержания плазмиды с клонированными генами, замедленный рост клеток и, вследствие этого, увеличение продолжительности ферментации.

С развитием системной метаболической инженерии, появлением новых методик, позволяющих быстро и направленно вносить нужные мутации и фрагменты ДНК непосредственно в хромосому, такого рода «рациональный дизайн» широко применяют при создании штаммов-продуцентов, при необходимости сочетая его с методами традиционной селекции, существенно усовершенствованными, в частности, благодаря развитию техники высокопроизводительного скрининга. Так, например, в упоминавшейся работе Дорошенко и соавторов (Дорошенко и соавт., 2013) в результате последовательных направленных модификаций хромосомы на основе известного лабораторного штамма *E. coli*, MG1655 получен начальный продуцент ГИС, накапливающий около 5 г/л гистидина с конверсией 12%. Он содержал мутантный фермент АТФ-ФРТ со снятым ретроингибированием (HisG^{R}), делецию аттенуаторной области *hisL*, а также делецию гена глобального транскрипционного регулятора PurR, который репрессирует синтез ФРПФ (He et al., 1993, Sastry et al., 2019). Полученный штамм с известной структурой генома может быть использован в дальнейших экспериментах по метаболической инженерии с целью повышения выхода ГИС.

Таким образом, к настоящему времени известен ряд штаммов-продуцентов ГИС, принадлежащих к различным видам микроорганизмов и сконструированных с применением разных методов. Однако достигнутый выход ГИС из глюкозы всё ещё довольно далёк от теоретического максимума (73% mol/mol, или 63% г/г (согласно Varma et al., 1993)), а продуктивность штаммов не позволяет заметно сократить время ферментации. Очевидно, что возможности совершенствования продуцентов ГИС еще не исчерпаны. Сложность создания микробных продуцентов этой аминокислоты во многом обусловлена как высокой потребностью клеток продуцента в АТФ, так и одновременной взаимосвязью биосинтеза ГИС с синтезом одноуглеродных соединений и пуринов. Таким образом, поиск и применение неочевидных подходов для конструирования штаммов-продуцентов ГИС в сочетании с использованием

методов направленного редактирования генома могут значительно улучшить выход целевого продукта, снизить его себестоимость и расширить его практическое применение.

2.1.3.2. Потребность продуцентов L-гистидина в производных аденина

Уже давно, метаболическая связь между путями метаболизма ГИС и синтеза *de novo* пуринов у микроорганизмов была признана важной особенностью всего микробного метаболизма (Shedlovsky and Magasanik, 1962a). Как уже отмечалось, АТФ и ФРПФ являются общими предшественниками, связывающими биосинтез ГИС с биосинтезом пуриновых нуклеотидов (Рисунок 2).

Как видно на Рисунке 1, ранние этапы биосинтеза ГИС включают в себя цикл синтеза побочного продукта и одновременно предшественника пуриновых нуклеотидов – АИКАР. Конечный продукт – ГИС, регулирует функционирование этого цикла путем ингибирования активности фермента АТФ-ФРТ, осуществляющего конденсацию ФРПФ с АТФ. Таким образом, синтез нуклеотидов пуринов шунтируется только в той степени, в которой это необходимо клеткам для биосинтеза ГИС.

Было обнаружено, что у *S. typhimurium* при сверхсинтезе ГИС вследствие избавления фермента АТФ-ФРТ от ретроингибирования и дерепрессии *his*-оперона, бактерии становятся фенотипическими ауксотрофами по аденину. Видимо, это связано с истощением пула производных аденина, вызванного неконтролируемым использованием АТФ в цикле биосинтеза ГИС. Действительно, при получении мутантов-прототрофов по аденину, отбирались варианты со сниженным уровнем ферментативной активности АТФ-ФРТ (Johnston and Roth, 1979).

Похожие результаты были получены с мутантными вариантами АТФ-ФРТ у *E. coli* (Shedlovsky and Magasanik, 1962b). Описан частично ауксотрофный мутантный вариант HisH(F), который нуждался в добавлении ГИС, либо аденина для нормального

роста. Добавление в среду 2-триазоаланина, известного ингибитора активности АТФ-ФРТ, устраняло потребность клеток в ГИС или аденине. Также было показано, что штаммы *E. coli*, содержащие мутации, приводившие к частичному сдвигу рамки считывания в дистальной области промотора гена *hisH*, были способны к росту на среде без добавления ГИС при условии добавления в среду пуринов, таких как, например, инозин (Pons et al., 1988).

Все перечисленные наблюдения можно объяснить неконтролируемым потреблением АТФ на ранних этапах биосинтеза ГИС без адекватной регенерации предшественника биосинтеза пуринов АИКАР в нуклеотиды аденина (Рисунок 1). В частности, у мутантов HisH(F) биосинтез гистидина нарушен на этапе, когда пуриновое кольцо аденина размыкается, но последующее образование АИКАР блокировано. В условиях голодания по ГИС у таких мутантов *his*-оперон дерепрессирован, и АТФ-ФРТ активно функционирует, выводя АТФ из клеточного пула без его регенерации. В связи с этим мутанты HisH(F) используют для специфического снижения внутриклеточной концентрации АТФ (Johnson and Taylor, 1993).

В работе с продуцентом ГИС на основе *S. marcescens*, описанном выше, авторы обнаружили его нестабильность – появление нескольких быстрорастущих вариантов с уменьшенной продуктивностью. Оказалось, что это мутанты со сниженной активностью АТФ-ФРТ или восстановленной репрессией синтеза ферментов *his*-оперона. Было установлено, что рост исходного штамма стимулировался добавлением в среду аденина. Для того чтобы продуцент стабилизировать, у него были получены мутанты, устойчивые к специфическому аналогу аденина – 6-метил-пурину (6МП). Определение внутриклеточной концентрации АТФ показало, что в клетках исходного продуцента по сравнению с диким типом она значительно (почти в 5 раз) снижена. У ревертантов, а также у мутантов, устойчивых к 6МП её уровень был восстановлен, хотя и не в полной мере. Тем не менее, рост полученных мутантов больше не зависел от экзогенного аденина, и они были достаточно стабильны. Это произошло вследствие пятикратного повышения у них активности аденилосукцинат синтетазы, продукта гена

purA (Sugiura and Kisumi, 1984), что, очевидно, стимулировало регенерацию нуклеотидов аденина.

Таким образом, потребность продуцентов ГИС в производных аденина обусловлена нерегулируемым выведением АТФ из клеточного пула в условиях недостаточной его регенерации.

2.1.3.3. Потенциальные мишени для создания штаммов-продуцентов L-гистидина на основе *E. coli* методами рационального дизайна

Как и в случае создания продуцентов других метаболитов, для обеспечения сверхсинтеза ГИС необходимо решить следующие задачи: (i) активировать непосредственный путь биосинтеза, устранив все негативные механизмы его регуляции; (ii) усилить биосинтез всех предшественников ГИС; (iii) ограничить расход предшественников на синтез других метаболитов; (iv) обеспечить эффективный путь поступления в клетку исходных субстратов и микроэлементов; (v) обеспечить активный транспорт целевого продукта из клетки и предотвратить его обратное поступление в клетку; (vi) усилить биосинтез необходимых кофакторов.

Как было описано выше, при создании продуцентов ГИС с использованием как традиционной селекции, так и с помощью генно-инженерных подходов, часть из этих задач была решена. Эти работы во многом явились предпосылкой для рационального изменения клеточного метаболизма с целью получения эффективного продуцента данной аминокислоты. Ключевым этапом при конструировании штаммов-продуцентов ГИС является получение мутантных вариантов АТФ-ФРТ, устойчивых к ингибированию, как конечным продуктом (аллостерическое ингибирование гистидином), так и альтернативными субстратами (конкурентное ингибирование АМФ, АДФ). Необходимо также дерепрессировать *his*-оперон, блокировать аттенюацию транскрипции, которая обеспечивается трансляцией продукта гена *hisL*. Для усиления биосинтеза предшественников следует удалить транскрипционный репрессор PurR. Данные подходы были успешно реализованы при получении

продуцента ГИС на основе штамма *E. coli* (Дорошенко и соавт., 2013). В других работах биосинтез ФРПФ повышали за счёт внесения мутации в ген *prsA*, кодирующий ФРПФ-синтетазу (Klyachko et al., 2004a), а также активировали образование рибозо-5-фосфата в пентозофосфатном цикле за счёт амплификации гена *talB* (Klyachko et al., 2004b). Очевидно также, что следует в достаточной степени обеспечить кофактором 10f-ТНФ реакцию трансформилирования АИКАР, катализируемую PurH. Для дальнейшего увеличения скорости биосинтеза и выхода ГИС штаммами-продуцентами необходимо проанализировать все описанные модификации, приводящие к увеличению целевого продукта с точки зрения структурных, метаболических, а также энергетических особенностей пути биосинтеза ГИС.

Как отмечалось, биосинтез ГИС является энергетически высокзатратным процессом. В частности, начиная с рибулозо-5-фосфата в пентозофосфатном цикле, на синтез 1 молекулы ГИС, требуется 6 молекул АТФ (Stephanopoulos et al., 1998). Более того, биосинтез ГИС имеет особенность, которая отличает его от биосинтеза других аминокислот: АТФ выступает здесь не только как кофактор, донор энергии, но и как структурный компонент для построения имидазольного кольца аминокислоты. Как было продемонстрировано выше, в процессе сверхсинтеза происходит усиленное выведение АТФ из клеточного пула. При этом образуется АИКАР – побочный продукт и одновременно предшественник пуриновых нуклеотидов, обладающий регуляторными свойствами, способный изменять метаболизм клетки, в частности, отвлекая её ресурсы от синтеза целевого продукта и, возможно, подавляя биосинтез ГИС. Следовательно, чтобы добиться высокой продуктивности и значительного накопления целевого продукта, необходимо устранить негативное влияние АИКАР на продукцию ГИС, ограничив в клетках продуцента его концентрацию. С этой целью необходимо обеспечить его максимальную конверсию в нуклеотиды аденина и дальнейшую эффективную регенерацию АТФ. Это является новой задачей для метаболической инженерии штаммов-продуцентов ГИС, а соответствующие генетические модификации – необходимые новые мишени при её реализации.

Следует отметить, что некоторые шаги в этом направлении делались и раньше.

Как было описано выше, с целью усиления превращения АИКАР в ИМФ амплифицировали ген *purH* (Клячко и соавт., 2006), а для устранения ауксотрофности по аденину получали мутации устойчивости к его аналогу 6МР, вероятно, усиливающие экспрессию *purA* (Sugiura and Kisumi, 1984). Однако целенаправленного комплексного исследования всех подходов, обеспечивающих решение вышеуказанной проблемы, ранее не предпринималось. Очевидно, что они включают и оптимизацию самого пути биосинтеза ГИС, предотвращающую необратимое истощение пула АТФ вследствие недостаточной активности HisH(F) (Winkler, 1987), и эффективное, обеспеченное кофактором 10f-ТНФ и высокой активностью PurH превращение АИКАР в ИМФ, и дальнейший повышенный синтез из него АМФ и АДФ. Наконец, это усиление образования АТФ из АДФ за счёт активности протонной H^+ -АТФ-синтазы, обеспеченное электрохимическим трансмембранным потенциалом («протон-движущей силой»). При этом следует максимально использовать потенциал образующихся в пути биосинтеза на каждую моль ГИС побочных продуктов: 2 молей NADH и 2 молей пирофосфата (PP_i). Они могут внести дополнительный вклад в образование «протон-движущей силы» и, следовательно, в процесс регенерации АТФ (см. ниже). В связи с этим, следующие главы обзора литературы посвящены краткому описанию биоэнергетики бактериальной клетки и неорганическому пирофосфату (PP_i) как потенциальному энергетическому фактору.

2.2. Биоэнергетика бактериальной клетки и повышение обеспеченности клеток АТФ

2.2.1. Пути образования АТФ, протон-движущая сила и протонная H^+ -АТФ-синтаза *E. coli*

Известно, что все клеточные формы жизни запасают большую часть своей энергии в форме высокоэнергетической молекулы – аденозинтрифосфата (АТФ), который образуется в результате субстратного и/или окислительного фосфорилирования. Субстратное фосфорилирование – характерная для всех живых

организмов реакция синтеза АТФ путём прямого переноса остатка фосфорной кислоты на АДФ с высокоэнергетического (фосфорилированного) промежуточного продукта; она является древним механизмом высвобождения энергии катаболизируемых соединений для нужд клетки. Окислительное фосфорилирование является важнейшей частью клеточного метаболизма; оно появилось в процессе эволюции значительно позже. Этот метаболический путь широко распространен и является более эффективным способом консервации энергии в аэробных условиях по сравнению с альтернативными процессами, такими как анаэробный гликолиз. Например, в гликолитическом пути Эмбдена – Мейергофа – Парнаса в результате субстратного фосфорилирования на каждую молекулу глюкозы образуются 2 молекулы АТФ, а в результате аэробного окислительного фосфорилирования – ещё 34 молекулы АТФ.

Для объяснения механизма окислительного фосфорилирования британским биохимиком Питером Митчеллом (Mitchell, 1961, Mitchell, 1966) была предложена гипотеза хеми-осмотического сопряжения («chemi-osmotic coupling»). Митчелл предположил, что в этом процессе происходит соединение метаболизма и транспорта через мембрану. Формирующийся при этом трансмембранный градиент ионов водорода H^+ (ΔpH) и связанный с ним электрический потенциал ($\Delta \Psi$) образуют «протон-движущую силу» ($\Delta \mu_{H^+}$), которая существует во всех живых клетках и используется ферментом АТФазой, или, как принято считать в настоящее время, H^+ -АТФ-синтазой, для осуществления реакции синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата (P_i).

У эукариот окислительное фосфорилирование сопровождается окислительно-восстановительными реакциями, которые осуществляются рядом белковых комплексов, расположенных во внутренней мембране митохондрий. Такие комплексы связанных между собой белков формируют электрон-транспортную цепь (Рисунок 5).

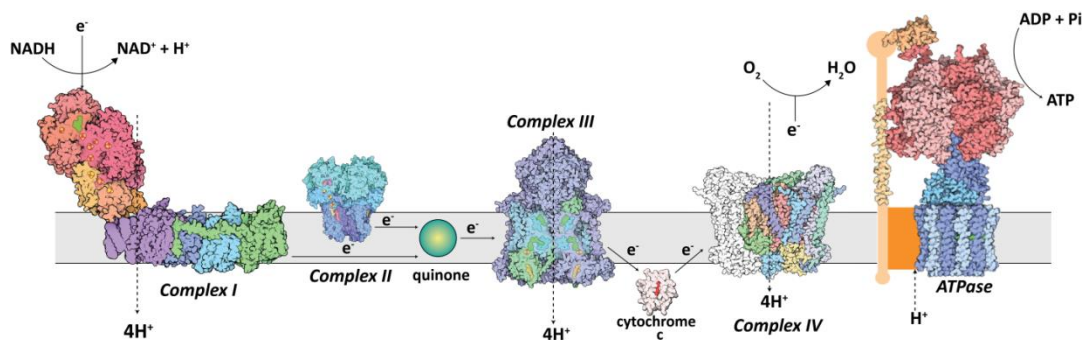


Рисунок 5 – Схематическое изображение дыхательной цепи и H^+ -АТФ-синтазы митохондрий (Laming, 2016). *Complex I* - НАДН:убихинон оксидоредуктаза I; *Complex II* - сукцинат:убихинон оксидоредуктаза; *Complex III* - убихинол: цитохром *c* оксидоредуктаза или (*bc1* комплекс); *Complex IV* цитохром *c* оксидаза; *ATPase* - АТФаза или АТФ синтаза (комплекс V).

Поток электронов (e^-) сопровождается переносом протонов (H^+) через мембрану. Образовавшийся в ходе реакций электрон-транспортной цепи протонный электрохимический потенциал используется для активного транспорта молекул через мембрану, а также преобразуется H^+ -АТФ-синтазой в энергию химических связей АТФ. Таким образом, окислительное фосфорилирование является результатом совместного действия компонентов дыхательной цепи и H^+ -АТФ-синтазы, ведущего к образованию АТФ. Концепция хемиосмотического сопряжения и консервации энергии в форме протонного электрохимического градиента лежит в основе биоэнергетики.

H^+ -АТФ-синтаза располагается в мембране и прилежит к ней (Рисунок 5 и 6). Она является одним из наиболее распространенных ферментов во всех живых организмах, основная функция которой – обеспечение клетки энергией (Guo et al., 2019).

H^+ -АТФ-синтазы делятся на два типа: F-тип (встречаются у бактерий и в органеллах эукариот) и A/V-тип (A-тип встречаются у архей и некоторых бактерий; V-тип был найден в вакуолях и везикулах эукариот) (Кошенко, 2018).

H^+ -АТФ-синтаза *E. coli* (F_0F_1 АТФ-синтаза) представляет собой большой мультисубъединичный комплекс, содержащий 8 субъединиц в соотношении $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{10}$ (von Ballmoos et al., 2009, Nakulinen et al., 2012, Guo et al., 2019) с

приблизительной молекулярной массой более 500 кДа. Он состоит из растворимой, обращенной в цитоплазму каталитической F_1 -части (включает в себя 5 субъединиц $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ с общей молекулярной массой более 350 кДа (Yoshida et al., 2001, Walker, 2013) и связанной с мембраной F_0 -части (включает в себя 3 субъединицы ab_2c_{10} с общей молекулярной массой более 150 кДа) (Рисунок). F_0F_1 АТФ-синтаза *E. coli* кодируется генами протяженного *atpIBEFHAGDC* оперона (Walker et al., 1984, Lagoni et al., 1993, Kasimoglu et al., 1996). Полный оперон был клонирован *in vivo* в нашей лаборатории на фрагменте ДНК ~10 т.п.н. (Hook et al., 2016).

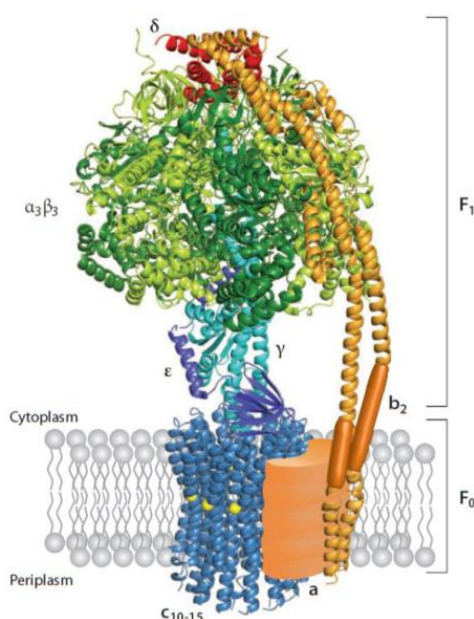
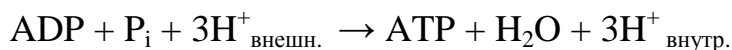


Рисунок 6 – Структурное представление фермента АТФ-синтазы *E. coli* и его ориентация в липидном бислое. Субъединицы F_1 -части и F_0 -части отмечены в соответствии с цветами: светло-зеленый и темно-зеленый – субъединицы α и β , голубой – субъединица γ , фиолетовый – субъединица ε , красный – субъединица δ , оранжевый – субъединица b , светло-оранжевый – субъединица a , синий – кольцо из c -субъединиц, желтый – протон-связывающее основание (von Ballmoos et al., 2009).

Структуры большинства субъединиц F_1 , как правило, хорошо изучены и были установлены в значительной степени с помощью рентгеновской кристаллографии (Uhlir et al., 1997, Wilkens et al., 1997, Wilkens and Capaldi, 1998). Структуры субъединиц F_0 , как правило, менее изучены из-за трудностей с кристаллизацией мембранных белков.

В то время как комплекс F_1 необходим для синтеза АТФ, комплекс F_0 транслоцирует протоны через мембрану. Энергетически выгодный процесс переноса ионов водорода через мембранную часть F_0F_1 -АТФ-синтазы – комплекс F_0 под действием электрохимического потенциала и синтез АТФ в F_1 -АТФазе сопряжены благодаря наличию «ротора», механически связывающего F_0 и F_1 комплексы. Протонный ток через F_0 вращает вал и является причиной конформационных изменений в каталитических центрах F_1 -АТФазы, что приводит к синтезу АТФ (Senior et al., 2002). С другой стороны, гидролиз АТФ в F_1 -АТФазе приводит к вращению вала в противоположную сторону и создает поток протонов через мембрану в обратном направлении, генерируя «протон-движущую силу». Отделенный от мембранной части комплекс F_1 -АТФаза сохраняет свою каталитическую способность к гидролизу и синтезу АТФ. В настоящее время, вращение молекулярного «ротора» H^+ -АТФ-синтазы и при гидролизе и при синтезе наглядно продемонстрировано экспериментально. Таким образом, АТФ-синтаза является молекулярной машиной (Yasuda et al., 2001, Nakamoto et al., 2008).

Общая реакция, катализируемая H^+ -АТФ - синтазой:



Следовательно, образование одной молекулы АТФ из молекулы АДФ сопровождается обратным переносом 3 протонов внутрь клетки.

2.2.2. Дыхательная цепь в клетках *E. coli*. NADH убихинон-оксидоредуктаза I типа

Как было описано выше, термин «дыхательная цепь» используют для определения последовательности реакций, ответственных за перенос электронов от субстратов к молекулярному кислороду, осуществляющийся системой структурно и функционально связанных трансмембранных белков и переносчиков электронов. Дыхательная цепь *E. coli* интенсивно изучается с начала 60-х годов прошлого века

(Ingledeu and Poole, 1984) и к настоящему времени основные механизмы её функционирования довольно хорошо изучены. Расположение переносчиков по возрастанию своего окислительно-восстановительного потенциала обеспечивает самопроизвольный транспорт электрона на протяжении всей цепи. За счёт последовательного переноса электронов по цепи, сопряженного с перекачкой протонов через мембрану, дыхательная цепь трансформирует энергию, выделяющуюся при окислении восстановленных субстратов молекулярным кислородом (аэробное дыхание), или иными веществами (анаэробное дыхание), в форму трансмембранного протонного потенциала (Price and Driessen, 2010).

В процессах гликолиза, в цикле трикарбоновых кислот, а также в пентозофосфатном пути у *E. coli* образуются восстановленные переносчики (NADH, FADH₂, NADPH, сукцинат), с которых электроны могут переходить в дыхательную цепь. Дыхательная цепь у разных групп прокариот значительно различаются по составу. Одни переносчики могут быть заменены на другие, имеющие сходные свойства (например, убихинон на менанохинон; цитохромы a, a₃ – на O); какой-либо переносчик может быть заменен или удален из дыхательной цепи (например, цитохром c); также клетка может использовать разные первичные дегидрогеназы (King, 2013, Sazanov, 2015).

Аэробная цепь переноса электронов *E. coli* расположена в цитоплазматической мембране и содержит три основные первичные дегидрогеназы: две NADH-дегидрогеназы: NADH убихинон-оксидоредуктазу I типа (комплекс I, NDH-1), NADH: убихинон-оксидоредуктазу II типа (NDH-2) (Melo et al., 2004) и сукцинат:хинон-оксидоредуктазу (SDH), (Kasahara and Anraku, 1974); а также цитохром *bo*₃ редуктазу кислорода и цитохромы *bd* редуктазы кислорода I и II типа (Unden and Bongaerts, 1997). Другие ферменты, такие как лактат-, формиат- и глицерол-1-фосфат-дегидрогеназы также могут участвовать в дыхательном процессе (Рисунок 7, 8). Компоненты цепи могут быть как белковой (флавопротеины, железосерные (Fe-S) белки, цитохромы), так и небелковой природы (хиноны). Флавопротеины и хиноны

осуществляют перенос атомов водорода, а железосерные белки и цитохромы – перенос электронов.

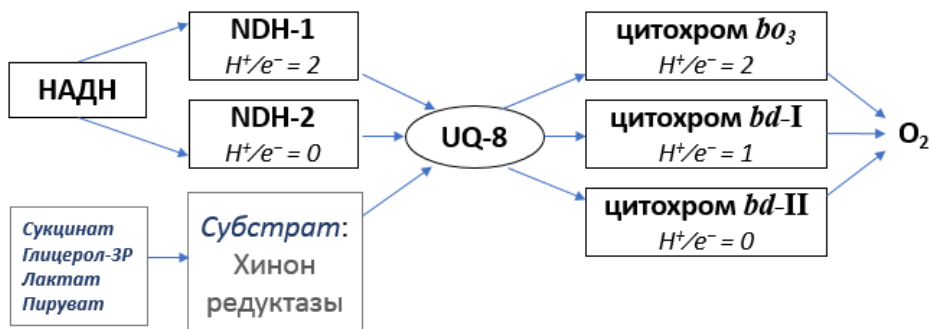


Рисунок 7 – Схематическое изображение компонентов дыхательной цепи *E. coli*, использующей НАДН в качестве субстрата.

Биоэнергетическая эффективность фермента обозначена числом протонов, высвободившихся в периплазму на электрон (соотношение H^+/e^-). NDH-I и NDH-II – кодирующая реакцию, сопряженную и не сопряженную с переносом протонов НАДН: убихинон-оксидоредуктаза, соответственно; UQ-8, убихинон-8. NDH-I и NDH-II переносят электроны к убихинону-8, получая восстановленный убихинон-8 (убихинол). Три хинола: кислород оксидоредуктазы, цитохромы *bo*₃, *bd*-I и *bd*-II окисляют восстановленный убихинон-8 и восстанавливают O₂ до 2 молекул H₂O (Borisov et al., 2011. Адаптировано).

Следует отметить, что дыхательная цепь *E. coli* способна использовать разнообразные доноры электронов и терминальные акцепторы. Вариабельность дыхательной цепи, обусловленная разнообразием дегидрогеназ и редуктаз, обеспечивает эту бактерию требуемой устойчивостью для приспособления к широкому спектру изменяющихся условий окружающей среды, в том числе температуре, источнику углерода, доступности кислорода (Sousa et al., 2012).

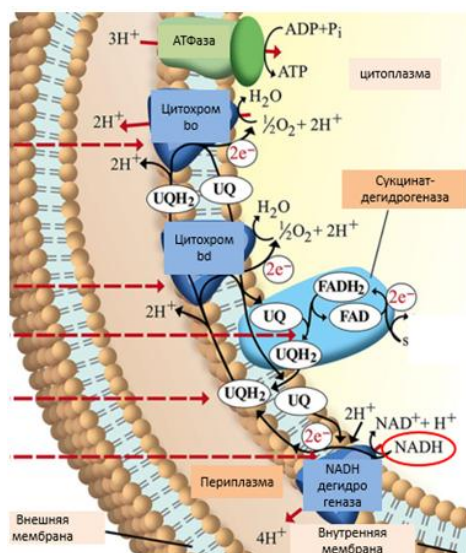


Рисунок 8 – Схематическое изображение дыхательной цепи *E. coli*.

NADH-дегидрогеназа, пул убихинонов (UQ), UQ – убихинон; UQH₂ – убихинол, сукцинат-дегидрогеназа, цитохромы *bd*, *bo*, F₁F₀ АТФ-синтаза (Kracke et al., 2015. Адаптировано).

Как указано выше, в клетках *E. coli* представлено два типа NADH-дегидрогеназ: NADH убихинон-оксидоредуктаза I типа (NDH-1, кодируется генами оперона *nuoABCDEFGHIJKLMN*) и NADH: убихинон-оксидоредуктаза II типа (NDH-2, кодируется геном *ndh*). NDH-1 катализирует перенос электронов от NADH к пулу хинонов, расположенных в цитоплазматической мембране, и способна, в отличие от NDH-2, генерировать протонный электрохимический градиент (Рисунок 7). Следует отметить, что NDH-1 является частью как аэробной, так и анаэробной дыхательной цепи (Sazanov, 2015).

В клетках *E. coli*, NDH-1 является самым большим из известных мембранных белковых комплексов и состоит из 14 субъединиц с общей молекулярной массой более 550 кДа (Рисунок 9). Семь из 14 субъединиц комплекса: NuoB, NuoC-D (фюз двух субъединиц, NuoC и NuoD), NuoE, NuoF, NuoG и NuoI образуют домен, погружённый в мембрану. Субъединицы этого домена являются чрезвычайно гидрофобными, в отличие от образующих периферический домен остальных семи субъединиц, которые гидрофильны и обращены в цитоплазму (Kerscher, 2008, Brandt, 2006). Субъединица NuoF представляет собой часть фермента, которая принимает электроны и имеет сайты связывания с FMN и NADH. Обращенная в цитоплазму часть ферментного

комплекса имеет молекулярную массу примерно 170 кДа и состоит из субъединиц NuoE, F, и G. Этот домен содержит FMN и 9 FeS кластеров (Sazanov and Hinchliffe, 2006).

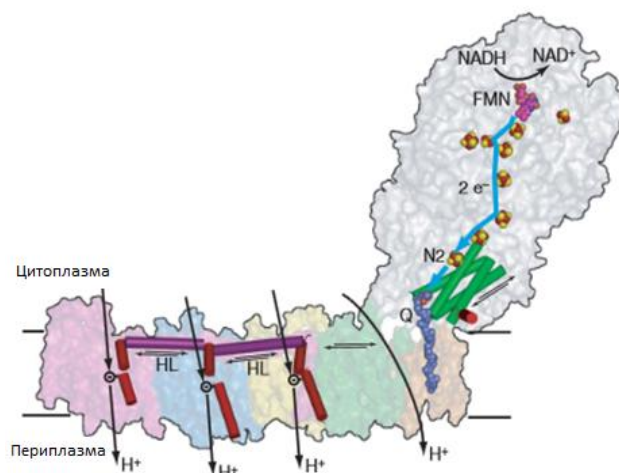
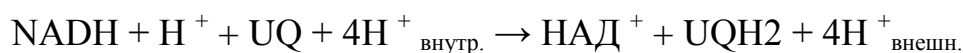


Рисунок 9 – Схематическое изображение NADH-дегидрогеназного комплекса I типа (NDH-1).

NDH-1 окисляет NADH, образовавшийся в клетке, в частности, в результате реакций цикла Кребса. Электроны от NADH переходят к убихинону, восстанавливая его до убихинола. Восстановление убихинона происходит также в результате реакции, катализируемой сукцинат-дегидрогеназой. Убихинол, в свою очередь, переносит электроны к следующим компонентам электронно-транспортной цепи - цитохромам. Комплекс NDH-1 работает как протонная помпа: на каждую окисленную молекулу NADH и восстановленный убихинон из цитоплазмы через мембрану перекачивается четыре протона (Kromer and Heldt, 1991):



NDH-1 создает около 40% протонного градиента. Как уже было отмечено, образовавшийся в результате электрохимический потенциал ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), используется для синтеза АТФ.

2.2.3. Подходы к регуляции пула АТФ в клетках штаммов-продуцентов

Как было показано выше, синтез/регенерация АТФ в процессе субстратного и окислительного фосфорилирования является незаменимой биологической реакцией для всех живых организмов. АТФ осуществляет важнейшую функцию, представляя собой уникальный энергетический ресурс для огромного числа биологических реакций (Knowles, 1980). В метаболической сети клетки АТФ выступает в качестве субстрата, продукта, активатора или ингибитора (Zhou et al., 2009, Nelson and Cox, 2004). Основываясь на этих четырёх основных функциях, внутриклеточный уровень АТФ может влиять на активный транспорт, синтез аминокислот и нуклеотидов, синтез и фолдинг белков, формирование белковых комплексов, перемещение и фосфорилирование белков, клеточную морфологию, передачу сигнала и ответ на стресс (Zhou et al., 2009). Участвуя в этих сложных метаболических процессах, АТФ оказывается вовлеченной практически во все пути, связанные с получением целевых метаболитов штаммами-продуцентами.

Выделяют четыре основных типа взаимосвязи между потребностью клетки в АТФ и сверхсинтезом целевого продукта. К первому типу относят такие целевые метаболиты, сверхсинтез которых может увеличиваться при снижении пула АТФ, например L-глутамат (Aoki et al., 2005) или пируват (Liu et al., 2006). В таком случае низкие пулы АТФ могут повышать метаболический поток через центральный путь метаболизма, что способствует образованию этих продуктов. Ко второму типу относят целевые метаболиты, такие как некоторые аминокислоты, синтез которых нуждается в большом количестве АТФ (L-гистидин, L-аргинин, L-триптофан, L-метионин и др.), а также полиаминокислоты, полисахариды, пептиды и белки, синтез которых промотируется с увеличением пула АТФ за счет высокого числа молекул АТФ, вовлеченных в образование и секрецию этих соединений (Candela and Fouet, 2006, Blank et al., 2005). К третьему типу относят метаболиты, потребность в АТФ у которых может меняться в течение процесса ферментации, как, например, при синтезе молочной кислоты клетками *S. cerevisiae* (van Maris et al., 2004). И наконец, различают типы метаболитов, для которых доступность АТФ играет различную роль в разных путях метаболизма (Zhou et al., 2009). Поскольку ГИС относится к метаболитам,

нуждающимся для сверхсинтеза в повышенном образовании/регенерации АТФ, более подробно рассмотрим подходы, связанные с этим случаем.

Известно, что в штаммах дикого типа поддержание оптимального внутриклеточного уровня АТФ обеспечивается механизмами регуляции его синтеза и утилизации. Однако в клетках штаммов-продуцентов этот гомеостаз может нарушаться, и в процессах, связанных с получением целевых метаболитов, высокий расход АТФ может оказаться недостаточно обеспеченным его регенерацией. Это ведёт к снижению скорости роста (в случае сверхсинтеза ГИС – даже к ауксотрофности по аденину, см. выше), торможению биосинтеза целевого продукта, подавлению его экспорта и снижению устойчивости клеток к токсичным соединениям. Поэтому манипуляции, связанные с модулированием синтеза/регенерации АТФ и его накопления в клетке, является мощным инструментом для достижения высоких концентраций целевых продуктов, высокой продуктивности, высокого выхода на различных субстратах, а также повышенной устойчивости клеток к неблагоприятным условиям среды.

Для повышения обеспеченности сверхсинтеза метаболитов АТФ в аэробных условиях, используют целый ряд подходов (Zhou et al., 2009, Hara and Kondo, 2015): (1) манипуляции, повышающие образование NADH, и регулирующие пути его окисления; (2) добавление в среду «энергетических субстратов» – соединений, легко окисляемых с образованием NAD(P)H; (3) регулирование pH среды; (4) регулирование активности реакций дыхательной цепи; (5) регулирование подачи кислорода; (6) манипуляции, непосредственно повышающие синтез АТФ, как за счёт субстратного фосфорилирования, так и за счёт увеличения активности F_0F_1 -АТФазы.

(1) Регулирование доступности NADH и путей его окисления, может быть эффективной стратегией для изменения внутриклеточного пула АТФ, так как в процессе аэробного роста окисление NADH происходит в электрон-транспортной цепи, в которой конечной стадией является образование АТФ. С этой целью осуществляют сверхэкспрессию или делецию генов, кодирующих ферменты, осуществляющие синтез и окисление NADH. К ним относятся некоторые киназы, дегидрогеназы (Zhou et al., 2009), а также ферменты, катализирующие

непосредственно синтез NAD. Показано, например, что после одновременной сверхэкспрессии генов *pncB* и *nadE*, кодирующих фосфорибозилтрансферазу никотиновой кислоты и NAD-синтетазу, наблюдается 7-кратное и 2-кратное увеличение внутриклеточной концентрации NAD(H) и NADP(H), соответственно (Heuser et al., 2007). С другой стороны, увеличению доступности NADH способствует инактивация генов, кодирующих окисляющие его ферменты.

Подход (2) связан с добавлением в среду дополнительных источников энергии для клеток – специфических субстратов для НАД-зависимых дегидрогеназ. Часто с этой целью используют цитрат (лимонная кислота), который в процессе метаболизма в результате реакций, катализируемых дегидрогеназами, генерирует дополнительное количество NADH, который, как уже отмечалось, поступает в электрон-транспортную цепь и ведёт к образованию «протон-движущей силы». Применение лимонной кислоты означает одновременное использование подхода (3), поскольку при этом снижается рН на поверхности цитоплазматической мембраны. В определённом диапазоне значений рН это не влияет негативно на метаболизм и рост клеток, но благоприятно для создания дополнительной «протон-движущей силы» между наружной и внутренней поверхностями мембраны, используемой для синтеза АТФ. Недостатком этого метода является необходимость дополнительных затрат на энергетический субстрат, что увеличивает себестоимость продукта.

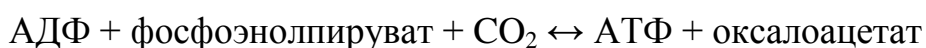
(3) В чистом виде этот подход предполагает использование дешёвых кислот для поддержания оптимального рН снаружи клеток с целью увеличения синтеза АТФ.

(4) Регуляция активности реакций дыхательной цепи кажется наиболее эффективным подходом для изменения уровня синтеза АТФ, так как в условиях аэробного роста, большая часть АТФ синтезируется именно в пути окислительного фосфорилирования. Как упоминалось выше, NADH: убихинон оксидоредуктаза I (NDH-1) является одним из ключевых компонентов дыхательной цепи. Этот мультисубъединичный комплекс осуществляет перенос электронов с NADH к пулу хинонов в цитоплазматической мембране, и у *E. coli* кодируются генами *nioABCDEFGHIJKLMN* (*nio*) оперона. Долгое время манипуляции с *nio* опероном были затруднительны из-за его большого размера и недостаточной изученности структуры и

регуляции. В процессе переноса электронов NADH-дегидрогеназой I типа задействована субъединица NuoF, которая обращена в цитоплазму и несет NADH-связывающий сайт. Известно, что у *E. coli* аминокислотная замена E183A в этой субъединице приводит к появлению двойной субстратной специфичности NDH-1: убихинон-оксидоредуктаза, содержащая мутантную субъединицу NuoF^{E183A}, способна к окислению не только NADH, но и NADPH (Auriol et al., 2011). При сверхсинтезе ряда клеточных метаболитов, в частности, у продуцентов ГИС, синтез NADPH является избыточным, что приводит к подавлению роста клеток и сопровождается недостатком АТФ. Можно предположить, что изменение специфичности NDH-1 с NADH-зависимого фермента на фермент NADH- и NADPH-зависимый, позволит задействовать избыточный NADPH в процессе дыхания и увеличит регенерацию и доступность молекул АТФ для обеспечения сверхсинтеза ГИС.

(5) Регулирование подачи кислорода в процессе культивирования клеток штамма-продуцента также является эффективным инструментом для повышения доступности АТФ (Pl'chenko et al., 1998, Tsai et al., 1996). Основными стратегиями для обеспечения клетки O₂ являются специфические методы контроля ферментационного процесса (контроль аэрации, обогащение среды чистым кислородом, добавление в среду насыщенных углеводов, повышающих его растворимость в среде и пр.) (Li et al., 1998, Zupancic and Ros, 2008, Henriksen et al., 1997, Li et al., 2002), либо сверхэкспрессия специфических генов, в частности, гена *vbg* бактериального гемоглобина Vgb из *Vitreoscilla* для усиления переноса кислорода по электрон-транспортной цепи (Chen et al., 2007; Frey et al., 2002; Zhang et al., 2007).

(6) К манипуляциям, повышающим синтез АТФ за счёт субстратного фосфорилирования, можно отнести сверхэкспрессию фосфоэнолпируват-карбоксикиназы (Pck), катализирующей реакцию:



Было показано, что при повышенной экспрессии Pck внутриклеточный пул АТФ *E. coli* значительно увеличивается, а при росте клеток на среде, обогащённой CO₂,

синтезируется больше сукцината (Kwon et al., 2008), а также образуется больше рекомбинантного белка (Kim et al., 2012). Однако центральную роль в процессе синтеза АТФ играет F_0F_1 АТФ-синтаза, конечный компонент пути окислительного фосфорилирования. Сверхэкспрессия F_0F_1 АТФ-синтазы представляется многообещающим подходом на сегодняшний день для увеличения активности ферментного комплекса (Zhang et al., 2008) и повышения уровня регенерации АТФ при его интенсивном расходовании, как, например, в случае сверхсинтеза ГИС.

Наконец, с целью повышения способности клеток к регенерации АТФ в условиях сверхсинтеза метаболитов (или белков) в качестве дополнительного источника энергии можно привлечь неорганический PP_i , который образуется в значительных количествах в клетках во многих реакциях метаболизма (см. ниже).

Помимо подходов, связанных с увеличением интенсивности регенерации АТФ для обеспечения биосинтеза целевых метаболитов, следует иметь в виду возможность ограничения его расхода в других клеточных процессах и подавления регуляторных механизмов, лимитирующих клеточный метаболизм в ответ на снижение пула АТФ. Так, известно, что наиболее энергозатратным процессом в клетке является синтез белка, на который расходуется до 75% АТФ (Russell and Cook, 1995).

Многочисленные работы последних десятилетий посвящены изучению гибернации рибосом – состоянию «спячки», в которое рибосомы входят при неблагоприятных условиях среды и в стационарной фазе, когда рост и синтез белка замедляются, или даже почти полностью прекращаются. Этот феномен связан с функцией ряда факторов трансляции, способных временно подавлять активность рибосом и, соответственно, процесс трансляции (Prossliner et al., 2018). Недавние исследования раскрывают новые аспекты регуляции трансляции (Fredrick et al., 2014). Они связаны с обнаружением нового белкового энергозависимого трансляционного фактора EttA (energy-dependent translational throttle protein A), продукта гена *ettA* (*yjjK*) (Boël et al., 2014, Chen et al., 2014). Трансляционный фактор EttA обеспечивает вхождение рибосомы в цикл трансляции в зависимости от соотношения внутриклеточных пулов АТФ/АДФ, т.е. регулирует скорость синтеза белка в ответ на энергетическое состояние клетки (Prossliner et al., 2018). Когда бактерии попадают в

неблагоприятные условия, при которых внутриклеточные пулы АДФ повышаются, АДФ присоединяется к EttA, и в таком состоянии EttA остаётся связанным с E-сайтом рибосомы, сохраняя трансляционный комплекс в остановленном, «спящем» состоянии (Рисунок 10). Когда уровень АТФ в клетках снова увеличивается, он вытесняет и замещает АДФ на EttA. После гидролиза АТФ происходит отсоединение EttA от рибосомы, и трансляция возобновляется (Chen et al., 2014).

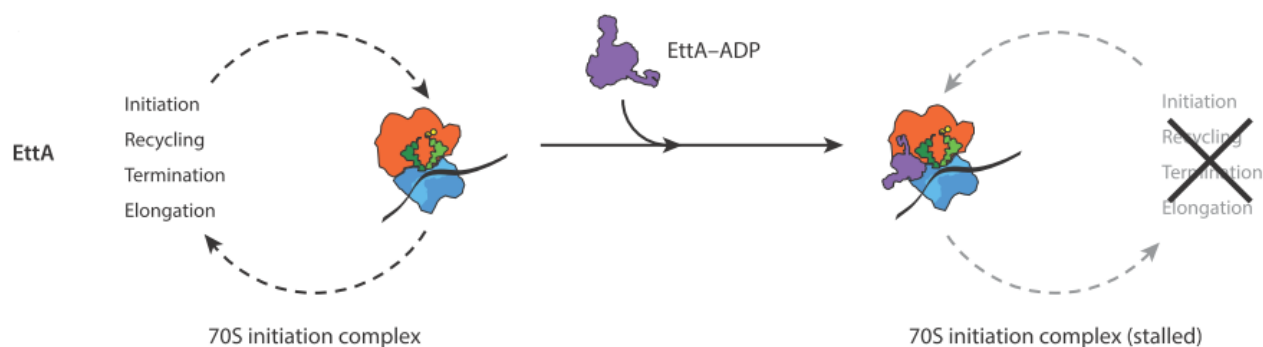


Рисунок 10 – Упрощенная схема действия фактора EttA. Энергозависимый трансляционный фактор EttA присоединяется к комплексу 70S в E-сайте. Когда EttA оказывается в связанном с АДФ состоянии, он остается на рибосоме и вводит трансляционный комплекс в состояние «гибернации», при котором все фазы трансляционного цикла подавлены (Prossliner et al., 2018).

Как будет показано в разделе «Экспериментальная часть» диссертации, инактивация гена *ettA* (*yjjK*), очевидно, разобщающая процесс трансляции с энергетическим статусом клетки, может положительно влиять на продукцию некоторых метаболитов (в частности, ГИС), которые получают сегодня в процессе периодической ферментации.

2.2.4. Ассимиляция неорганического фосфата и обеспечение его гомеостаза в клетках *E. coli*

Как следует из предшествующих разделов этой главы, фосфор, P, в виде неорганического ортофосфата P_i (остатка фосфорной кислоты, аниона PO_4^{3-}) незаменим в энергетическом метаболизме из-за важной биологической роли высокоэнергетических фосфоангидридных связей. При этом синтез /регенерация АТФ сопровождается образованием такой связи в результате присоединения P_i к АДФ.

Кроме того, соединения фосфора служат основными строительными блоками для клеточной мембраны и огромного числа биомолекул: он включен в состав фосфолипидов, липополисахаридов, нуклеиновых кислот и важных нуклеотидных кофакторов. Также, P_i может посттрансляционно вводиться в состав некоторых белков в результате их фосфорилирования.

В связи с существенной ролью фосфора в обеспечении жизнедеятельности, клетки должны поддерживать внутриклеточную концентрацию P_i на оптимальном уровне. У бактерий, в частности, у *E. coli*, она находится в диапазоне от 1 до 10 мМ. Гомеостаз P_i обеспечивается регуляторными механизмами, которые контролируют поглощение, утилизацию и выведение фосфатов из клетки. Существует три типа соединений, которые используют клетки *E. coli* в качестве первичных источников P: (i) неорганические фосфаты, (являются предпочтительным источником фосфора); к ним относятся: ортофосфат (P_i); пиродифосфат, PP_i ; и полидифосфат, $[poly(P_i)]$, или волютин), (ii) органофосфаты (эфиры фосфатов), и (iii) фосфонаты.

В зависимости от концентрации P_i во внешней среде он поступает в клетку с помощью различных систем транспорта: Pst-системы (PstSCAB, phosphate specific transport system) и PitA-системы (PitA, phosphate inorganic transport carrier). Pst-система является основной высоко специфичной системой потребления фосфатов и активируется более чем в 100 раз при фосфорном голодании. В условиях избытка P_i его молекулы проникают в клетку через низкоафинную, но очень «быструю» PitA-систему (Wanner, 1996). Каждая из этих систем по отдельности может обеспечить потребность клеток в P_i . Некоторые исследователи полагают, что имеется Pst-система, а не PitA-система, служит первичным транспортером P_i и в условиях его избытка в среде (Hsieh and Wanner, 2010). Множество данных свидетельствует о роли PitA в качестве транспортера, наряду с P_i , дивалентных катионов металлов (Me^{2+}), таких как Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} и Mn^{2+} , которые образуют растворимые металл-фосфатные ($MeHPO_4$) комплексы. При этом PitA обеспечивает их перемещение как в клетки, так и из клеток (Van Veen et al., 1994, Hsieh and Wanner, 2010). Также было показано, что экспрессия гена *pitA* модулируется доступностью P_i и дивалентных катионов металлов (Zn^{2+} , Mg^{2+}) в комплексе с фосфатом (Jackson et al., 2008). Недавно обнаружено, что при

низкой концентрации катионов Mg^{2+} активность PitA и его синтез подавляются, соответственно, малым белком MgtS и малой РНК MgrR. Таким путём они препятствуют выведению фосфата магния из клеток в условиях его дефицита. В свою очередь, экспрессия генов *mgtS* и *mgrR* контролируется двухкомпонентной системой передачи сигнала PhoQ-PhoP, реагирующей на содержание Mg^{2+} в среде (Yin et al., 2019).

Третьим известным функциональным транспортером P_i является PitB, имеющий 81% гомологии с PitA. PitB репрессирован при низких концентрациях фосфата, находясь под контролем общей, зависимой от PhoB-PhoR регуляции фосфатного (Pho) оперона (см. ниже), и, похоже, не участвует в ассимиляции P_i при нормальных условиях роста (Harris et al., 2001). Два дополнительных низкоафинных транспортера P_i у *E. coli* кодируются генами *glpT* и *uphT* (Hayashi et al., 1964, Pogell et al., 1966, Winkler, 1966), однако данные белки не способны обеспечить усвоение P_i в качестве источника фосфора в отсутствие систем Pst и Pit (Sprague et al., 1975, Jackson et al., 2008).

В условиях голодания по фосфору в бактериальной клетке индуцируется экспрессия целой группы так называемых так называемых *PSI* (*phosphate starvation inducible*) генов, продукты которых участвуют в ассимиляции экзогенных фосфорсодержащих соединений (Makino et al., 1994, Hullet, 1996). *PSI* гены входят в состав единого фосфатного *pho*-регулона и кодируют белки транспорта P_i и метаболизма других фосфорсодержащих соединений: фосфомоноэстеразы (кислую и щелочную фосфатазы, 5'-нуклеотидазу), фосфодиэстеразу, поровые белки внешней мембраны, белки, вовлеченные в биосинтез полимеров клеточной стенки, белки утилизации полифосфатов и фосфонатов и пр. К настоящему моменту известно о 31 гене, (9 транскрипционных единицах) находящихся под контролем *pho*-регулона: *eda*, *phnCDEFGHIJKLMNOP*, *phoA*, *phoBR*, *phoE*, *phoH*, *psiE*, *pstSCAB-phoU* и *ugpBAECQ*.

Экспрессия генов *pho*-регулона *E. coli* осуществляется координировано за счет функционирования белков PhoB и PhoR, которые образуют двухкомпонентную систему PhoB-PhoR передачи сигнала обеспеченности клетки P_i (Makino et al., 1989,

Makino et al., 1988). PhoR белок – это интегральный мембранный сенсорный белок (гистидинкиназа) с двумя трансмембранными сегментами, обеспечивающими его локализацию в клеточной мембране. В условиях фосфорного голодания, PhoR участвует в активации (фосфорилировании) транскрипционного регулятора PhoB. Сенсорная киназа PhoR может участвовать в трех различных процессах, которые контролируют активность транскрипционного регулятора PhoB в зависимости от концентрации P_i в среде: (i) ингибирование (предотвращение фосфорилирования), (ii) активация (фосфорилирование $\text{PhoB} \rightarrow \text{PhoB}\sim\text{P}$) и деактивация (дефосфорилирование $\text{PhoB}\sim\text{P} \rightarrow \text{PhoB}$) (Рисунок 11). Можно отметить, что активность кодируемого геном *phoA*-регулона фермента щелочной фосфатазы, PhoA, который часто используют для оценки степени индукции *pho*-регулона, в условиях голодания по фосфору увеличивается более чем в 1000 раз.

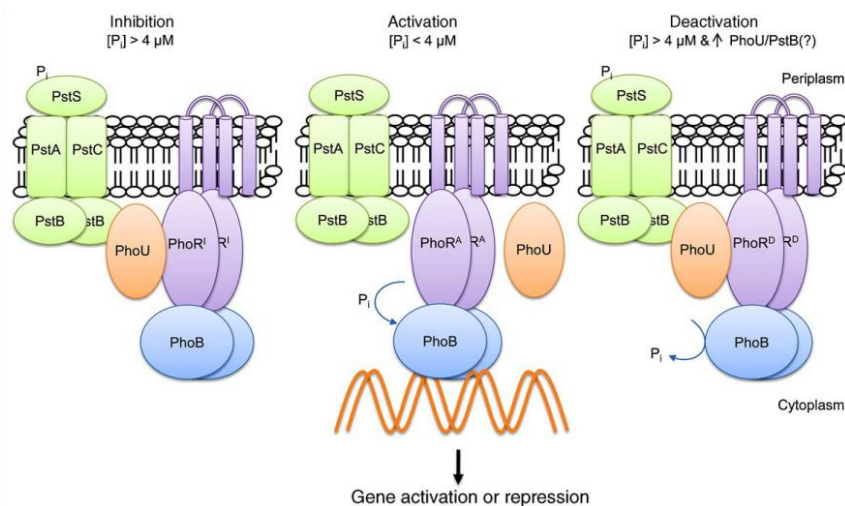


Рисунок 11 – Схема регуляции экспрессии генов *pho*-регулона *E. coli*.

Предполагается, что сигнальные процессы ингибирования, активации и деактивации соответствуют различным состояниям PhoR: состоянию ингибирования (PhoR^I), состоянию активации (PhoR^A) и состоянию деактивации (PhoR^D). P_i -связывающий белок PstS полностью насыщается, когда P_i находится в избытке. В этих условиях сигнал распространяется на PhoR, что приводит к образованию PhoR^I , который препятствует фосфорилированию PhoB. В условиях ограничения P_i (или отсутствия компонента Pst) такого сигнала не существует, что приводит к образованию активирующего состояния PhoR^A , который выступает в качестве фосфодонора для аутофосфорилирования PhoB. После периода лимитации по P_i PhoR^D способствует дефосфорилированию фосфо-PhoB. Образование PhoR^D требует повышенного количества PhoU или PstB в дополнение к избытку P_i (Hsieh and Wanner, 2010. Адаптировано).

2.3. Неорганический пирофосфат (PP_i), ферменты, осуществляющие его гидролиз, их функции и применение

2.3.1. Неорганический пирофосфат (PP_i) как энергетический компонент клетки

Неорганический пирофосфат (PP_i) является одним из трех биологически значимых форм неорганических фосфатов у *E. coli* (Wanner, 1966). В процессе логарифмического роста, внутриклеточные концентрации PP_i в большинстве случаев постоянны и равны 0,5 ммоль (Kukko and Heinonen, 1982). Однако известны условия, при которых значение концентраций может варьировать от 0,5 мМ до практически не детектируемого уровня (<0,1 мМ). Это – стрессы, например, присутствие в среде ингибиторов или лимит по глюкозе (Ambudkar et al., 1986, Akiyama, 1993; Amemura et al., 1986, Amemura et al., 1990).

Гидролиз PP_i сопровождается выделением значительной энергии (Рисунок 12). Существует гипотеза, описывающая самопроизвольное образование неорганического пирофосфата (PP_i) в определенных геохимических условиях, существовавших на Земле на ранних этапах эволюции жизни, и о преобладании PP_i над АТФ как основного донора энергии в этот период (Baltscheffsky, 1996, Baykov et al., 2012).

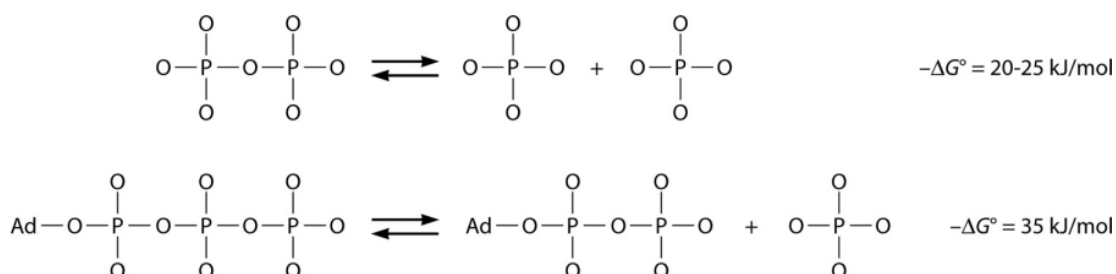


Рисунок 12 – Выделение энергии при гидролизе пирофосфата и АТФ.

Гидролиз неорганического пирофосфата (PP_i) до неорганического ортофосфата (P_i) и гидролиз АТФ до АДФ и P_i высвобождают значительную энергию, которая может быть использована для запуска сопряженных химических или транспортных реакций. Ad, аденозин (Baykov et al., 2012).

Остатки древних PP_i-опосредованных метаболических путей найдены у бактерий, у архей, простейших и высших растений в различных ферментативных и транспортных реакциях, которые используют PP_i вместо АТФ (Wood, 1977).

PP_i образуется в большом количестве в качестве побочного продукта при биосинтезе в более чем 200-х биосинтетических реакциях, таких как синтез нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), белка (аминоацил-тРНК), коферментов, жирных кислот, полисахаридов, целлюлозы, изопреноидов, аминокислот и пр. (Lahti, 1983). Как было отмечено выше, на каждый моль синтезированного ГИС образуется 2 моля PP_i . Во многих случаях образующийся PP_i ингибирует PP_i -генерирующие реакции, из-за чего его концентрации в клетке находятся под строгим контролем. Гидролиз внутриклеточного PP_i является необходимым условием многих жизненно важных реакций, поскольку делает эти реакции практически необратимыми.

Таким образом, гидролиз PP_i сопровождается выделением значительного количества энергии, но у большинства живых организмов происходит её последующее рассеивание в форме тепла. У *E. coli* также не существует путей полезного использования энергии фосфоангидридных связей PP_i . В то же время современные биотехнологические подходы позволяют привлечь неорганический пирофосфат в качестве дополнительного источника энергии для увеличения биомассы или выхода целевого продукта.

2.3.2. Цитоплазматические (растворимые) пирофосфатазы

Неорганические пирофосфатазы (PPases) катализируют гидролиз одной молекулы неорганического PP_i до двух молекул неорганического ортофосфата (P_i). Как уже отмечалось, они играют ключевую роль при контроле внутриклеточных концентраций неорганического пирофосфата и промотируют важнейшие биохимические реакции.

Выделяют 4 класса неорганических пирофосфатаз: цитоплазматические (растворимые) Семейства I, Семейства II, Семейства III (S-PPase) и мембрано-связанные (M-PPase).

Растворимые пирофосфатазы Семейства I и Семейства II имеют существенные различия в аминокислотной последовательности и структуре, но схожий механизм катализа, поскольку их единственной ролью является гидролиз PP_i . Пирофосфатазы Семейства I широко распространены и были найдены во всех царствах жизни.

Кристаллическая структура неорганической пирофосфатазы была впервые определена в 1952 году и отнесена к Семейству I (Kunitz, 1952). На сегодняшний день наиболее изученными и охарактеризованными являются растворимые пирофосфатазы Семейства I из *E. coli* (E-PPase) (Salminen, et al., 1995, Samygina et al., 2001) и *S. cerevisiae* (Y-PPase) (Heikinheimo et al., 1996, Oksanen et al., 2007, Halonen, et al., 2002, Pohjanjoki et al., 2001, Zyryanov et al., 2001, Heikinheimo et al., 2001). Если эукариотические пирофосфатазы Семейства I функционируют в основном в форме димера (Cooperman et al., 1992), то бактериальные в большинстве случаев являются гексамерами (Josse, Wong, 1971).

Для каталитической активности, в активном центре цитоплазматических растворимых пирофосфатаз могут присутствовать различные катионы (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , K^+) (Kajander et al., 2013). Пирофосфатазы Семейства I и Семейства III нуждаются в ионе Mg^{2+} . Пирофосфатазы Семейства II демонстрируют наибольшую активность в присутствии ионов Mn^{2+} или Co^{2+} . Интересно, что значения каталитической константы для пирофосфатаз Семейства II ($k_{cat} \approx 2000 \text{ с}^{-1}$) на порядок выше значений для пирофосфатаз Семейства I ($k_{cat} \approx 200 \text{ с}^{-1}$) (см. ниже Таблица 1).

Механизм гидролиза PP_i , с учетом данных рентгеноструктурного анализа, был впервые предложен для растворимых пирофосфатаз Семейства I Y-PPase (Heikinheimo et al., 2001) и E-PPase (Samygina et al., 2001).

У *E. coli* гидролиз неорганического пирофосфата PP_i до ортофосфата P_i осуществляется единственным ферментом – неорганической цитоплазматической пирофосфатазой (PPase, EC 3.6.1.1), продуктом гена *ppa*, который является существенным для роста бактерии при физиологических условиях (Chen et al., 1990).

2.3.3. Мембранные пирофосфатазы

Мембран-связанные неорганические пирофосфатазы (M-PPase) были обнаружены более 50 лет назад у растений, водорослей и некоторых простейших, а также у бактерий и архей (Baltscheffsky et al., 1966, Baltscheffsky, 1967). По сравнению с растворимыми пирофосфатазами, биологические функции M-PPases несколько шире, эти ферменты крайне важны для выживания клеток в условиях сниженной

обеспеченности энергией (Maeshima, 2000, Garcia-Contreras et al., 2004). M-PPases являются интегральными мембранными белками и совмещают гидролиз/синтез PP_i с переносом иона H^+ и/или Na^+ через мембрану против градиента концентрации (Рисунок).

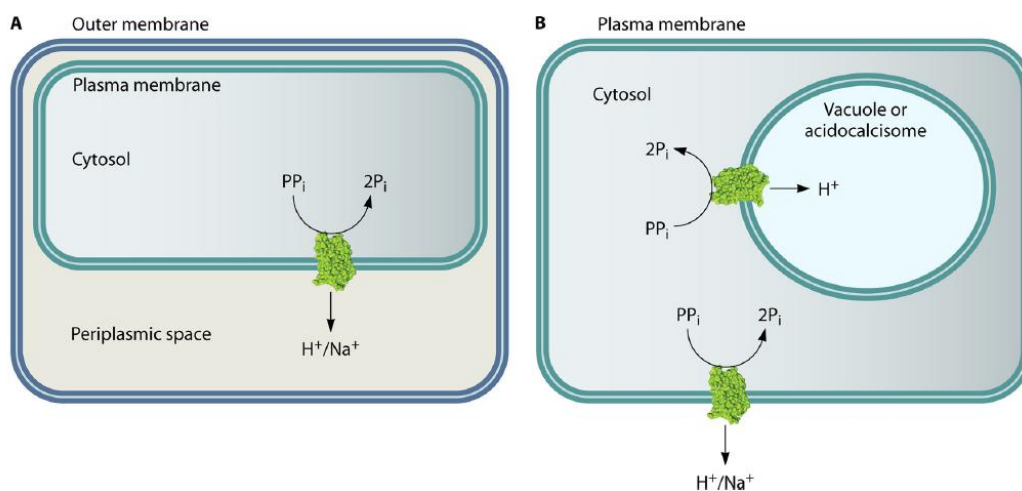


Рисунок 13 – Ориентация M-PPase и направление потока ионов у (A) прокариотических и (B) эукариотических клеток (Вауков et al., 2012).

У эукариот эти ферменты преимущественно располагаются на мембранах: вакуолей у растений (Gaxiola R.A. et al., 2007) и ацидокальцисом у простейших (McIntosh and Vaidya, 2002). Ацидокальцисомы представляют собой органеллы, напоминающие растительные вакуоли, способные запасать кальций и фосфаты. Ацидокальцисомы с мембран-связанными пирофосфатазами также присутствуют у некоторых бактерий (Seufferheld et al., 2004, Seufferheld et al., 2003). В ацидокальцисомах и вакуолях активный сайт пирофосфатазы обращен к цитозолю, а катионы выбрасываются из него через мембрану.

M-PPases встречаются прежде всего у таких организмов, для которых ограничение энергии, условия голодания или стресса (засуха, дефицит питательных веществ, кислородное голодание, холод, слабое освещение, солевой стресс и пр.) являются частыми событиями. Наряду с другими « H^+/Na^+ помпами» эти ферменты обеспечивают трансмембранный градиент ионов и формирование «протон-движущей силы» в условиях нехватки АТФ (Kajander et al., 2013). В растениях M-PPases также необходимы для удаления PP_i .

Эволюционно M-PPases являются древнейшим белковым семейством. Ген, кодирующий мембранную пиррофосфатазу, присутствует в четверти всех секвенированных геномов бактерий и архей. Как уже упоминалось, мембранные пиррофосфатазы были открыты в 1960-х годах (Baltscheffsky et al., 1966), а первые кристаллические структуры M-PPase из *Mung bean* (*Vigna radiata*) (4A01, VrPPase) (Lin et al., 2012) и *Thermotoga maritima* (4AV3, 4AV6, TmPPase) (Kellosalo et al., 2012), были получены сравнительно недавно. До этого момента было известно лишь расположение консервативных мотивов, вовлеченных в связывание с ионом металла и гидролизом PP_i , а также топология и организация вторичной структуры на основе известных ферментов (Maeshima, 2000). Филогенетическое древо белковых последовательностей мембранных M-PPases представлено на Рисунок .

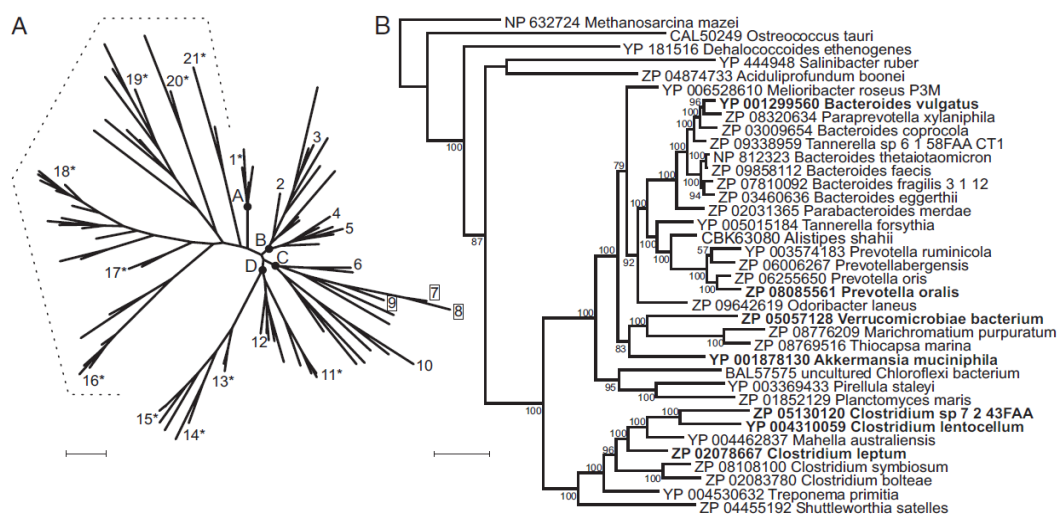


Рисунок 1 – Филогенетическое древо белковых последовательностей мембранных M-PPases.

(А) Экспериментально охарактеризованные Na^+ -переносящие M-PPases отмечены обычными цифрами. Na^+ , H^+ -переносящие M-PPases – обозначены квадратами, и H^+ -переносящие M-PPases – со звездочками. Пунктирной линией подчеркнуты K^+ -независимые подсемейства M-PPases. (В) Филогения подсемейства Na^+ , H^+ -пиррофосфатаз (Luoto et al., 2013).

M-PPases являются ионными помпами и содержат один протяженный мембран-связанный участок (Mimurat et al., 2004) с 15-17 трансмембранными доменами (Kellosalo et al., 2012), а также гидрофильную область в части белка, обращенной в

цитоплазму. Молекулярная масса M-PPases составляет 66÷116 кДа (Schultz and Baltscheffsky, 2003). Примечательно, что фермент образован одним полипептидом, и все до сих пор изученные M-PPases являются гомодимерами (Kellosalo et al., 2012).

M-PPases можно разделить на 2 гомологичных семейства, основываясь на их способности активироваться в присутствии катионов калия: K⁺-независимые и K⁺-зависимые M-PPases (Luoto et al., 2013, Belogurov et al., 2002, Malinen et al., 2007). Оба семейства M-PPases способны переносить через мембрану ион водорода H⁺ (H⁺-PPase), причем K⁺-зависимые M-PPases могут дополнительно транспортировать ион Na⁺ (Na⁺-PPase) или ионы Na⁺ и H⁺ одновременно (Na⁺, H⁺-PPase). Na⁺-переносящие M-PPases дополнительно нуждаются в ионе Na⁺ (или Li⁺) для ферментативной активности (Malinen et al., 2007, Belogurov et al., 2005).

H⁺-PPases представляют собой особый класс ионных транслоказ, не имеющих структурного сходства с АТФ-протонными помпами (такими как АТФазы F-, V-, или P- типов) или транспортерами семейства ABC (ATP binding cassette). Однако функционально механизмы действия M-PPases схожи с мембран-связанными АТФ-синтазами. С точки зрения скорости катализа (k_{cat}) мембран-связанные пирофосфатазы самые «медленные» по сравнению пирофосфатазами Семейства I и Семейства II при оптимальных условиях (Таблица 1) (Kajander et al., 2013). В настоящее время, точный механизм каталитического цикла M-PPase не известен, однако была предложена его схема, унифицированная для Na⁺ и H⁺ M-PPase (Kellosalo et al., 2012, Kajander et al., 2013) (Рисунок).

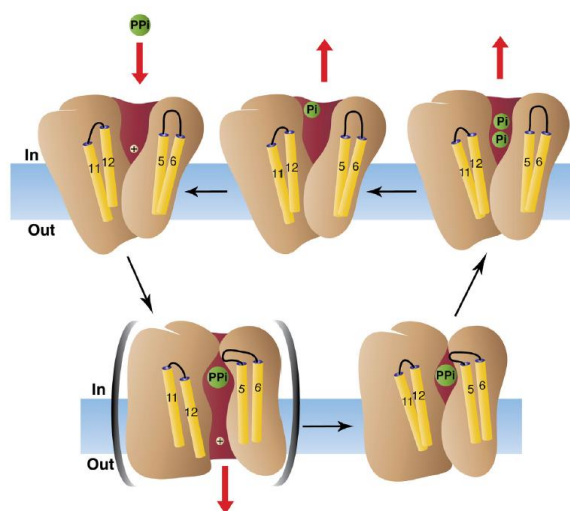


Рисунок 2 – Предполагаемая схема каталитического цикла M-PPases. Данная схема является общей для как для протонных, так и для натриевых M-PPases. В процессе гидролиза PP_i, гидролитический центр M-PPases соединяется с выходным каналом, в котором происходит перенос протона из цитоплазмы (Kajander et al., 2013. Адаптировано).

Наиболее значимыми отмеченными в литературе различиями между всеми упомянутыми типами пирофосфатаз с точки зрения гидролиза PP_i является их чувствительность к ингибиторам: фторидам (F) и дифосфанатам, в частности, к амидометилендифосфонату (AMDP), а также тип иона металла, необходимого для каталитической активности. Основные кинетические свойства неорганических пирофосфатаз представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Некоторые кинетические свойства неорганических пирофосфатаз и их ингибирование F и AMDP (Kajander et al., 2013).

Пирофосфатазы	Mg ²⁺	Mn ²⁺	K _i для AMDP (мкМ)	K _i для F (мкМ)*	k _{cat} (с ⁻¹)
Семейство I	+	Активирует	11-150	≤11-90	200-400
Семейство II	+		1000	6*	1700-3000
Мембранные (M-PPase)	+		1,2-1,8	3000-4800	3,5-20

Среди эукариот, все растения и многие простейшие содержат ген, кодирующий H⁺-PPase, в то время как у животных и высших грибов он отсутствует.

2.3.4. H^+ -переносящая пирофосфатаза из *Rhodospirillum rubrum* и её практическое применение

Первый известный фермент H^+ -пирофосфатаза/ H^+ -пирофосфатсинтаза (H^+ -PPase) был выделен из хроматофор мембран грам-отрицательной пурпурной фотосинтетической бактерии *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky et al., 1998). Указанный фермент может работать как в темноте, осуществляя гидролиз PP_i (Baltscheffsky M., 1964), так и синтезировать PP_i на свету (Baltscheffsky et al., 1966). Первым клонированным бактериальным геном, кодирующим H^+ -PPase, стал также ген из *R. rubrum* (Baltscheffsky et al., 1998). Соответствующая белковая последовательность оказалась на 30% идентична аналогичным ферментам растений, что позволило определить консервативные мотивы (Seranno et al., 2007). Было выделено несколько мотивов с сохраненной в процессе эволюции высокой степенью консервативности, что указывало на эволюционно раннюю оптимизацию функциональных структур фермента. Данный факт подтверждает предположение о том, что PP_i предшествовал АТФ в качестве основной неорганической молекулы, поддерживающей начало жизни на Земле (Baltscheffsky, 1967, Seranno et al., 2007), наряду с высокомолекулярными полифосфатами (HMW-polyP) (Brown. and Kornberg, 2004).

Как было отмечено, у *R. rubrum* фермент H^+ -PPase может обеспечивать как гидролиз PP_i , совмещенный с переносом протона против градиента концентрации, так и синтез PP_i с одновременным переносом протона по градиенту концентрации при физиологических условиях. Показано, что H^+ -PPase у *R. rubrum* катализирует индуцируемый светом синтез PP_i из P_i в хроматофорах, что представляет собой альтернативу АТФ-синтазе в дыхательной цепи переноса электронов (Baltscheffsky, 1966, Baltscheffsky, 1967).

Фермент состоит из одного полипептида с молекулярной массой ~75 kDa (Maeshima, 2000) который, вероятнее всего, образует димер. Согласно предсказанному при помощи компьютерного моделирования анализу, более половины белка H^+ -PPase (14-17 трансмембранных сегментов), оказываются погруженными в мембрану (Schultz,

Baltscheffsky, 2003). Для ферментативной активности, H^+ -PPase из *R. rubrum* нуждается в ионах Mg^{2+} .

С 1990-х годов по настоящее время H^+ -переносящие пирофосфатазы (H^+ -PPases) являются объектом усиленного изучения. Особое внимание уделяется их практическому применению в сельском хозяйстве. Как известно, сельскохозяйственные растения чувствительны к засолению и засухе, что зачастую приводит к существенной потере урожая (Дьякова, 2012). Оказалось, что сверхэкспрессия в растениях гена, кодирующего вакуолярную H^+ -пирофосфатазу *Arabidopsis thaliana*, повышала их солеустойчивость и резистентность к засухе за счет повышенной способности к аккумуляции ионов Na^+ в вакуолях и усиления осморегуляторной способности (Gaxiola et al., 2001, Batelli et al., 2007, Lv et al., 2017; Yang et al., 2018).

Другой задачей в сельскохозяйственной практике является увеличение усвояемости растениями соединений неорганического фосфора. Лимит по доступному фосфату представляет серьезную проблему; в почве P_i присутствует в основном в виде нерастворимых солей кальция, железа и алюминия, которые недоступны для растений. Было показано, что сверхэкспрессия H^+ -пирофосфатазы *Arabidopsis thaliana* в рисе и томатах приводила к увеличению усвоения фосфора (Yang et al., 2007).

Как было описано, у большинства живых организмов гидролиз PP_i осуществляется растворимой пирофосфатазой, высвобождающей энергию гидролиза PP_i в форме тепла. В то же время, мембранные пирофосфатазы совмещают гидролиз PP_i с выбросом иона H^+ , Na^+ или H^+/Na^+ через мембрану. Таким образом, H^+ -пирофосфатаза из *R. rubrum* способна запасать часть энергии в форме электрохимического градиента протонов, т.е. создавать «протон-движущую силу». В связи с этим представляется перспективным ее применение с целью использования образующегося в клетках пирофосфата в качестве дополнительного источника энергии при создании штаммов-продуцентов соединений, синтез которых требует высоких затрат АТФ и/или сопровождается генерированием PP_i . Как уже отмечалось, к ним относятся и ГИС.

3. Материалы и методы

3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Таблица 2 - Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм или плаزمида	Генотип, характеристика	Источник
Штаммы:		
MG1655	F ⁻ , <i>ilvG</i> , <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	БКПМ; Blattner et al, 1997
TG1 <i>λpir</i> ⁺	F ⁻ Δ(<i>lac-pro</i>) <i>supE thi hsdΔ5</i> [F' <i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZΔM15</i>]	VKM IMG-341
BW25113	<i>rrnB3</i> , Δ <i>lacZ4787</i> , <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-ΔhisL'</i> <i>hisG</i> ^{R(E271K)} <i>DCBHAFI</i>	Дорошенко и соавт., 2013
MG1655 Δ(φ80- <i>attB</i>)	MG1655 с делецией природного (φ80- <i>attB</i>) сайта	Minaeva et al., 2008
MG1655 Δ(φ80- <i>attB</i>) IS 5.11::φ80- <i>attB</i>	MG1655 с делецией природного (φ80- <i>attB</i>) сайта и искусственным <i>attB</i> сайтом в локусе IS 5.11	Minaeva et al., 2008
MG1655 Δ(φ80- <i>attB</i>) IS 5.11::Cm ^R -P _{<i>tac21-purA</i>}	MG1655 Δ(φ80- <i>attB</i>) IS 5.11::φ80- <i>attB</i> , но IS 5.11::(λ- <i>attB</i>) P _{<i>tac21-purA</i>}	Данная работа
KF37 IS5.11::Cm ^R -P _{<i>tac21-purA</i>} <i>pitA</i> ⁻	KF37, но IS5.11::λ <i>attR-cat-λattL</i> P _{<i>tac21-purA</i>} <i>pitA</i> ⁻	Данная работа
KF37 IS5.11::Cm ^R -P _{<i>tac21-purA</i>} <i>pitA</i> ⁺	KF37, но IS5.11::λ <i>attR-cat-λattL</i> P _{<i>tac21-purA</i>} <i>pitA</i> ⁺	Данная работа
EA79	KF37, но IS5.11::(λ- <i>attB</i>) P _{<i>tac21-purA</i>} <i>pitA</i> ⁻	Данная работа
MG1655 Cm ^R -P _L - <i>purH</i>	MG1655, но λ <i>attR-cat-λattL</i> -P _L - <i>purH</i>	Данная работа
EA83	EA79, но (λ- <i>attB</i>) P _L - <i>purH</i>	Данная работа
EA92	EA83, but P _L - <i>aspC</i>	Данная работа
MG1655 Δ <i>pitA</i> ::Km ^R	MG1655, но Δ <i>pitA</i> ::λ <i>attR-kan-λattL</i>	Данная работа
KF37 Δ <i>pitA</i> ::Km ^R	KF37, но Δ <i>pitA</i> ::λ <i>attR-kan-λattL</i>	Данная работа
MG1655 Cm ^R -P _{L<i>tac</i>} - <i>pitA</i>	MG1655, но λ <i>attR-cat-λattL</i> -P _{L<i>tac</i>} - <i>pitA</i>	Данная работа
KF37 Cm ^R -P _{L<i>tac</i>} - <i>pitA</i>	KF37, но λ <i>attR-cat-λattL</i> -P _{L<i>tac</i>} - <i>pitA</i>	Данная работа
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> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78} , Δ <i>purH</i> ::FRT- <i>kan</i> -FRT	Baba et al., 2006
MG1655 Δ <i>purR</i> ::Cm ^R Δ <i>purH</i> ::Km ^R	MG1655, но Δ <i>purR</i> ::λ <i>attR-cat-λattL</i> and Δ <i>purR</i> ::FRT- <i>kan</i> -FRT	Данная работа

CC118 λ pir+	Штамм для поддержания <i>pir</i> -зависимой рекомбинантной плазмиды	Herrero et al., 1990
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB})$ $\Delta yibH::\phi 80\text{-attB}$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80\text{-attB}$) сайта и искусственным <i>attB</i> сайтом в локусе <i>yibH</i>	Лабораторная коллекция
MG1655 $\Delta yibH::Tc^R\text{-}phoB^{DBD}$	MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB})$ $\Delta yibH::\phi 80\text{-attB}$, но $\Delta yibH::\lambda attR\text{-}tetAR\text{-}\lambda attL\text{-}phoB^{DBD}$	Лабораторная коллекция
MG1655 $\Delta yibH::Km^R\text{-}P_{lacUV5}\text{-}phoB^{DBD}$	MG1655 $\Delta yibH::Tc^R\text{-}phoB^{DBD}$, но $\Delta yibH::\lambda attR\text{-}kan\text{-}\lambda attL\text{-}P_{lacUV5}\text{-}phoB^{DBD}$	Лабораторная коллекция
KF37 $\Delta yibH::Tc^R\text{-}phoB^{DBD}$	KF37, но $\Delta yibH::\lambda attR\text{-}tetAR\text{-}\lambda attL\text{-}phoB^{DBD}$	Лабораторная коллекция
KF37 $\Delta yibH::Km^R\text{-}P_{lacUV5}\text{-}phoB^{DBD}$	KF37, но $\Delta yibH::\lambda attR\text{-}kan\text{-}\lambda attL\text{-}P_{lacUV5}\text{-}phoB^{DBD}$	Лабораторная коллекция
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB})$ $\Delta aroG::(\phi 80\text{-attB})$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80\text{-attB}$) сайта и искусственным <i>attB</i> сайтом в <i>aroG</i> локусе	Лабораторная коллекция
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB})$ $\Delta aroG::(\phi 80\text{-attB}) \Delta atpI\text{-}C$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80\text{-attB}$) сайта, искусственным <i>attB</i> сайтом в <i>aroG</i> локусе и $\Delta atpI\text{-}C$	Hook et al., 2016
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB}) \Delta atpI\text{-}C$ $\Delta aroG::atpI\text{-}C$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80\text{-attB}$) сайта, $\Delta atpI\text{-}C$ и $\Delta aroG::atpI\text{-}C$	Hook et al., 2016
MG1655 $\Delta nuoA\text{-}N$	MG1655, но $\Delta nuoA\text{-}N$	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB}) \Delta nuoA\text{-}N$ IS5.11:: $Cm^R\text{-}nuoA\text{-}N$	MG1655 $\Delta nuoA\text{-}N$, но IS5.11:: $\lambda attL\text{-}cat\text{-}\lambda attR\text{-}nuoA\text{-}N$	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB})$ IS5.11:: $Cm^R\text{-}nuoA\text{-}N$	MG1655, но IS5.11:: $\lambda attL\text{-}cat\text{-}\lambda attR\text{-}nuoA\text{-}N$	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB})$ $\Delta aroG::atpI\text{-}C$ IS5.11:: $nuoA\text{-}N$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80\text{-attB}$) сайта, $\Delta aroG::atpI\text{-}C$ и IS5.11:: $nuoA\text{-}N$	Данная работа
MG1655 $nuoF^{E183A}$	MG1655 с заменой аллеля E183A в <i>NuoF</i> (оперон $P_{nuo}\text{-}nuoA\text{-}nuoF^{E183A}\text{-}nuoN$)	Данная работа
MG1655 $Cm^R\text{-}nuoA\text{-}nuoF^{E183A}\text{-}nuoN$	MG1655 $nuoF^{E183A}$, маркированный кассетой $\lambda attL\text{-}cat\text{-}\lambda attR$	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB}) nuoF^{E183A}$ $\Delta galT::Cm^R\text{-}P_{nuo}\text{-}nuoA\text{-}nuoF^{E183A}\text{-}nuoN$	MG1655 $nuoF^{E183A}$, с делецией природного ($\phi 80\text{-attB}$) сайта и $\Delta galT::\lambda attL\text{-}cat\text{-}\lambda attR\text{-}P_{nuo}\text{-}nuoA\text{-}nuoF^{E183A}\text{-}nuoN$	Данная работа
MG1655 $nuoF^{E183A}$ IS5.11:: $Cm^R\text{-}nuoA\text{-}N$	MG1655 $nuoF^{E183A}$, но IS5.11:: $\lambda attL\text{-}cat\text{-}\lambda attR\text{-}nuoA\text{-}N$	Данная работа
EA92 $Cm^R\text{-}nuoF^{E183A}$	EA92, но $\lambda attL\text{-}cat\text{-}\lambda attR\text{-}nuoA\text{-}nuoF^{E183A}\text{-}nuoN$	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB})$ IS5.8:: $\phi 80\text{-attB}$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80\text{-attB}$) сайта и искусственным <i>attB</i> сайтом в локусе IS5.8	Minaeva et al., 2008
MG1655 $\Delta(\phi 80\text{-attB})$ IS5.8:: $P_L\text{-}SD1\text{-}hppa^{Rru}$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80\text{-attB}$) сайта и IS5.8:: $P_L\text{-}SD1\text{-}hppa^{Rru}$	Данная работа

MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)$ IS5.8::P _{tac} -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	MG1655 с делецией природного ($\phi 80-attB$) сайта и IS5.8::P _{tac} -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)$ IS5.8::P _{tac21} -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	MG1655 с делецией природного ($\phi 80-attB$) сайта и IS5.8::P _{tac21} -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)$ <i>adrA</i> Ω:: $\phi 80-attB$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80-attB$) сайта и искусственным <i>attB</i> сайтом в межгенной области локуса <i>adrA</i>	Лабораторная коллекция
MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)$ <i>adhE</i> :: $\phi 80-attB$	MG1655 с делецией природного ($\phi 80-attB$) сайта и искусственным <i>attB</i> сайтом в локусе <i>adhE</i>	Лабораторная коллекция
MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)$ <i>adrA</i> Ω::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	MG1655 с делецией природного ($\phi 80-attB$) сайта и <i>adrA</i> Ω::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)$ IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> Δppa ::Cm ^R	MG1655 с делецией природного ($\phi 80-attB$) сайта и IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} и Δppa :: $\lambda attR-cat-\lambda attL$	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)$ IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} <i>adrA</i> Ω::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	MG1655 с делецией природного ($\phi 80-attB$) сайта, IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} и <i>adrA</i> Ω::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	Данная работа
MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)$ IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} <i>adrA</i> Ω::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} Δppa ::Cm ^R	MG1655 с делецией природного ($\phi 80-attB$) сайта, IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} , <i>adrA</i> Ω::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} и Δppa :: $\lambda attR-cat-\lambda attL$	Данная работа
BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B -m _B -) <i>lon gal</i> λ (DE3)	«Novagen» (США); Studier et al., 1986
BL21(DE3) IS5.8::Cm ^R -P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	BL21(DE3), но IS5.8:: $\lambda attR-cat-\lambda attL$ -P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	Данная работа
EA92 IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	EA92, но IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru}	Данная работа
EA92 IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} Δppa ::Cm ^R	EA92, но IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} и Δppa :: $\lambda attR-cat-\lambda attL$	Данная работа
Плазмиды:		
pKD46	oriR101, repA101ts, <i>araC</i> , P _{araB} -[γ , β , exo of phage λ], Ap ^R	Datsenko and Wanner, 2000
pMWts- λ Int/Xis	oriR101, repA101ts, λ cIts857, λ P _R → λ xis-int, Ap ^R	Minaeva et al., 2008
pAH123	oriR101, repA101ts, λ cIts857, λ P _R → $\phi 80-int$, Ap ^R	GenBank AY048726; Haldimann and Wanner, 2001
pET15b	Ap ^R , pBR322 origin, P _{lac} - <i>lacI</i> , and T7 promoter/O _{lac} , His6-Tag, T7 терминатор	«Novagen» (США)
pMW118-Km ^R	oriR101, repA, MCS, Ap ^R , $\lambda attR-kan-\lambda attL$, Km ^R	Ublinskaya Aet al., 2012
pMW118-Cm ^R	oriR101, repA, MCS, Ap ^R , $\lambda attR-kan-\lambda attL$, Cm ^R	Datsenko and Wanner, 2000
pET15b- <i>hisG</i>	pET15b, содержащая ген <i>hisG</i> , Ap ^R	Данная работа
pET15b- <i>hisG</i> ^{E271K}	pET15b, содержащая ген <i>hisG</i> ^{E271K} , Ap ^R	Данная работа

pAH162-Tc ^R -2Ter	attP <i>phi80</i> , pAH162, λ attL- <i>tetA-tetR-λattR</i>	Gene Bank AY048738; Minaeva et al., 2008
pMW119-P _{lac} - <i>lacI</i>	pMW119, но P _{lac} - <i>lacI</i> , Ap ^R	Лабораторная коллекция
pMW119-P _{lac} - <i>lacI-purA</i>	pMW119, но P _{lac} - <i>lacI-purA</i> , Ap ^R	Лабораторная коллекция
pAH162-Tc ^R -2Ter- <i>purA</i>	<i>oriRγ</i> , ϕ 80-attP, λ attL- <i>tetA-tetR-λattR</i> , <i>purA</i>	Лабораторная коллекция
pML-P _{lacUV5} - <i>lacI</i>	P _{lacUV5} - <i>lacI</i> , rep(pMB1), Ap ^R , Cm ^R	Skorokhodova et al., 2006
pAH162-Tc ^R -2Ter- <i>phoB</i> ^{DBD}	<i>oriRγ</i> , ϕ 80-attP, λ attL- <i>tetA-tetR-λattR</i> , <i>phoB</i> ^{DBD}	Лабораторная коллекция
pUC57- <i>hppa</i> ^{Rru}	Оптимизированный ген <i>hppa</i> ^{Rru} на векторе pUC57, Ap ^R	Данная работа
pAH162-Tc ^R -2Ter- <i>hppa</i> ^{Rru}	attP <i>phi80</i> , pAH162, λ attL- <i>tetA-tetR-λattR</i> , оптимизированный ген <i>hppa</i> ^{Rru}	Данная работа
pPK-T7lac- <i>yfp</i>	<i>Yfp</i> , T7lac $\equiv\phi$ 10/O _{lac} фага T7 полимеразы (ϕ 10), SD, O _{lac} , <i>lacI</i> , Km ^R	Лабораторная коллекция
pGL2	attP <i>phi80</i> , pGL2, pSC101, Cm ^R	Hook et al., 2016
pGL2- <i>atp</i>	attP <i>phi80</i> , pGL2, pSC101, Cm ^R , <i>atp</i> оперон	Hook et al., 2016
pGL2- <i>nuo</i>	attP <i>phi80</i> , pGL2, pSC101, Cm ^R , <i>nuo</i> оперон	Данная работа

3.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

В работе использовались олигонуклеотиды, синтезированные компанией «Евроген» или «Синтол». Дизайн олигонуклеотидов проводился с использованием программ OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., США) и «VectorNTI Advance 11.0» (ThermoFisher Scientific, США).

Таблица 3 - Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в данной работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Примечание
P1	tcgaaggaggcaacgatttcagctt	Праймеры для гибридизации фрагмента гена <i>ppa</i>
P2	tattgagatcccggctaacgcagat	
P3	tgagaatatactagtattatacc	Мутагенизирующие праймеры для получения ПЦР-фрагмента <i>nuoF</i> ^{E183A} для последующей интеграции в хромосому.
P4	catctgctggggaagcaacagc	
P5	ggaagcaacagcgttaatca	
P6	cagtggaacgaaaactcacgt	
P7	gaaggagttttgaaaaatgggtaacaacgtcgtcgt	

		<i>lacI-purA</i>
P8	ttacgcgtcgaacgggtcgc	Конструирование рMW119- <i>P_{lac}-lacI-purA</i>
P9	acgacgacgttgttacccattttcaaaactcctccgctcacaattccaca cattatacgcgac	Конструирование кассеты IS 5.11:: <i>Cm^R-P_{tac21}-purA</i>
P10	ggatattatcgtgaggatgcgtcatcgccattaatcgtcaagtagtata aaaaagctgaac	Конструирование кассеты IS 5.11:: <i>Cm^R-P_{tac21}-purA</i>
P11	gagcagagcgcggcggactggacgacgttggtcatagttagttctct tccggccaatgcttcg	Конструирование кассеты <i>Cm^R-P_L-purH</i>
P12	gtagacagcagctccacacc	Конструирование кассеты <i>Cm^R-P_L-purH</i>
P13	tcttgcaaaaacagcctgcgtttcatcagtaatagcgtcaagtagtata aaaaagcg	<i>Cm^R-P_L-aspC</i>
P14	agcggcggtaatgttctcaaacatgacgaggttcttagctgttctctct agacggccaatgct	<i>Cm^R-P_L-aspC</i>
P15	cgccgcttcatgctcctcaaaatggcgtaacgtcctgaagcctgcttttt atactaagttgg	Конструирование кассеты <i>ΔpitA::Km^R</i>
P16	gtacgattacaggaactgcaaggagagccagtacagcgtcaagtag tataaa aaagctgaac	Конструирование кассеты <i>ΔpitA::Km^R</i>
P17	aaatgtagcataggacgttacgccattttgaggacacgctcacaattcca cacat	Конструирование кассеты <i>Cm^R-P_{Lac}-pitA</i>
P18	tcagtggcgcaccagcatcaatattactaaaaggacgctcaagtagta taaaaaagct	Конструирование кассеты <i>Cm^R-P_{Lac}-pitA</i>
P19	attatcacgataaacatagaggcgaagtccaacgtggaaggtcatttt cctgaatatg	Конструирование фрагмента для создания точки интеграции φ80 в локусе <i>yjjK</i>
P20	ccggcattttacgcattacttcgcaatacgttgatcgtttgtgacagct gtccaat	
P21	agtgaatctggcgtactttgatgagtaagcaatgtgaagcctgcttttt atactaagttgg	Получение делеции оперона <i>nuoA-N</i> в хромосоме
P22	gttcagctttttatactaacttgagcgttgccaatgccgctgatgtaatctg ttactttgtaa	
P23	tggccagtccaagcttgcctgcagcgtcaagtagtataaaaa agctgaacgagaaaac	Конструирование <i>Cm^R-P_L-SD1-hppa^{Rru}</i> <i>Cm^R-P_{tac}-SD1-hppa^{Rru}</i> <i>Cm^R-P_{tac21}-SD1-hppa^{Rru}</i>
P24	agcggcggctacgacgaaaagatagatgccagccatagttagttctct tccggccaatgcttcgttcg	
P25	ctacgacgaaaagatagatgccagccatagctgttctctgtgaaattg ttatccgctcacaattccac	
P26	aaccgaagcccggcgttcagggttattacgccagaagaaccgctcaag tt agtataaaaaagctgaac	Конструирование кассеты <i>Δppa::Cm^R</i>
P27	ctcggcactgtttgccacatattttaaaggaacagactgaagcctgc tttttatactaagttgg	Конструирование кассеты <i>Δppa::Cm^R</i>
P28	catatgacagacaacactcgttta	Конструирование рекомбинантной плазмиды рЕТ15b- <i>hisG</i>
P29	ggatectcactccatcattcttcaat	Конструирование рекомбинантной плазмиды рЕТ15b- <i>hisG</i>
P30	tgtaaacgacggccagt	Для секенирования гена <i>hppa^{Rru}</i> с плазмиды рUC57

P31	aggaaacagctatgacat	Для секенирования гена <i>hppa</i> ^{Rtu} с плазмиды pUC57
-----	--------------------	--

3.3. 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. Для компенсации ауксотрофности штаммов-продуцентов ГИС добавляли аденозин (Аде) до конечной концентрации 0,1 г/л.

Для анализа кинетики роста клеток *E. coli*, ночные культуры штаммов разводили свежей питательной средой LB либо минимальной средой M9, содержащей 0,4% глюкозы до OD₆₀₀ = 0,15 и культивировали с аэрацией (70 об/мин) при температуре 37° С с периодическим измерением оптической плотности. Для этих целей использовали биофоторекодер TVS062CA Compaq rocking incubator («Advantec®»), позволяющий анализировать рост микроорганизмов в автоматическом режиме. Усреднение приведенных значений проводили по результатам двух независимых экспериментов для каждого штамма.

Используемые концентрации антибиотиков (в мкг/мл): хлорамфеникол (Cm) – 40; канамицин (Km) – 50, 100; тетрациклин (Tc) – 12,5; ампициллин (Ap) – 100. Химические реактивы фирмы «Sigma» (США), за исключением L-аминокислот, полученных от компании «Ajinomoto» (Япония).

3.4. Стандартные генно-инженерные методики

Рестрикцию, лигирование, электрофорез ДНК в геле 0,8% агарозы, электротрансформацию клеток *E. coli* проводили в соответствии с (Sambrook and Russel, 2001). 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). В работе использовали препараты эндонуклеаз рестрикции «Thermo Fisher Scientific» (Waltham, MA, USA) и «Promega» (USA), T4 ДНК-лигазы, *Pfu* ДНК-полимеразы, Long PCR Enzyme Mix и High Fidelity PCR Enzyme Mix Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) и *Taq* ДНК-полимеразы «Силекс-М» (Москва) в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя. Определение нуклеотидных последовательностей осуществлялось на коммерческой основе в лаборатории «Евроген» (Россия). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием банка данных NCBI (BLAST).

3.5. Электротрансформация компетентных клеток *E. coli*

Для приготовления электрокомпетентной культуры *E. coli*, на среде SOB выращивали ночную культуру *E. coli*, разводили ее в соотношении 1:100 и подращивали с аэрацией до ОП₆₀₀=0,5-0,6. Клетки собирали центрифугированием (4°C, 2 мин, 12000*g), дважды промывали ледяной деионизованной водой и ресуспендировали в 100-200 мкл ледяной деионизованной воды. В клеточную суспензию добавляли ДНК в количестве 1-50 нг и переносили в предварительно охлажденные кюветы для электропорации («Bio-Rad», США). Электропорацию проводили на приборе для бактериальной электротрансформации Gene Pulser Xcell Electroporation Systems («Bio-Rad», США). 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 добавляли 1 мл среды SOC. Сразу после добавления среды клетки подращивали с аэрацией в течение 2 часов

при 37°C, после чего суспензию высевали на чашки с агаризованной селективной средой. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C.

3.6. Получение препарата фага P1_{vir} для трансдукции в клетки *E. coli*

Наращивание препарата фага P1_{vir}, приготовление лизатов клеток *E. coli* с помощью фага P1_{vir} и трансдукционные скрещивания этим фагом проводили в соответствии с общепринятыми методиками (Miller, 1972).

3.7. λ Red-зависимая интеграция двухцепочечных фрагментов ДНК в хромосому *E. coli*

Введение генетических модификаций в хромосому *E. coli* с помощью λ Red-зависимой системы рекомбинации проводили по методике (Datsenko and Wanner et al., 2000) Штаммы *E. coli*, несущие хелперную плазмиду pKD46, которая обеспечивает арабинозо-индуцируемую экспрессию генов гомологичной рекомбинации фага λ , выращивали в течение ночи на SOB среде с добавлением Ar при 30 °C. Затем культуру клеток разводили в 100 раз свежей средой того же состава с добавлением Ar и арабинозы, необходимой для индукции экспрессии генов λ Red-системы. Клетки подращивали до ОП600=0,5-0,6 при 30 °C для приготовления электрокомпетентной культуры и процедуры электропорации, как описано выше (см. выше 3.5). Для излечения от хелперной плазмиды pKD46 клетки *E. coli* рассеивали до отдельных колоний на 42°C. Среди полученных колоний, отбирали чувствительные к Ar на 30 °C.

3.8. λ Int/Xis-зависимое удаление селективного маркера из хромосомы *E. coli*

Для удаления из хромосомы *E. coli* маркера устойчивости к антибиотику, фланкированного *attL* и *attR* сайтами фага λ из хромосомы *E. coli*, штаммы

трансформировали с помощью электропорации хелперной плазмидой pMW- λ Int/Xis (Ap^R), обеспечивающей экспрессию генов сайт-специфической рекомбинации фага λ . Клетки после электропорации высевали на твердую LB среду с ампицилином и инкубировали при 30° С в течение ночи. Среди полученных трансформантов отбирали колонии, чувствительные к соответствующему антибиотику, Cm, Km или Tc. Для излечения *E. coli* от термочувствительной хелперной плазмиды pMW- λ Int/Xis клетки рассеивали до отдельных колоний и инкубировали при 42° С. Среди полученных колоний, отбирали чувствительные к соответствующему антибиотику.

3.9. ϕ 80-зависимая интеграция двухцепочечных фрагментов ДНК в хромосому *E. coli*

ϕ 80-зависимая интеграция двухцепочечных фрагментов ДНК в хромосому *E. coli* осуществлялась при помощи хелперной плазмиды pАН123, содержащей ген ϕ 80-Int интегразы фага ϕ 80 (Haldimann and Wanner, 2001).

3.10. Гибридизация по Саузерну

Гибридизация по Саузерну была проведена согласно стандартному протоколу (Sambrook and Russell, 2001) с использованием следующего оборудования: Bright StarTM-Plus Positively Charged Nylon Membrane (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), VacuGene XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) и Hybridization oven/shaker (Amersham Biosciences). Для «мечения» зонда ДНК Biotin-11-dUTP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) стандартная ПЦР проводилась в 50 мкл. Реакционная смесь содержала необходимую пару праймеров, матрицу, 0,2 мМ Biotin labeling mix и *Taq* DNA полимеразу. Biotin labeling mix представляла собой водный раствор 2мМ dGTP, 2 мМ dATP, 2 мМ dCTP, 1,3 мМ dTTP, и 0,7 мМ Biotin-11-dUTP. Biotin chromogenic detection kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) использовался для

визуализации проб ДНК после гибридизации по Саузерну. Для амплификации проб использовали пару праймеров P1-P2 на ген *ppa* (Таблица 3).

3.11. Получение мембранных везикул

Получение препаратов везикул внутренней мембраны (ИМВ) *E. coli* для измерения активности NADH: убихинон оксидоредуктазного комплекса проводилось согласно известной методике (Noda et al., 2006). Ночную культуру штаммов *E. coli* выращенную при 37°C на среде LB, разводили в 100 раз средой LB и подращивали при 30°C до $OD_{600}=1,5-1,8$. Клетки из 100 мл центрифугировали при 8000g, 10 мин, 4°C, осадки два раза промывали 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,5), содержащим 5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ DTT и 10% глицерина. Осадки хранили при -70°C в кельвинаторе. Клетки промывали 50 мМ калий-фосфатным буфером (5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ DTT, 10% глицерин, pH 7,5), ресуспендировали в том же буфере, добавляли ДНКазу (10 мкг/мл) и РНКазу (10 мкг/мл). Затем дважды пропускали клетки через French Cell Press при 2000 pi. После этого, пробы центрифугировали при 8000 g при 4°C в течение 10 мин, чтобы удалить разрушенные клетки, и полученный супернатант центрифугировали на ультрацентрифуге при 120000 g, при 0°C в течение 2 ч.

Получение препарата мембранных везикул *E. coli* для измерения активности мембранной H^+ -пирофосфатазы из *R. rubrum* проводилось согласно известной методике (Belogurov et al., 2005) с модификациями. Ночную культуру штаммов *E. coli* выращенную при 37°C на среде LB, разводили в 100 раз средой LB и подращивали в колбе в 50 мл на среде LB с добавлением антибиотика Cm 40 мг/л при 37°C до $OP_{600}=0,8$. Клетки из 50 мл центрифугировали при 8000g, 10 мин, 4°C, осадки два раза промывали физиологическим раствором. Осадки хранили при -70°C в кельвинаторе. Клетки промывали и ресуспендировали в 25 мл буфера А (120 мМ Tris-HCl, 40 мкМ EGTA, 2 мМ $MgSO_4$, 10% glycerol, pH 7.5) и добавляли DNase I (1 мкл 1000U/25 мл). Затем дважды пропускали клетки через

French Cell Press при 2000 pi. После этого, пробы центрифугировали при 8000 g при 4°C в течение 30 мин, чтобы удалить разрушенные клетки, и полученный супернатант центрифугировали на ультрацентрифуге при 150000 g, при 4°C в течение 3 ч. Полученный препарат инвертированных мембранных везикул (ИМВ) хранили при -70°C в кельвинаторе.

Концентрации везикул в препаратах выражены как количество содержащегося в них белка, которое измеряли по методу Бредфорд а (Bradford, 1976) с использованием реагента Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, США) и БСА в качестве стандарта.

3.12. Измерение активности аспаратаминотрансферазы AspC

Для измерения ферментативной активности аспаратаминотрансферазы использовали непрямую реакцию NADH-зависимого превращения оксалоацетата в малат, катализируемую ферментом малатдегидрогеназой (MDH) (Ward et al., 2002). Реакционная смесь содержала 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM L-аспарат; 2 mM α -кетоглутарат; 0,1 mM пиридоксаль фосфат (PLP); 0,15 mM NADH и 2 U малатдегидрогеназы (МДГ, MDH). Реакцию инициировали добавлением аспаратаминотрансферазы. Трансаминазную активность определяли по убыли оптической плотности при 340 нм.

3.13. Экспрессия и очистка белка HisG

Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3)/pET15-*hisG* выращивали в 50 мл среды LB до $OP_{560}=0,8$. Экспрессию белка индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 1 mM с последующей инкубацией в течение 4 часов. Далее клетки осаждали центрифугированием, дважды промывали 50 мл 100 mM раствора NaCl, снова центрифугировали, ресуспендировали в 50 мл буфера I (300 mM Tris-HCl, 300 mM KCl и 1 mM PMSF, pH 8,1) и дважды пропускали через French Cell Press при 2000 pi (4° C). После чего центрифугировали при 12000

об/мин в течение 30 минут при 4° С. Супернатант наносили на 1-мл колонку NiTrap® («Pharmacia», Швеция). Затем эту колонку промывали 10 мл буфера I, а связанный белок элюировали линейным градиентом буфера I и буфера II (20 мМ Трис-НСl, 400 мМ имидазол, рН=8). Полученный препарат НТ-HisG дополнительно очищали при помощи гель-фильтрации, используя 10-мл колонку BioGel P10 («Pharmacia», Швеция), уравновешенную буфером III (20 мМ калий-фосфатный буфер, рН 7, 1 мМ DTT, 10 мкМ PLP, 10%. об. глицерина). Данный метод использовался для очистки двух АТФ-фосфорибозилтрансфераз: нативного фермента НТ-HisG и мутантного фермента НТ-HisG^{E271K}. Чистота полученных белков составляла более 90% согласно анализу SDS-PAGE (Рисунок 16).

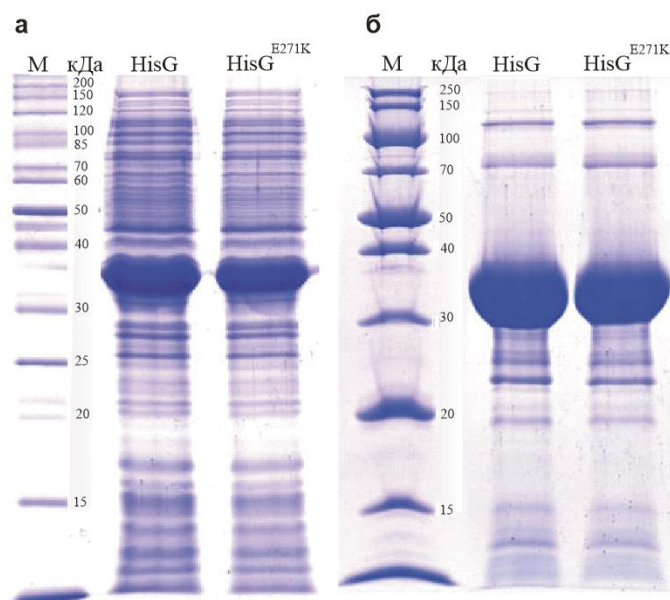


Рисунок 16 – Экспрессия и очистка фермента дикого типа НТ-HisG и мутантного фермента НТ-HisG^{E271K} со снятым ретроингибированием.

М, маркер молекулярной массы белков; (А) SDS-полиакриламидный гель с суммарным белком, содержащим НТ-HisG и НТ-HisG^{E271K} до очистки. HisG, лизат клеточного экстракта штамма BL21 (DE3)/pET15-*hisG* после индукции ИПТГ; HisG^{E271K}, лизат клеточного экстракта штамма BL21 (DE3)/pET15-*hisG*^{E271K} после индукции. (В) SDS-полиакриламидный гель с двумя очищенными ферментами НТ-HisG. HisG, дикий тип НТ-HisG после очистки; HisG^{E271K}, НТ-HisG^{E271K} после очистки.

3.14. Измерение активности АТФ-ФРТ HisG

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). Реакции проводили в 96-луночных планках (UV-star, Greiner Bio-One, Германия). Реакционная смесь состояла из 100 мМ Трис-НСl (рН 8,1), 100 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ АТФ, 1 мМ ФРПФ, 10 mU пирофосфатазы и 500 нМ очищенного фермента АТФ-ФРТ *E. coli* (Tébar and Ballesteros, 2014). Реакция была инициирована добавлением АТФ. Поглощение при 290 нм контролировали в течение 30 минут с 2-минутными интервалами (Tecan, Швейцария). Реакционную смесь, содержащую воду вместо субстрата АТФ, использовали в качестве отрицательного контроля. Для проверки ингибирования фермента АТФ-ФРТ, АМФ и АИКАР добавляли в исходную реакционную смесь.

Стоит отметить, что молярные коэффициенты экстинкции для АИКАР и АМФ составляют $\epsilon_{290,\text{АИКАР}}=2700/\text{M}/\text{cm}$ и $\epsilon_{290,\text{АМФ}}=240/\text{M}/\text{cm}$, соответственно. Поэтому концентрации АИКАР выше 1 мМ были нежелательны для измерений, но концентрации АМФ до 5 мМ могли использоваться без значительных помех. Для получения значений $K_{I,\text{АМФ}}$ и $K_{I,\text{АИКАР}}$, АМФ или АИКАР добавляли к реакционной смеси до конечной концентрации 20 мМ и 1 мМ, соответственно. Для расчета констант ингибирования использовали следующую формулу (Waigh T.A., 2014): $K_I=[I]/((K_{Mi}/K_M)-1)$, где K_I - константа ингибирования, $[I]$ - концентрация ингибитора, K_M является константой Михаэлиса, K_{Mi} является значением K_M в присутствии ингибитора.

3.15. Измерение активности щелочной фосфатазы PhoA

Ферментативную активность щелочной фосфатазы *E. coli* PhoA измеряли по известной методике (Brickman and Beckwith, 1975) с модификациями. Клетки выращивали в колбе в течение 24 ч в среде MOPS. Клетки разрушали при помощи ультразвука, а клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 1200 об/мин в течение 20 минут при 4°C. Ферментативную активность PhoA анализировали через 2 или 24 ч после истощения неорганического P_i. Реакционная смесь

содержала 500 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ MgCl₂ и супернатанта, содержащего 0,02-0,1 мг белка. Реакцию проводили в 96-луночных плашках (UV-star, Greiner Bio-On, Германия). В качестве субстрата использовали п-нитрофенилфосфат (pNPP). После добавления pNPP реакционную смесь инкубировали при 37°С в течение 3–4 мин, после чего она становилась желтой. Реакцию останавливали добавлением 1 М КН₂РО₄ и измеряли оптическую плотность при 410 нм.

3.16. Измерение неорганического фосфата Р_i

Количество Р_i в среде определяли с помощью общепринятого метода, основанного на восстановлении фосфомолибдата до молибденового синего (Ernster and Lindberg, 1956). В 96-луночные плашки, содержащие 0,1 мл анализируемого образца, добавляли 0,075 мл окрашенной смеси (4 об. 2,5% раствора молибдата аммония с 1 об. 2,5% раствора сульфата железа), полученную смесь перемешивали миксером Vortex и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Для построения калибровочной кривой окрашенную смесь добавляли к образцам, содержащим стандартные растворы КН₂РО₄. Поглощение измеряли при длине волны 700 нм. Образец без добавления Р_i использовали в качестве отрицательного контроля.

3.17. Измерение активности растворимой пирофосфатазы Ppa *E. coli*

Ферментативную активность неорганической растворимой пирофосфатазы Ppase *E. coli* измеряли по известной методике (Heinonen and Lahti, 1981) с модификациями. Клетки *E. coli* культивировали в 5 мл среды LB/M9 (1/10) и выращивали до логарифмической фазы ОП₆₀₀=0,7. Осадок клеток ресуспендировали в 50 мМ буфере трис-НСl (4 мг/мл MgSO₄×7Н₂О, 7,5 мг/мл КCl, рН 8,0), разрушали ультразвуком в течение 2×30 при 4°С и центрифугировали 20 мин при 12000 об/мин (4 °С). Концентрацию белка определяют методом Бредфорда. Реакционная смесь состояла из 50 мМ буфера трис-НСl (рН 8,0) и

клеточного лизата. Реакцию начинали добавлением 20 мкл 50 мМ PP_i с последующей инкубацией в течение 30 минут. После завершения реакции добавляли 20 мкл 1 М лимонной кислоты. Реакционную смесь, где лимонную кислоту добавляли перед добавлением PP_i , использовали в качестве отрицательного контроля. Для определения неорганического P_i в пробах (50-1500 нМ P_i), добавляли 1 мл раствора ААМ, тщательно перемешивали миксером Vortex и добавляли 0,1 мл 1 М лимонной кислоты. Поглощение желтого цвета измеряли при 350 нм в 96-луночной плашке (UV-star, Greiner Bio-On, Германия). Образец без добавления лизата использовали в качестве отрицательного контроля. Для построения калибровочных кривых использовали стандартные растворы KH_2PO_4 . Удельную активность определяли по формуле: A (мкМ/(t мин*мг белка)) = ((cP_i мМ)/(t мин*мг белка*1000)), где A_{350} - оптическая плотность в УФ-плашке; t, время реакции).

3.18. Измерение активности мембранной H^+ -пирофосфатазы из *R. rubrum*

Ферментативную активность мембранной H^+ -пирофосфатазы из *R. rubrum* в мембранных везикулах качественно определяли с помощью коммерчески доступного набора PiPer™ (Molecular Probes, США). Используемый протокол обеспечивает сверхчувствительный анализ, который обнаруживает свободный фосфат P_i в растворе посредством образования флуоресцентного продукта резорурфина, детектируемого при длинах волн поглощения/испускания около 563/587 нм. Стоит заметить, что используемый метод определения P_i способен детектировать очень низкие ферментативные активности P_i -генерирующих ферментов, в том числе растворимой пирофосфатазы. Чтобы исключить контаминацию препарата ИМВ неспецифической пирофосфатазной активностью, присутствующей в растворимой фракции, в реакционную смесь был добавлен фторид натрия. Согласно литературным данным (Раздел «Обзор литературы»), мембранные пирофосфатазы, в частности H^+ -PPase^{Rru}, имеет низкую специфичность к этому ингибитору растворимой пирофосфатазы – фториду

(5% активности H^+ -PPase^{Rtu} ингибируется 0,25 ммоль фторида). В результате, добавление фторида натрия позволило существенно снизить вклад цитоплазматической пирофосфатазы в измеряемую активность, связанный с контаминацией препарата ИМВ следовыми количествами этого фермента (Рисунок 17).

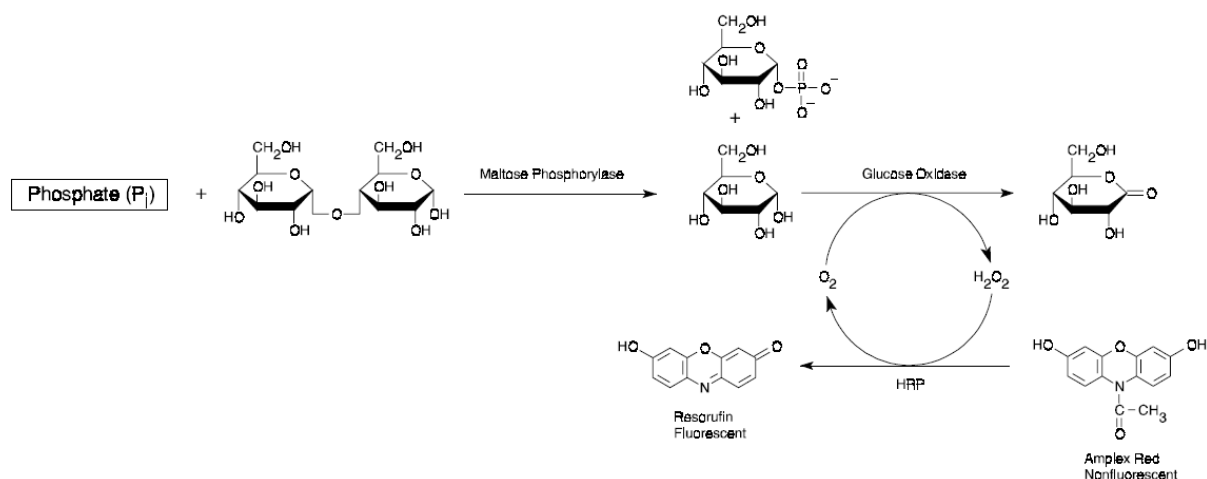


Рисунок 17 – Детекция свободного фосфата P_i в растворе при помощи набора P_i PerTM Phosphate Assay Kit посредством образования флуоресцентного продукта резорурфина (Рисунок Molecular Probes, USA).

3.19. Измерение активности NADH: убихинон оксидоредуктазы I

Ферментативную активность неорганической NADH: убихинон оксидоредуктазы измеряли по известной методике (Noda et al., 2006). Для измерения использовали три субстрата: NADH (для определения общей активности NADH-дегидрогеназ, в которую входит как активность NDH-1, так и NDH-2), deamino-NADH (для определения активности только NDH-1), NADPH (для определения изменения субстратной специфичности NDH-1). Скорость окисления субстрата, а, следовательно, и скорость всего сопряженного процесса определяли по убыли оптической плотности раствора при длине волны 340.

В ходе ферментативной реакции происходит превращение NADH (deamino-NADH/NADPH) в NAD^+ (deamino- NAD^+ /NADP⁺), которое регистрировали

спектрофотометрически: измеряя поглощение NADH, deamino-NADH или NADPH во времени, после чего определяли ферментативную активность. Измерения проводили в кварцевой кювете (оптический путь 1 см) на приборе Infinite® (Tecan, Австрия) при комнатной температуре. Оптическую плотность при 340 нм анализировали через каждые 30 секунд. В начале реакции анализировали в течение нескольких минут изменение количества NADH или NADPH, не связанного со специфической активностью фермента.

Реакционная среда для определения активности NADH-дегидрогеназ состояла из 2 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (5 мМ MgSO₄, 0,2 мМ, NADH/deamino-NADH/NADPH, pH 7,5). Реакцию начинали добавлением в кювету мембранной фракции и измеряли убыль оптического поглощения при 340 нм через равные промежутки времени.

Удельная активность NDH-дегидрогеназ определяли по скорости реакции и рассчитывали по формуле: $A = \Delta A_{340} * 1000 / (\epsilon * t(\text{мин}) * m(\text{мг}))$ (нМ/(мин*мг)), где ΔA_{340} - изменение в поглощении NADH или NADPH, вызванное специфической активностью фермента, произошедшее за время t (мин); ϵ - коэффициент молярной экстинкции, равный 6,22 мМ⁻¹ см⁻¹ при длине волны 340 нм для всех субстратов; m - масса вносимого белка, равная вносимому объему ферментного препарата, умноженному на общую концентрацию белка в нем (мг).

3.20. Пробирочная ферментация штаммов-продуцентов L-гистидина и анализ накопления продукта методом ТСХ

Для культивирования продуцентов ГИС, клетки *E. coli* первоначально подращивали с аэрацией (250 об/мин) в среде LB при 30°C в течении ночи. Полученные культуры разводили свежей средой того же состава до конечной ОП=0,2 и растили 2-3 часа до ОП₆₀₀=0,5-0,6. Затем клеточные культуры (100 мкл) использовали для пересева в пробирки (20 x 200 мм) с 2 мл ферментационной среды следующего состава (в г/л): соевая мука гидролизат («Ajinomoto», Japan), 0,1; L-аспартат, 0,5; (NH₄)₂SO₄, 9; KCl, 0,5; KH₂PO₄, 0,25; MgSO₄·7H₂O, 0,2;

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; аденозин 0,1; витамин В1, 0,0005; бетаин, 1; CaCO_3 , 30; pH был доведен до 6,0. Для поддержания уровня pH, стерильный мел (0,3 г/100 мл) был добавлен в ферментационную среду. Клетки культивировали с аэрацией (250 об/мин) в течение 72 часов при 30°C до полного потребления глюкозы клетками. Истощение глюкозы определяли при помощи тест-полосок Глюкофан (Glucorphan). Образцы, полученные по окончании ферментации, разводились 0,1 Н HCl для определения ОП₆₀₀.

Концентрация накопленного в ферментационной среде ГИС определялась методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием стеклянных пластин, покрытых слоем силикогеля Silica gel 40 F254 («Merck», Germany). Полученные образцы были нанесены на ТСХ пластину при помощи полуавтоматического прибора-амплификатора («Camag», Switzerland) в программе Linomat 5. Пластины были погружены в хроматографические камеры в элюент с подвижной фазой следующего состава: изопропанол : ацеон : 25% раствор аммиака : вода в соотношении 12,5 : 12,5 : 3 : 2 (v/v). После завершения процесса пластинку вынимали из камеры, высушивали и визуализировали разделенные зоны после ее обработки раствором нингидрина (1%) в ацетоне. Пластины сушили и сканировали с помощью сканирующего устройства Camag TLC Scanner 3, с детектированием при 520 нм и использованием программного обеспечения winCATS (версия 1.4.2).

3.21. Культивирование в ферментерах (периодический процесс)

Периодическое культивирование проводили в лабораторном ферментере с использованием стеклянного сосуда объемом 1 л и рабочим объемом 0,3 л (ABLE, Япония). Среда содержала 30 г/л глюкозы, 5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 г/л KH_2PO_4 , 20 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 мг/л $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,4 мг/л тиамин-HCl, 0,4 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,4 г/л гидролизата соевых бобов. Клетки культивировали аэробно при 37 °C, а pH среды поддерживали на уровне 6,6 путем добавления смеси глюкозы и аммиака. Требуемая концентрация растворенного кислорода поддерживалась

регулируемым перемешиванием жидкости при подаче воздуха в аппарат. Для посевной культуры штаммы *E. coli* культивировали в течение ночи при 37 °С на чашках LB, содержащих 1% бакто-триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl и 1,5% агар-агара. Затем, клетки переносили в 40 мл среды LB, pH 7,0, в колбы (750 мл) и культивировали в течение 4,5 ч при 37 °С при 140 об/мин.

3.22. Мутагенез гена *nuoF* для получения замены E183A, обеспечивающей двойную кофакторную специфичность комплекса NAD(P)H: убихинон-оксидоредуктазы I типа

Для конструирования штамма *E. coli*, содержащего мутацию в гене *nuoF*, был применен подход, основанный на λ Red-зависимой рекомбинации с использованием гена *sacB* из *Bacillus subtilis* в качестве контрселективного маркера (Li et al., 2013). На первом этапе в хромосоме MG1655 получали микроделецию кодона E183 в гене *nuoF* методом λ Red-зависимой рекомбинации с одновременной интеграцией ПЦР-фрагмента, содержащего ген устойчивости к хлорамфениколу *cat*, фланкированный attL/R сайтами фага λ ; и ген левансуказы *sacB* из *B. subtilis* (Pelicic et al., 1996). После интеграции фрагмента отбирали Cm-устойчивые клоны не способные расти на минимальной среде, содержащей сахарозу (Suc⁻).

Для получения ПЦР-фрагмента, содержащего точечную мутацию E183A в гене *nuoF*, использовали метод «overlap» ПЦР с перекрывающимися праймерами. На первом этапе, проводили независимую амплификацию двух перекрывающихся ПЦР-фрагментов с праймеров P3-P4 и P5-P6 (Таблица 3), содержащих правую и левую части мутагенизируемого фрагмента ДНК. На втором этапе, очищали полученные фрагменты и объединяли в заключительную ПЦР-реакцию, смешивая фрагменты друг с другом в эквимольном соотношении. После цикла тепловой денатурации и ренатурации использовали смесь фрагментов в качестве матрицы с внешними праймерами P3 и P6 (Таблица 3). На заключительном этапе происходила достройка цепей перекрывающихся фрагментов ДНК, и

образовавшийся фрагмент двухцепочечной ДНК, содержащий требуемую мутацию, далее служил матрицей для амплификации фрагмента ДНК, несущего мутацию E183A (Рисунок 18).

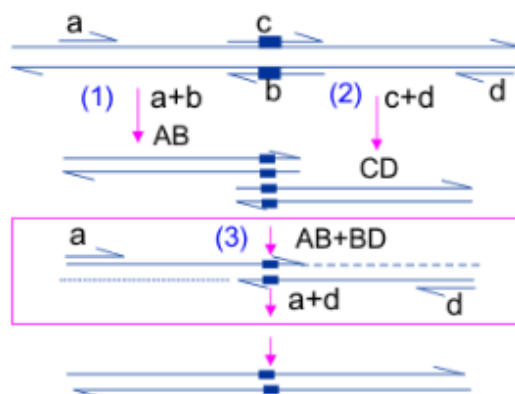


Рисунок 18 – Получение точечной мутации *nuoF*^{E183A}.

a(P3) и d(P6) - внешние праймеры, b(P4) и c(P5) - внутренние праймеры. AB и CD - фрагменты ДНК, образовавшиеся в результате ПЦР с использованием праймеров a(P3) и b(P4), или c(P5) и d(P6), соответственно. Объединяющая реакция ПЦР показана розовым прямоугольником: после гибридизации друг с другом одноцепочечные участки достраиваются в процессе ПЦР.

3.23. Конструирование интегративных кассет

Конструирование интегративной кассеты IS5.11::Cm^R-P_{lac21}-*purA*

Для конструирования интегративной кассеты *attL-cat-attR*-P_{lac21}-*purA* в точке интеграции Δ(φ80-*attB*), нативный ген *purA* был наработан с праймерами P7-P8 (Таблица 3) с использованием хромосому штамма дикого типа MG1655 *E. coli* в качестве матрицы. Данный ПЦР фрагмент ДНК был клонирован на pMW119-P_{lac}-*lacI* вектор, предварительно порезанный по сайту *Sma*I. Полученная рекомбинантная плазмида pMW119-P_{lac}-*lacI-purA* была порезана по сайтам *Vam*HI и *Kpn*I и полученный в результате рестрикции *purA*-содержащий фрагмент ДНК был переклонирован на интегративный вектор pAN162-Tc^R-2Ter. Полученная рекомбинантная плазмида pAN162-Tc^R-2Ter-*purA* использовалась для φ80-

интеграции гена *purA* в искусственный сайт $\phi 80$ -*attB* штамма *E. coli* MG1655 $\Delta(\phi 80$ -*attB*) IS5.11:: $\phi 80$ -*attB* (Minaeva et al., 2008). Экспрессия гена *purA* была активирована интеграцией промотора средней силы P_{tac21} , содержащего две точечные мутации в области -35 (*ttgaca* последовательность известного промотора P_{tac} была заменена на *tttgca*) перед геном при помощи праймеров P9-P10 (Таблица 2).

Конструирование интегративной кассеты Cm^R - P_L -*purH*

Для конструирования интегративной кассеты Cm^R - P_L -*purH*, природная регуляторная область перед геном *purH*, который ассоциирован с геном *purD* в одном опероне, была заменена на сильный λ - P_L промотор при помощи λ Red-зависимой интеграции. Для этого был наработан ПЦР-фрагмент ДНК, содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу Cm^R и фланкирующие последовательности области генов оперона *purHD*, при помощи праймеров P11-P12 (Таблица 3).

Конструирование интегративной кассеты Cm^R - P_L -*aspC*

Для конструирования интегративной кассеты Cm^R - P_L -*aspC*, природная регуляторная область перед геном *aspC* была заменена на сильный λ - P_L промотор при помощи λ Red-зависимой интеграции. Для этого был наработан ПЦР-фрагмент ДНК, содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу Cm^R и фланкирующие последовательности области гена *aspC*, при помощи праймеров P13 и P14 (Таблица 3).

Получение делеции гена *pitA* в хромосоме

Конструирование делеционной кассеты $\Delta pitA::Km^R$ осуществлялось при помощи метода λ Red-зависимой интеграции с праймерами P15 и P16 (Таблица 3). В качестве матрицы использовали плазмиду pMW118- Km^R .

Конструирование интегративной кассеты Cm^R - P_{Ltac} -*pitA*

Для конструирования интегративной кассеты Cm^R - P_{Ltac} -*pitA*, природная регуляторная область перед геном *pitA*, была заменена на сильный λ - P_{Ltac} промотор *ggcgggtg-ttgaca-attaatcatcggctcgtataatgt-gtggaaat* (гибрид λ - P_L (*ggcgggtg*) и λ - P_{tac} (*attaatcatcg-gctcgtataatgtgtggaaat*) промоторов) при помощи λ Red-зависимой интеграции. Для этого был наработан ПЦР-фрагмент ДНК, содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу Cm^R и фланкирующие последовательности области гена *pitA*, при помощи праймеров P17 и P18 (Таблица 3).

Конструирование искусственного сайта attB- ϕ 80 в локусе *yjjK*

Для конструирования искусственного ϕ 80-*attB* сайта в локусе *E. coli yjjK* был наработан ПЦР-фрагмент ДНК *yjjK::attL ϕ 80-kan-attR ϕ 80*, содержащий ген, устойчивый к канамицину Km^R и фланкированный сайтами *attL/attR* фага ϕ 80. Для наработки соответствующего фрагмента использовались праймеры P19 и P20 (Таблица 3). В качестве матрицы использовали хромосому штамма MG1655 $\Delta(attB-\phi 80)$ IS5.11::*attL ϕ 80-kan-attR ϕ 80* (Minaeva et al., 2008). Полученный ПЦР-фрагмент ДНК был интегрирован в хромосому штамма, содержащего делецию собственного *attB*- ϕ 80. Устойчивость к канамицину Km^R была удалена с использованием хелперной плазмиды pMWts- λ Int/Xis. В результате был получен штамм MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)^{native}$ *yjjK::(\phi 80-attB)*.

Получение делеции оперона *пиоА-N* в хромосоме

Конструирование делеции оперона *nuoA-N* в хромосоме осуществлялось при помощи метода λ Red-зависимой интеграции с праймерами P21 и P22 (Таблица 3). В качестве матрицы использовали плазмиду pMW118-Cm^R.

Конструирование интегративной кассеты IS5.11::Cm^R-P_{nuo}-*nuoA-N*

Интеграцию дополнительной копии *nuoA-N* (*nuo*) оперона в хромосоме *E. coli*, осуществляли в искусственный сайт ϕ 80-*attB* хромосомы *E. coli* MG1655 $\Delta(\phi$ 80-*attB*) IS5.11:: ϕ 80-*attB* (Minaeva et al., 2008). Для интеграции использовали “PCR-free” метод клонирования ДНК фрагментов на вектор pGL2 (Hook et al., 2016). На первом этапе, *nuoA-N* оперон со своей природной регуляторной областью был фланкирован кассетами *I-SceI*- λ attR-Cm^R- λ attL (upstream) and *I-SceI*- λ attR-Tc^R- λ attL (downstream). После этого, ДНК фрагмент, содержащий *I-SceI* в полученном штамме с маркированным λ attR-*cat*- λ attL-*nuoA-N* опероном был лигирован с *I-SceI* ПЦР-фрагментом, несущим ϕ 80-*attP* сайт, соответственно. В результате была получена плазида pGL-*nuo*. Затем, штамм MG1655 $\Delta(\phi$ 80-*attB*) IS5.11:: ϕ 80-*attB* был трансформирован полученной лигазной смесью. В результате был получен штамм MG1655 IS5.11::Cm^R-P_{nuo}-*nuo* с дополнительной копией *nuo* оперона с природной регуляцией.

Конструирование интегративных кассет с геном *hppa*^{Rru} *R. rubrum* в точках интеграции ϕ 80-*attB*

Интегративная рекомбинантная плазида pAH162-Tc^R-2Ter-*hppa*^{Rru}, была интегрирована в хромосому штамма *E. coli* MG1655 $\Delta(\phi$ 80-*attB*)^{native} IS5.8:: ϕ 80-*attB*, который содержит искусственный ϕ 80-*attB* сайт в IS5.8 локусе, а также делецию природного ϕ 80-*attB* сайта (Minaeva et al., 2008). Для осуществления

$\phi 80$ -зависимой интеграции, штамм MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)^{native}$ IS5.8::($\phi 80-attB$) был трансформирован хелперной термоиндуцибельной плазмидой pAH123 (Haldimann and Wanner, 2001).

Отбор полученных интегрантов MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)^{native}$ IS5.8::pAH162-Tc^R-2Ter-*hppa*^{Rru} проводили на селективной среде с Tc. Далее производилось вырезание части интегративного вектора, содержащей ген устойчивости к тетрациклину Tc^R, фланкированной $\lambda attL/R$ -сайтами, и ориджин репликации при помощи $\lambda Int/Xis$ -системы. В результате был получен безмаркерный штамм MG1655 $\Delta(\phi 80-attB)^{native}$ IS5.8::*hppa*^{Rru} с копией гена *hppa*^{Rru} в хромосоме.

Экспрессия гена мембранной пирофосфатазы *hppa*^{Rru} в искусственном $\phi 80-attB$ сайте IS5.8 локуса *E. coli* была активирована путем введения конститутивных промоторов разной силы (P_L , P_{tac} и P_{tac21}) перед геном *hppa*^{Rru} методом λRed -зависимой интеграции. Для этого, были наработаны соответствующие ПЦР фрагменты ДНК (Cm^R-P_L , Cm^R-P_{tac} , Cm^R-P_{tac21}), содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу Cm^R и последовательность соответствующих промоторов P_L , P_{tac} и P_{tac21} , сцепленных с консенсусной SD1 (*gaagga*) последовательностью. Фрагменты ДНК для замены P_L промотора амплифицировали с использованием праймеров P23-P24 (Таблица 3) (интегративная кассета $Cm^R-P_L-SD1-hppa^{Rru}$) и хромосомы MG1655 $Cm^{exc}-P_L-SD1-ilvG\ valR71\ ilvH^{**}$ в качестве матрицы. Фрагменты ДНК для замены P_{tac} и P_{tac21} промоторов амплифицировали с использованием праймеров P23-P25 (Таблица 3) (интегративные кассеты $Cm^R-P_{tac,tac21}-SD1-hppa^{Rru}$) и хромосом *attR-cat-attL-P_{tac}-lac* и *attR-cat-attL-P_{tac21}-lac* в качестве матрицы, соответственно.

Для интеграции полученных ПЦР фрагментов ДНК использовали метод λRed -зависимой интеграции (Datsenko and Wanner, 2000). В результате была получена линейка штаммов, содержащих ген *hppa*^{Rru} под контролем конститутивных промоторов P_L , P_{tac} и P_{tac21} . Удаление маркера устойчивости к хлорамфениколу Cm^R производили с помощью $\lambda-Int/Xis$ системы.

Получение экспрессионной кассеты, содержащей ген мембранной пирофосфатазы *hppa*^{Rru} под контролем промотора P_L в искусственных $\phi 80-attB$

сайтах межгенной области локуса *adrA* (экспрессионная кассета *adrA*Ω::Cm^R-P_L-SD1-*hppa*^{Rru}) и локусе *adhE* (экспрессионная кассета *adhE*::Cm^R-P_L-SD1-*hppa*^{Rru}), осуществлялись аналогичным способом. Штаммы *E. coli* MG1655 Δ(φ80-*attB*)^{native} *adrA*Ω::φ80-*attB* и MG1655 Δ(φ80-*attB*)^{native} *adhE*::φ80-*attB* для конструирования второй и третьей копий гена *hppa*^{Rru} в хромосоме были любезно предоставлены Паничкиным В. Б. («АО АГРИ»).

Получение делеции гена *ppa* в хромосоме

Для конструирования штамма с инактивированным существенным геном растворимой пирофосфатазы *ppa* из *E. coli* был наработан соответствующий ПЦР фрагменты ДНК (*λattL-cat-λattR-Δppa*), содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу Cm^R фланкированный *attL/R* фага λ и сцепленный с последовательностью гена *ppa*. Фрагмент ДНК амплифицировали с использованием праймеров P26 и P27 (Таблица 3) и плазмидой pMW118-Cm^R в качестве матрицы.

Для интеграции полученного фрагмента ДНК использовали метод λRed-зависимой интеграции. В качестве реципиента использовали штамм MG1655 Δ(φ80-*attB*)^{native} IS5.8:: P_L-SD1-*hppa*^{Rru}, который содержит ген *hppa*^{Rru} под контролем промотора λP_L. Реципиентный штамм был трансформирован хелперной термочувствительной плазмидой pKD46 (Datsenko and Wanner, 2000). Факт интеграции делеции *Δppa* в хромосому MG1655 Δ(φ80-*attB*)^{native} IS5.8::P_L-SD1-*hppa* подтверждался с методом ПЦР и Саузерн-блоттингом (см. п. 3.10).

Конструирование рекомбинантных плазмид

Конструирование рекомбинантных плазмид pET15b-*hisG* и pET15b-*hisG*^{E271K}

Нативный ген *hisG* был клонирован на коммерчески доступный вектор pET15b («Novagen», США) после ПЦР амплификации при помощи праймеров P28

и P29 (Таблица 3). Для этого, полученные ПЦР фрагменты обрабатывали эндонуклеазами *Bam*HI и *Nde*I с последующим лигированием на вектор pET15b, который был обработан теми же ферментами. В результате была получена рекомбинантная плазмида pET15b-*hisG*, содержащая ген, кодирующий АТФ-ФРТ HisG и меченного His₆-Tag (НТ-HisG) на N-конце. Плазмида pET15b-*hisG*^{E271K}, которая содержит ген, кодирующий мутантный устойчивый к ретроингибированию фермент HisG^{E271K}, меченный His₆-Tag (НТ-HisG^{E271K}), была получена аналогичным образом.

Конструирование интегративной плазмиды pАН162-Tc^R-2Ter-*hppa*^{Rru}

Оптимизированный ген *hppa*^{Rru} из *R. rubrum*, кодирующий H⁺-переносящую мембранную пирофосфатазу, был химически синтезирован *de novo* на коммерчески доступном векторе pUC57 («GenScript[®]», США). Плазмиду pUC57-*hppa*^{Rru} вводили в клетки штамма *E. coli* DH5α методом электропорации. Затем выделяли плазмиду из клеток полученного штамма *E. coli* DH5α/pUC57-*hppa*^{Rru}. Наличие гена *hppa*^{Rru} подтверждалось с помощью рестрикционного анализа и метода ПЦР. Далее ген *hppa*^{Rru} был переклонирован из полученной плазмиды pUC57-*hppa*^{Rru} в интегративный вектор pАН162-Tc^R-2Ter. Интегративный вектор включает необходимые сайты для клонирования (MCS); условно репликативный ориджин oriRγ; *attL/attR* фага λ; бактериальный терминатор *rgnB*; терминатор *tL3* фага λ; ген устойчивости к тетрациклину *tetA*, ген репрессора *tetR* из Tn10, а также *attP* фага phi80, что позволяет обеспечить его последующую φ80-зависимую интеграцию в хромосому *E. coli* с последующим вырезанием векторной части методом Dual In/Out (Minaeva et al., 2008). Переклонирование осуществлялось в два этапа путем последовательной обработки плазмиды pUC57-*hppa*^{Rru} и вектора для клонирования pАН162-Tc^R-2Ter рестриктазами *Pst*I и *Sac*I, очисткой полученных фрагментов при помощи набора («QIAquick Gel Extraction Kit», Германия) и последующего их лигирования.

На первом этапе, при обработке рUC57-*hppa*^{Rru} и вектора для клонирования рАН162-Тс^R-2Ter рестриктазой *Pst*I, были получены следующие фрагменты: фрагменты I – 2696 п.н. и II – 2152 п.н., содержащий ген *hppa*^{Rru} (обработка исходной плазмиды рUC57-*hppa*^{Rru}); фрагмент III – 4463 п.н. (обработка вектора для клонирования рАН162-Тс^R-2Ter). На втором этапе, выделенные из геля и очищенные при помощи набора («QIAquick Gel Extraction Kit», Германия) фрагменты II – 2152 п.н., содержащий ген *hppa*^{Rru} и III – 4463 п.н., содержащий линейный вектор для клонирования рАН162-Тс^R-2Ter, были обработаны рестриктазой *Sac*I. Проведена последующая процедура выделенные из геля и очистки. Полученные на втором этапе фрагмент и вектор были лигированы в соотношении 1:1.

Полученная после очистки лигазная смесь, содержащая клонированный на вектор рАН162-Тс^R-2Ter ген *hppa*^{Rru}, была введена в реципиентный штамм *E. coli* TG1 λ *pir*⁺ при помощи электропорации. Трансформанты, содержащие интегративную плазмиду рАН162-TetA-TetR-2Ter-*hppa*^{Rru}, отбирали на среде с тетрациклином Тс^R (12,5 мг/мл). Наличие гена *hppa*^{Rru} в заданной ориентации, а также ожидаемая структура плазмиды были подтверждены рестрикционным анализом и секвенированием. Амплификация фрагмента ДНК для секвенирования проводилась при помощи ПЦР с использованием праймеров P30 и P31 (Таблица 3).

4. Результаты и обсуждение

4.1. Поиск новых мишеней для АИКАР в клетках *E. coli* и усиление превращения его в нуклеотиды аденина для повышения продукции L-гистидина

Начальным этапом конструирования бактериальных штаммов-продуцентов ГИС является изменение регуляции биосинтеза этой аминокислоты. При этом, как было описано в разделе «Обзор литературы», особо значимым является (1) получение мутантных форм ключевого фермента синтеза ГИС, АТФ-ФРТ, устойчивого к ретроингибированию, а также (2) увеличение уровня транскрипции генов биосинтеза ГИС. Полученный ранее штамм-продуцент ГИС *E. coli* KF37 (MG1655⁺ *hisG*^{E271K} *DCBHAFI Phis-ΔhisL' ΔpurR*) содержал ген *hisG*^{E271K}, кодирующий фермент АТФ-ФРТ, устойчивый к ретроингибированию. Помимо этого, *his*-оперон у этого штамма содержал делецию гена *hisL*, кодирующего лидерный пептид, что, в отсутствие аттенуации транскрипции, приводило к конститутивной экспрессии оперона. Кроме того, из хромосомы штамма был удален ген *purR*, кодирующий транскрипционный регулятор, контролирующей экспрессию целого ряда генов, включая гены биосинтеза пуринов *de novo*, что приводило также к повышению синтеза ФРПФ, общего предшественника в пути биосинтеза как ГИС, так и пуринов, а также некоторых других метаболитов.

Таким образом, штамм *E. coli* KF37 (MG1655⁺ *hisG*^{E271K} *DCBHAFI Phis-ΔhisL' ΔpurR*) был получен путем комбинации геномных модификаций, необходимых для

сверхсинтеза ГИС (Дорошенко и соавт., 2013). Этот штамм, накапливающий в наших условиях около 3 г/л гистидина, послужил в диссертационной работе в качестве исходного «модельного» продуцента данной аминокислоты. В процессе исследования на его основе были получены новые штаммы-продуценты ГИС, которые использовали для изучения и демонстрации подходов к обеспечению сверхсинтеза ГИС аденозинтрифосфатом. Указанные штаммы являются удобными моделями для анализа генетических факторов, существенных для накопления ГИС. В свою очередь, изучение этих факторов послужило необходимой предпосылкой для конструирования действующих промышленных продуцентов данной аминокислоты.

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

Синтез каждой молекулы ГИС сопровождается образованием одной молекулы АИКАР, который является также интермедиатом биосинтеза пуриновых нуклеотидов (см. «Обзор литературы», Рисунок 1). Учитывая определённое структурное сходство между АИКАР и АМФ (Рисунок 19), 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.

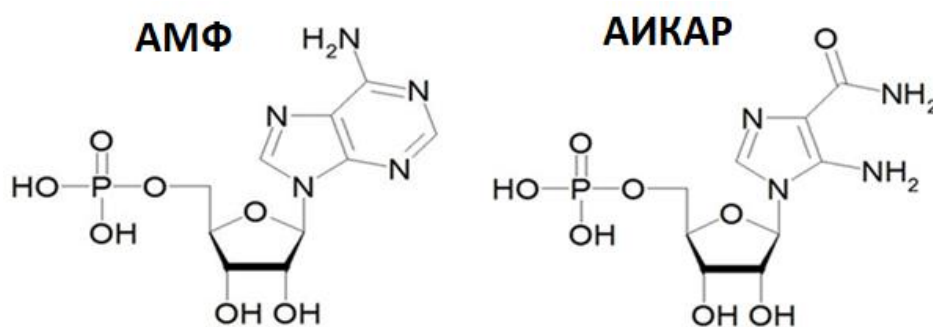


Рисунок 19 – Химическая структура АМФ (слева) и АИКАР (справа).

Была измерена ферментативная активность двух очищенных His₆-меченных (НТ) белков АТФ-ФРТ: белка дикого типа (НТ-АТФ-ФРТ) и мутантного, устойчивого к ретроингибированию (НТ-АТФ-ФРТ^{E271K}), в присутствии АМФ (Таблица 4) или АИКАР (Таблица 5).

Таблица 4 – 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 4), что согласуется с литературными данными (Tebar and Ballesteros, 1976, Morton and Parsons, 1977, Bennett 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 5). Так, уровень ингибирования фермента дикого типа в присутствии 1 мМ АИКАР составил 35%, в то время как для устойчивого к ретроингибированию мутанта АТФ-ФРТ^{E271K} уровень ингибирования при той же концентрации АИКАР составил 52%. Более того, ингибирование АИКАР наблюдалось при таких низких концентрациях (0,5÷1 мМ), при которых ингибирование АМФ практически отсутствовало (Таблица 4). Следует заметить, что дефосфорилированная форма АИКАР, 5-аминоимдазол-4-карбоксамидрибофуранозид (АИКАр), как и ожидалось, не ингибировала ферментативную активность АТФ-ФРТ (данные не приведены).

Таблица 5 – 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 также означает, что биосинтез самого АИКАР негативно регулируется на самом первом этапе биосинтеза ГИС (Рисунок 20).

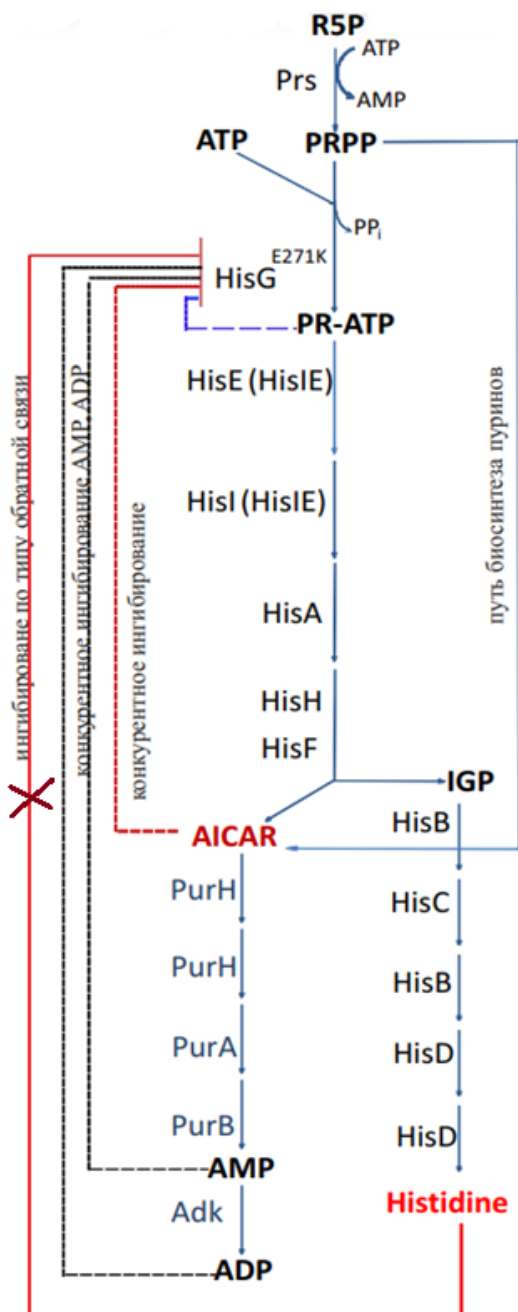


Рисунок 20 – Путь биосинтеза гистидина в клетках *E. coli*, его связь с биосинтезом пуринов и регуляция активности АТФ-ФРТ.

R5P, рибозо-5-фосфат; PRPP, фосфорибозил пирофосфат; PR-АТФ, фосфорибозил-АТФ; PP_i, неорганический пирофосфат; АИКАР, 5-аминоимдазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид; АМФ, аденозинмонофосфат; АДФ, аденозиндифосфат; АТФ, аденозин трифосфат; IGP, имидазол 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 изомераза; HisHF, имидазолглицеринфосфат синтаза; HisB, бифункциональный фермент имидазол-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 линиями.

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 21).

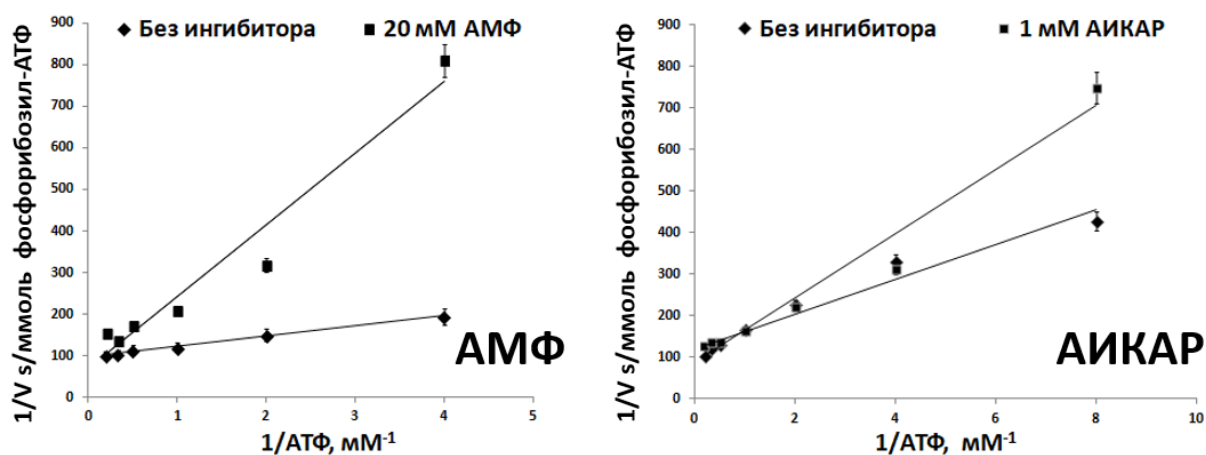


Рисунок 21 – График Лайнуивера-Берка. Ингибирование фермента дикого типа NT-АТФ-ФРТ (слева) в присутствии АМФ и в присутствии АИКАР (справа).

Согласно литературным данным, внутриклеточная концентрация АМФ в клетках штамма *E. coli* дикого типа, растущих на среде с глюкозой, в экспоненциальной фазе роста была значительно ниже (0,28 mM) использованных в данной работе концентраций (Bennett et al., 2009). Аналогичных данных для АИКАР у *E. coli* обнаружить в литературе не удалось. Однако у дрожжей *S. cerevisiae* в экспоненциальной фазе роста концентрации АИКАР варьировали в клетках от 1,6 до 21,8 мкМ, что также намного ниже использованных в приведенных опытах (Daignan-Fornier and Pinson, 2012). Можно думать, что в пределах указанных низких концентраций он содержится и в клетках *E. coli* дикого типа. Как изменяется концентрация обоих этих соединений в клетках продуцента ГИС, должны показать дальнейшие исследования. Однако очевидно, что уровень накопления АИКАР в клетках будет зависеть, с одной стороны, от интенсивности функционирования пути биосинтеза ГИС, которая значительно возрастает в условиях его сверхсинтеза, а с другой, от скорости превращения АИКАР в пурины и восполнения пула нуклеотидов аденина.

Учитывая полученные нами данные о механизме контроля образования АИКАР в пути биосинтеза ГИС путем ингибирования активности АТФ-ФРТ, можно предположить, что подобный механизм может также осуществляться в пути биосинтеза пуринов. В связи с этим, в дальнейшем было бы интересно

проанализировать влияние АИКАР на активность ключевого фермента биосинтеза – амидофосфорибозилтрансферазы PurF (продукта гена *purF*, ЕС 2.4.2.14), для которого АМФ является известным ингибитором.

4.1.2. Усиление превращения АИКАР в нуклеотиды аденина путем сверхэкспрессии генов *purA* и *purH* приводит к увеличению накопления L-гистидина

Как следует из приведенных выше результатов, продукция аминокислоты ГИС непосредственно регулируется АИКАР – побочным продуктом его биосинтеза и интермедиатом пуринового пути. Поэтому снижение внутриклеточного пула АИКАР путём его эффективной конверсии в нуклеотиды аденина является важной задачей для обеспечения сверхсинтеза ГИС (Рисунок 20). 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. Общая схема, описывающая конструирование штамма EA83, показана на Рисунке 22.

Для усиления транскрипции гена *purA*, была получена экспрессионная кассета IS5.11::Cm^R-P_{tac21}-*purA* (раздел «Материалы и методы»). Для проверки влияния увеличения экспрессии гена *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-продуцент KF37 – ранее охарактеризованный продуцент ГИС

(Дорошенко и 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 тестируемых клонов) также демонстрировала повышенное накопление продукта по сравнению с исходным штаммом KF37, однако это значение не превышало 6% (Таблица 6).

Таблица 6 – 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 данные 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. Соответственно, данная мутация отсутствовала во второй группе трансдуктантов. Более того, наличие или отсутствие нонсенс мутации в гене *purA* впоследствии было подтверждено аллель-специфичным ПЦР для различных трансдуктантов, принадлежащих к первой или второй группе, соответственно (раздел «Материалы и методы»).

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 пп. 4.1.3.-4.1.4.

Таким образом, сверхэкспрессия гена *purA* приводит к увеличению выхода 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* (раздел «Материалы и методы»), 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 6). Очевидное усиление уровня синтеза *PurH* у полученного штамма EA83 приводило к увеличению выхода ГИС на 6% (Рисунок 22).

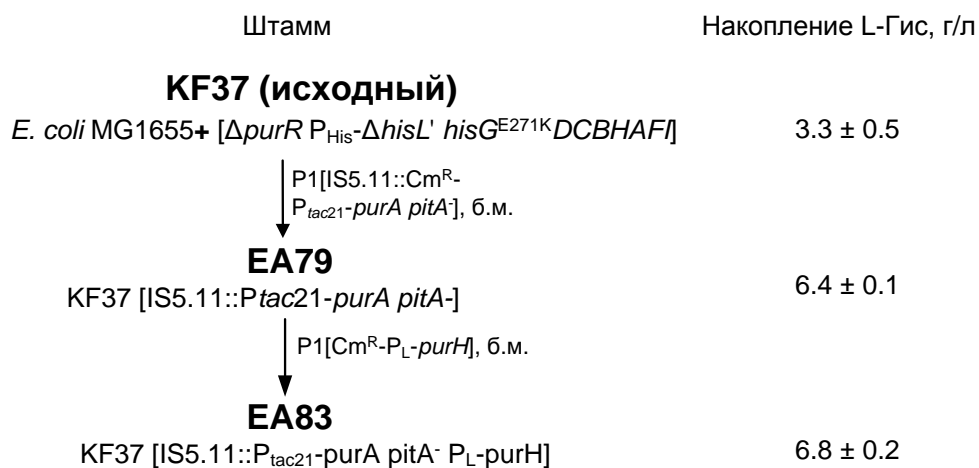


Рисунок 22 – Генеалогия штамма-производителя гистидина EA83 с увеличенной конверсией АИКАРа в нуклеотиды аденина; б.м, без маркера. Представлены усредненные результаты 6-10 независимых экспериментов.

Как показано на Рисунке 1 (раздел «Обзор литературы»), катализируемая аденилсукцинатсинтазой *PurA* реакция превращения ИМФ в аденилосукцинат осуществляется при участии L-аспартата (АСП). Мы предположили, что в случае

усиления активности *PurA* может возникать дефицит АСП, ограничивающий скорость этой реакции. Указанная аминокислота синтезируется в результате реакции трансаминирования, катализируемой аспартатаминотрансферазой. У *E. coli* этот фермент кодируется геном *aspC*. Для увеличения активности *AspC*, в штамме MG1655 природная регуляторная область гена *aspC* была заменена на сильный промотор P_L фага λ (Раздел «Материалы и методы»). В полученном штамме, а также в исходном штамме дикого типа измеряли активность аспартатаминотрансферазы *AspC*, как описано в разделе «Материалы и методы». Как показано в Таблице 7, усиление экспрессии гена *aspC* привело к увеличению активности фермента в 5,5 раз по сравнению с активностью в штамме дикого типа.

Таблица 7 – Активность аспартат трансаминазы *AspC* в штамме дикого типа и в штамме, содержащем экспрессионную кассету Cm^R - P_L -*aspC*.

Штамм	Активность аспартат трансаминазы, нмоль/мин мг
MG1655	89±5
MG1655 Cm^R - P_L - <i>aspC</i>	495±50

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Затем полученная экспрессионная кассета Cm^R - P_L -*aspC* была перенесена с помощью трансдукции в геном штамма-продуцента ГИС *E. coli* EA83 с последующим удалением селективного маркера из хромосомы. Полученный штамм был назван EA92. Было обнаружено, что сверхэкспрессия аспартат аминотрансферазы *AspC* не приводила к существенному увеличению синтеза ГИС (данные не приведены), из чего следует, что трансаминазная реакция не является узким местом на данном этапе конструирования штамма-продуцента. Однако усиление активности *AspC* может оказаться необходимым в процессе дальнейшего улучшения его характеристик.

Следует отметить, что дополнительное усиление экспрессии гена *purB* также не оказало положительного влияния на продукцию ГИС.

Таким образом, в соответствии с поставленной задачей снижения негативного влияния внутриклеточного пула АИКАР на синтез ГИС путем усиления его метаболизма в нуклеотиды аденина был получен улучшенный штамм-продуцент ГИС

EA83, накапливающий около 7 г/л гистидина (Рисунок 22).

4.1.3. Инактивация гена *pitA*, кодирующего систему транспорта неорганического фосфата P_i , приводит к увеличению продукции L-гистидина.

Для анализа влияния PitA на синтез ГИС делеция гена *pitA* была перенесена трансдукцией в исходный штамм KF37 (раздел «Материалы и методы»). Было показано, что указанная модификация приводила к увеличению продукции ГИС на 12% (Таблица 8). В то же время, введение экспрессионной кассеты Cm^R - P_{Ltac} -*pitA*, очевидно, усиливающей экспрессию *pitA*, в штамм KF37, снижало накопление ГИС более чем в 2 раза (Таблица 8), что подтверждает важность исследуемой модификации.

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

Дополнительно проверяли влияние на синтез ГИС инактивации гена *pitB*, кодирующего минорный транспортер PitB. Было показано, что инактивация PitB самого по себе, а также в комбинации с инактивацией PitA не влияла на уровень накопления ГИС (данные не приведены).

Таблица 8 – Влияние инактивации или усиления PitA на синтез 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_{Ltac} - <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.

Механизм положительного влияния инактивации PitA на синтез ГИС неясен, однако на основе известных данных о свойствах и регуляции этого транспортера можно сделать некоторые предположения. Известно, что функция PitA заключается в перемещении через мембрану в клетки и из клеток P_i вместе с катионами двухвалентных металлов, в частности, Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} и Mn^{2+} , которые образуют

с ним растворимый комплекс MeHPO_4 . При этом оптимальная концентрация, в частности, катионов Mg^{2+} в клетках очень важна в связи с их участием в контроле активности большого числа ферментов, для которых эти ионы являются эффекторами. Кроме того, магний играет роль в стабильности всех полифосфатных соединений в клетках, в том числе, АТФ. В условиях низких концентраций магния с помощью системы PhoQ-PhoP активируются гены *mgtA* и *mgtBC*, продукты которых обеспечивают усвоение магния (Papp-Wallace and Maguire, 2008), а также гены *mgtS* и *mgtR*, продукты которых подавляют активность и экспрессию PitA, препятствуя выведению Mg^{2+} из клеток (Yin et al., 2019). Можно предполагать, что в случае продуцента ГИС это подавление не осуществляется, и только полная инактивация PitA препятствует снижению концентрации магния в клетках. Некоторый намёк на причину такого явления дают данные о том, что АИКАР (ZMP) или ZTP могут прямо фосфорилировать сенсорную/рецепторную гистидинкиназу PhoQ, регулирующую этот процесс (Vazquez-Ciros et al., 2020).

В свою очередь, поддержание оптимального уровня P_i необходимо для процессов, сопровождающихся высоким потреблением АТФ, в частности для синтеза ГИС. Таким образом, можно предположить, что в условиях сверхсинтеза ГИС, делеция гена *pitA* может положительно влиять и на содержание в клетках катионов Mg^{2+} , и P_i (Рисунок 23).

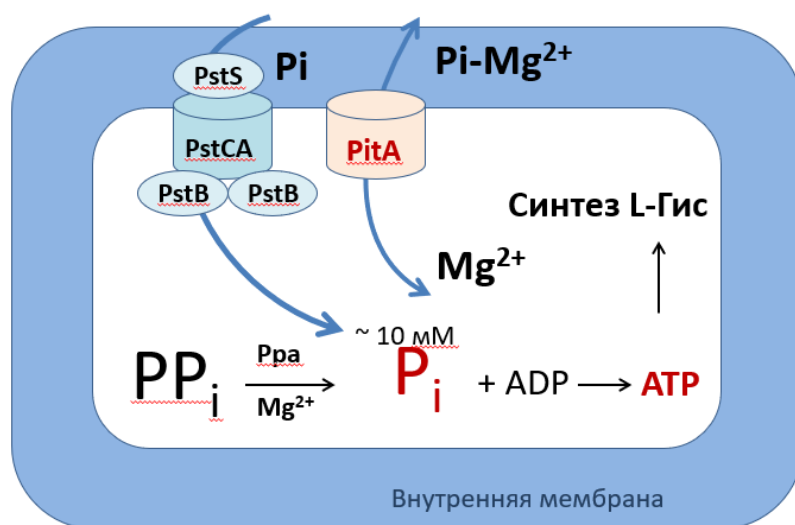


Рисунок 23 – Схематическое изображение предполагаемой роли транспортера PitA в балансе внутриклеточных концентраций P_i/PP_i и в пути биосинтеза ГИС.

4.1.4. Влияние инактивации *PitA* на экспрессию *pho*-регулона и потребление неорганического фосфата P_i штаммом-продуцентом L-гистидина

Для проверки предположения относительно возможного изменения пула неорганических P_i в отсутствие транспортера *PitA* в условиях сверхсинтеза ГИС, была проанализирована активность основной системы транспорта P_i в клетки, контролируемой *pho*-регулоном. Входящий в состав этого регулона ген *phoA* кодирует фермент щелочную фосфатазу (PhoA). Уровень активности PhoA отражает степень индукции *pho*-регулона, которая происходит в условиях недостатка фосфора (Wanner et al., 1996, Hoffer and Tommassen, 2001).

Активность PhoA определяли через 24 часа роста культуры – после исчерпания фосфатов в минимальной среде MOPS (Таблица 9). 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*. Стоит отметить, что делеция гена *pitA* существенно не повлияла на рост и потребление P_i в данных условиях роста (данные не приведены).

Таблица 9 – 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.

В рамках существующей модели регуляции и контроля Pho регулона (раздел «Обзор литературы», Рисунок 11), предлагается следующая гипотеза о возможном

негативном влиянии АИКАР на экспрессию *pho*-регулона, в частности, на активность PhoR киназы. Известно, что киназа PhoR у *E. coli* содержит каталитический АТФ-связывающий домен СА (catalytic, ATP-binding part) (Gardner et al., 2015). В случае сверхсинтеза ГИС, репрессию *pho*-регулона можно объяснить снижением способности PhoR к АТФ-зависимому автофосфорилированию, которое необходимо для дальнейшего фосфорилирования регулятора PhoB и активации *pho*-регулона (Рисунок 24). Вероятно, что в этих условиях происходит ингибирование АТФ-зависимой PhoR киназы АИКАР, внутриклеточные концентрации которого могут быть повышены.

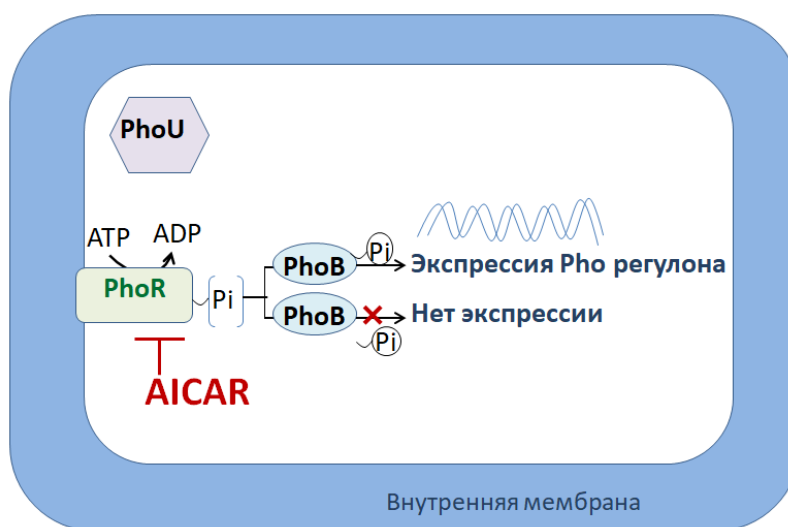


Рисунок 24 – Предполагаемая модель экспрессии *pho*-регулона (Hsieh and Wanner, 2010. Адаптировано) в условиях сверхсинтеза АИКАР. В условиях лимита по P_i может происходить либо активация *pho*-регулона, либо его частичная дезактивация в присутствии АИКАР.

4.1.5. Понижение уровня активности PhoA в ответ на сверхсинтез АИКАР; P_i -независимая активация экспрессии гена *phoA* в клетках *E. coli*, продуцирующих L-гистидин

Для проверки предположения о возможном негативном влиянии АИКАР на индукцию *pho*-регулона, 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 10). У полученного штамма проверяли способность к активации щелочной фосфатазы PhoA в условиях лимита по P_i .

Штаммы *E. coli* MG1655, а также штамм MG1655 $\Delta purR::Cm^R \Delta purH::Km^R$, продуцирующий АИКАР, выращивали в условиях лимита по P_i (Рисунок 25).

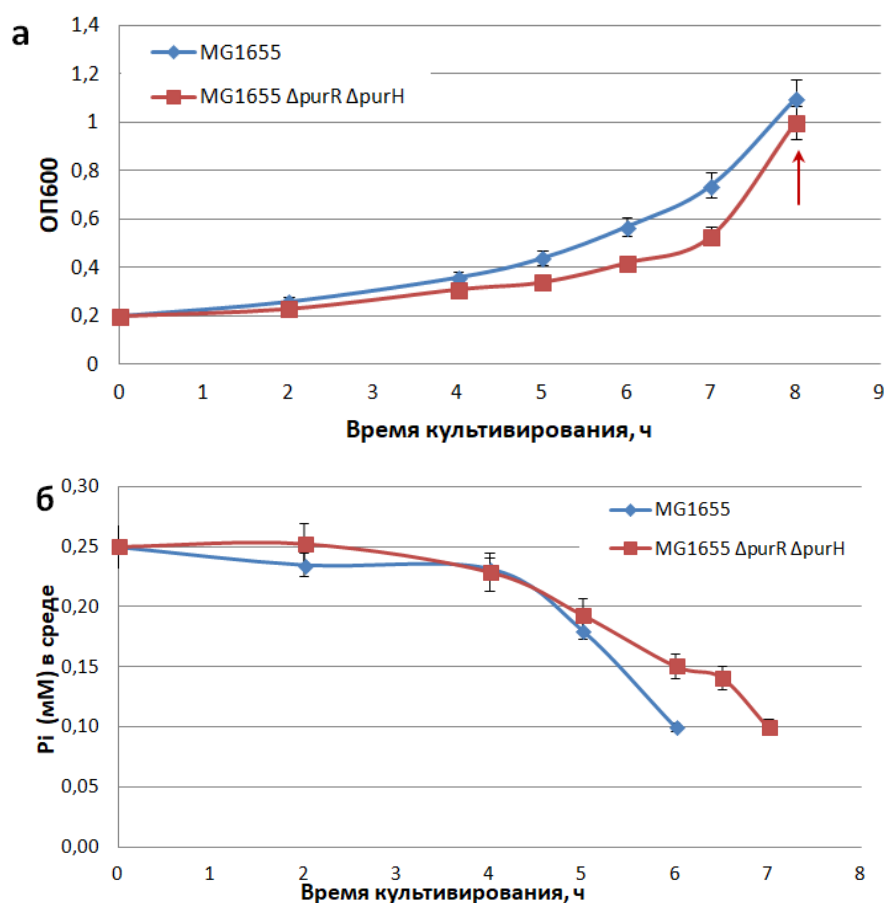


Рисунок 25 – Влияние АИКАР на рост (а) и потребление P_i (б) в условиях лимита по P_i штамма дикого типа MG1655, а также штамма MG1655 $\Delta purR \Delta purH$, продуцирующего АИКАР. Вертикальная линия указывает на время отбора пробы для измерения активности щелочной фосфатазы PhoA. Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

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 10), но выше, чем в штамме-продуценте ГИС KF37 (Таблица 9).

Таблица 10 – Корреляция между способностью к накоплению АИКАР и активностью PhoA.

Штамм	АИКАР, мг/л	Активность PhoA, %
MG1655	< 0,1	100 %
MG1655 Δ <i>purR</i> ::Cm ^R Δ <i>purH</i> ::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 (см. Рисунок 24).

В дополнение, в данной работе проверялся факт нормального функционирования гена *phoA* в штамме-продуценте ГИС *E. coli* KF37, при нарушении экспрессии которого могло наблюдаться снижение активности *pho*-регулона. Как показано выше, у продуцента ГИС наблюдается на порядок сниженный уровень активности PhoA по сравнению со штаммом дикого типа, что можно объяснить повышенным уровнем синтеза АИКАР вследствие сверхсинтеза этой аминокислоты. Однако, тот же эффект может наблюдаться и в результате возникших в процессе отбора мутаций, приводящих к нарушению функционирования PhoA. Таким образом, для правильной интерпретации полученных данных требуется подтвердить, что сама по себе экспрессия *phoA* в клетках продуцента существенно не изменена. Для этого активность щелочной фосфатазы у данного штамма оценили в условиях P_i-независимой активации *pho*-регулона. С этой целью использовали экспрессионную кассету с мутантным укороченным регуляторным белком PhoB, который содержит только ДНК-

связывающий С-концевой домен (PhoB^{DBD}) (Ellison and McCleary, 2000, Blanco et al., 2002, Vachhawat et al., 2005). В этом случае, экспрессия PhoB^{DBD} осуществляет P_i-независимую активацию *pho*-регулона. Синтез PhoA в растущих клетках определяли по появлению окрашенных в голубой цвет колоний на среде, содержащей специфический пигментообразующий субстрат 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP). Экспрессионная кассета $\Delta yibH::KmR-P_{lacUV5}-phoB^{DBD}$, содержащая мутантный фермент PhoB^{DBD} под контролем ИПТГ-индуцибельного промотора P_{lacUV5} была предоставлена Крыловым А.А. (АО «АГРИ») и описана в разделе «Материалы и методы». Кассета $\Delta yibH::KmR-P_{lacUV5}-phoB^{DBD}$ была перенесена трансдукцией в штамм дикого типа MG1655, а также в штамм-продуцент ГИС KF37. В качестве отрицательного контроля была использована кассета $\Delta yibH::Tc^R-phoB^{DBD}$, содержащая беспромоторный ген *phoB*^{DBD} (раздел «Материалы и методы»).

Было показано, что производные штамма KF37, содержащие P_{lacUV5}-*phoB*^{DBD}, способны синтезировать PhoA после индукции ИПТГ. Индукция PhoB^{DBD} в штамме дикого типа MG1655 также приводила к синтезу щелочной фосфатазы (Рисунок 26). Полученные результаты исключают как таковое нарушение функционирования гена *phoA* и дополнительно поддерживают предположение о негативном влиянии сверхсинтеза ГИС именно на функционирование двухкомпонентной системы передачи сигнала PhoBR.

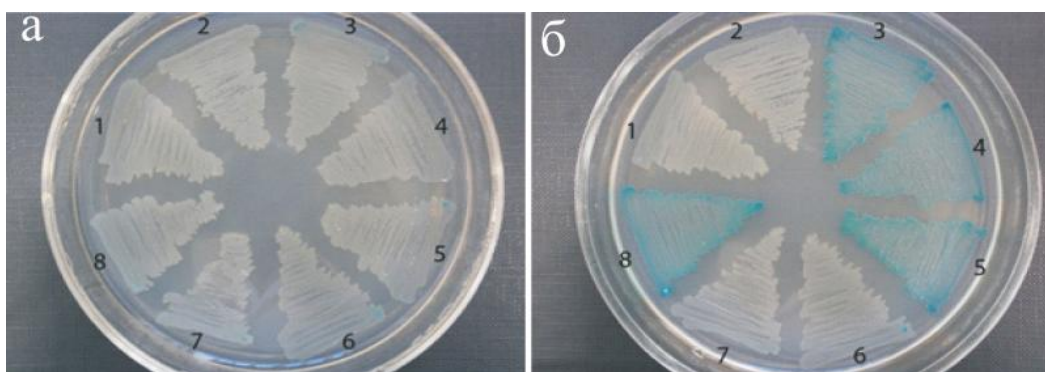


Рисунок 26 – Индукция синтеза щелочной фосфатазы PhoA в штаммах, экспрессирующих ген *phoB*^{DBD}. 1, KF37 $\Delta yibH::Tc^R-phoB^{DBD}$; 2, KF37 $\Delta yibH::Tc^R-phoB^{DBD}$; 3, KF37 $\Delta yibH::Km^R-P_{lacUV5}-phoB^{DBD}$; 4, KF37 $\Delta yibH::P_{lacUV5}-phoB^{DBD}$; 5, KF37 $\Delta yibH::P_{lacUV5}-phoB^{DBD}$; 6, KF37; 7, MG1655; 8, MG1655 $\Delta yibH::P_{lacUV5}-phoB^{DBD}$. Штаммы были выращены в течение ночи

твердой среде LB, обогащенной 50 мг/л 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфатом (BCIP) без ИПТГ (а) и с добавлением 0,5 мМ ИПТГ (б).

4.2. Увеличение числа копий оперонов, кодирующих H^+ -АТФ-синтазу и NDH-1, с целью повышения уровня синтеза/регенерации АТФ. Положительное влияние NDH-1 с измененной субстратной специфичностью на синтез L-гистидина

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 зачастую обусловлены эффективностью синтеза/регенерации АТФ.

Следует отметить, что превращение АМФ в АДФ, с помощью аденилаткиназы (Adk), катализирующей реакцию: $AMF + ATP \leftrightarrow 2 ADP$, видимо, до определенного уровня не лимитирует этот процесс, поскольку повышение экспрессии гена *adk*, кодирующего этот фермент, у используемых модельных продуцентов ГИС не влияла заметным образом на накопление аминокислоты (данные не приведены).

В тоже время активация реакций дыхательной цепи может быть эффективным подходом к решению упомянутой задачи, так как в условиях аэробного роста большая часть АТФ синтезируется именно в пути окислительного фосфорилирования. Одним из ключевых компонентов дыхательной цепи является NADH: убихинон оксидоредуктаза I (NDH-1), которая катализирует перенос электронов от NADH к убихинону и генерирует протонный электрохимический градиент ($\Delta\mu_{H^+}$), необходимый для работы F_0F_1 АТФ-синтазы. Следовательно, модификации, усиливающие экспрессию или определенным образом изменяющие свойства NDH-1, могут повысить уровень регенерации/синтеза АТФ и положительно влиять на продукцию ГИС. Сверхэкспрессия генов, кодирующих субъединицы АТФ-синтазы, также представляется наилучшим инструментом на сегодняшний день для увеличения активности этого ферментного комплекса и повышения уровня регенерации АТФ при его интенсивном использовании (Zhang et al., 2008). Она может осуществляться сама по себе, или же в комбинации с модификацией NDH-1. До недавнего времени

серьёзным препятствием на пути сверхэкспрессии этих оперонов была трудности, связанные с клонированием протяженных фрагментов ДНК.

4.2.1. Влияние увеличения числа копий генов NADH: убихинон оксидоредуктазы I (NDH-1) и H⁺-АТФ-синтазы в клетках *E. coli* на рост и выход биомассы в различных физиологических условиях

Как известно, увеличение оптической плотности культур (клеточной массы бактерий) напрямую зависит от интенсивности деления клеток, которое, в свою очередь, определяется скоростью синтеза в них белка и репликации ДНК. При этом синтез белка является наиболее энергозатратным процессом, на который расходуется, по разным оценкам, до 75% всей клеточной энергии, тогда как репликация ДНК связана с затратой всего 2% энергии (Maloney, 1986, Lane and Martin, 2010). Таким образом, скорость роста культуры и уровень накопления биомассы всегда отражают интенсивность синтеза/регенерации АТФ и служат их индикатором.

В связи с этим мы исследовали, как влияет введение в хромосому дополнительных копий оперонов *atp* (*atpIBEFHAGDC*) и *nuo* (*nuoABCDGHIJMN*), 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 разработанного в нашей лаборатории 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.

Специфические транскрипционные регуляторы для этого оперона пока не известны, имеются лишь данные о предполагаемой регуляторной роли РНК квадруплексов, идентифицированных не так давно в структурной области оперона (Shao et al., 2020). Полученная экспрессионная кассета IS5.11::*cat*-P_{*nuo*}-*nuo* (раздел «Материалы и методы») 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 Δnio с делецией всех генов (Δnio), кодирующих NDH-1. Оценка роста сконструированного в результате штамма MG1655 Δnio IS5.11::Cm^R-P_{*nio*}-*nio* на минимальной среде M63 с 0,2% ацетатом показала, что происходит комплементация делеции *nio* оперона, что подтверждало генетически функциональность полученной интегрированной кассеты (Таблица 11).

Таблица 11 – Восстановление с помощью кассеты IS5.11::Cm^R-P_{*nio*}-*nioA-N* роста штамма MG1655 $\Delta nioA-N$ на среде с ацетатом в качестве источника углерода.

Штамм	Удельная скорость роста, 1/ч
MG1655	0,179 ± 0,008
MG1655 $\Delta nioA-N$	0,092 ± 0,001
MG1655 $\Delta nioA-N$ IS5.11::Cm ^R - <i>nioA-N</i>	0,181 ± 0,006

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Кроме того, функциональность дополнительной копии *nio* оперона была подтверждена биохимически, о чем свидетельствовало увеличение активности NADH: убихинон-оксидоредуктазы в 2 раза (Таблица 12).

Таблица 12 – Увеличение активности NADH: убихинон-оксидоредуктазы при повышении копияности *nioA-N* оперона.

Штамм	Общая активность NDH, нмоль/(мин*мг)	Активность NDH-1, нмоль/(мин*мг)	Активность NDH-2, нмоль/(мин*мг)
MG1655	210 ± 5	50 ± 1	160 ± 4
MG1655 $\Delta nioA-N$	179 ± 4	< 5	179 ± 4
MG1655 IS5.11:: <i>nioA-N</i>	219 ± 5	100 ± 3	119 ± 3

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Для дальнейшего изучения влияния увеличения числа копий генов, кодирующих NDH-1 и H⁺-АТФ-синтазу, был сконструирован штамм MG1655 $\Delta roG::atp$

IS5.11::Cm^R-P_{nuo}-nuo, содержащий хромосоме одновременно дополнительные копии *atp* и *nuo* оперонов своими природными регуляторными областями.

Далее, изучался рост штаммов MG1655, MG1655 Δ aroG::*atpI-C* и MG1655 Δ aroG::*atpI-C* IS5.11::Cm^R-P_{nuo}-nuoA-N при культивировании в ферментерах (периодический процесс) в условиях высокой и низкой аэрации (Рисунок 27, Таблица 13). Для обеспечения высокой аэрации перемешивание осуществляли с контролем уровня растворенного кислорода, rL > 5%. Для обеспечения низкой аэрации, клетки культивировали при 170 об/мин; при этом уровень растворенного кислорода падал до значений rL < 2%, лимит по кислороду наступал после ~10 часов культивирования.

При высокой аэрации амплификация *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 27, Таблица 13). Вероятно, в последнем случае для синтеза АТФ необходим дополнительный выброс протонов для создания трансмембранного электрохимического потенциала (протон-движущей силы), который происходит за счет увеличения экспрессии NDH-1.

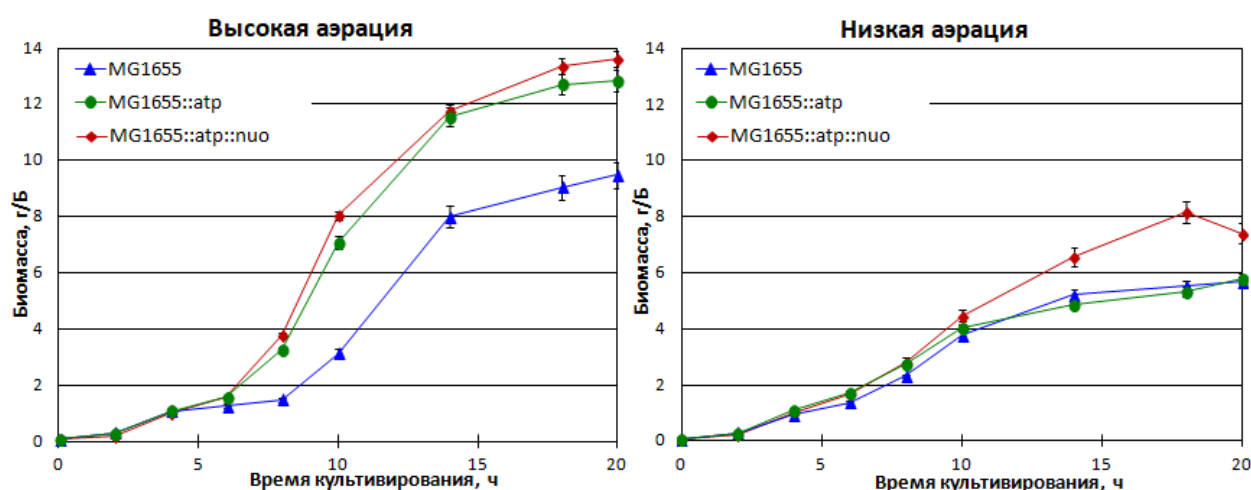


Рисунок 27 – Влияние увеличения копийности *nuo* и *atp* оперонов на рост и выход биомассы *E. coli* при высокой и низкой аэрации. Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

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 (Таблица 13). 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. Вероятно, в последнем случае для синтеза АТФ необходим дополнительный выброс протонов для создания протон-движущей силы, который происходит за счет увеличения экспрессии NDH-1.

Таблица 13 – Влияние дубликации *nuo* и *atp* оперонов на рост и выход биомассы *E. coli* при высокой и низкой аэрации.

Аэрация	Штамм	Биомасса, г/аппарат	Глюкоза потр., г/аппарат	Выход биомассы, %	Максимальная скорость роста, 1/ч
Высокая	MG1655	9,5±1,1	39±5	24±3	0,59±0,01
	MG1655:: <i>atp</i>	12,9±1,5	44±5	29±4	0,61±0,01
	MG165:: <i>atp</i> :: <i>nuo</i>	13,6±1,6	48±6	28±3	0,68±0,01
из-за	MG1655	5,7±0,7	23±3	25±3	0,61±0,01

MG1655:: <i>atp</i>	5,8±0,7	25±3	23±2	0,60±0,01
MG1655:: <i>atp::nuo</i>	8,2±1	31±4	27±3	0,61±0,01

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

В продолжение эксперимента, было определено влияние увеличения копийности генов H^+ -АТФ-синтазы и NADH: убихинон оксидоредуктазы I на общее распределение углерода из субстрата (глюкозы) при синтезе биомассы и побочных продуктов в процессе культивирования в условиях разной аэрации (Рисунок 28). Важно отметить, что дупликация *nuoA-N* и *atpI-C* оперонов в условиях высокой аэрации увеличивает выход биомассы, повышает выделение CO_2 (усиливает дыхание). При этом 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. Известно, что накопление ацетата негативно влияет на рост клеток. Следовательно, уровень экспрессии *atp* и *nuo* оперонов может быть лимитирующим фактором даже при аэробном росте клеток *E. coli*.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов указывают на то, что дупликация *atp* оперона, а также одновременное увеличение копийности *atp* и *nuo* оперонов, повышают уровень синтеза/регенерации АТФ в клетках *E. coli*, хотя одно лишь усиление дыхания не может однозначно свидетельствовать об интенсификации синтеза АТФ. Этот подход может быть перспективным при создании эффективных штаммов-продуцентов низко- и высокомолекулярных соединений, для образования которых критически важен уровень синтеза АТФ, в частности, для создания продуцента ГИС. Следует отметить, что усиленная экспрессия этих оперонов положительно влияет на энергетический метаболизм клетки также в условиях сниженной аэрации. Данное обстоятельство является особенно важным в связи с тем, что при промышленном культивировании возможности для поддержания достаточно высокого уровня аэрации, в ряде случаев необходимого для успешного проведения процесса, зачастую ограничены.

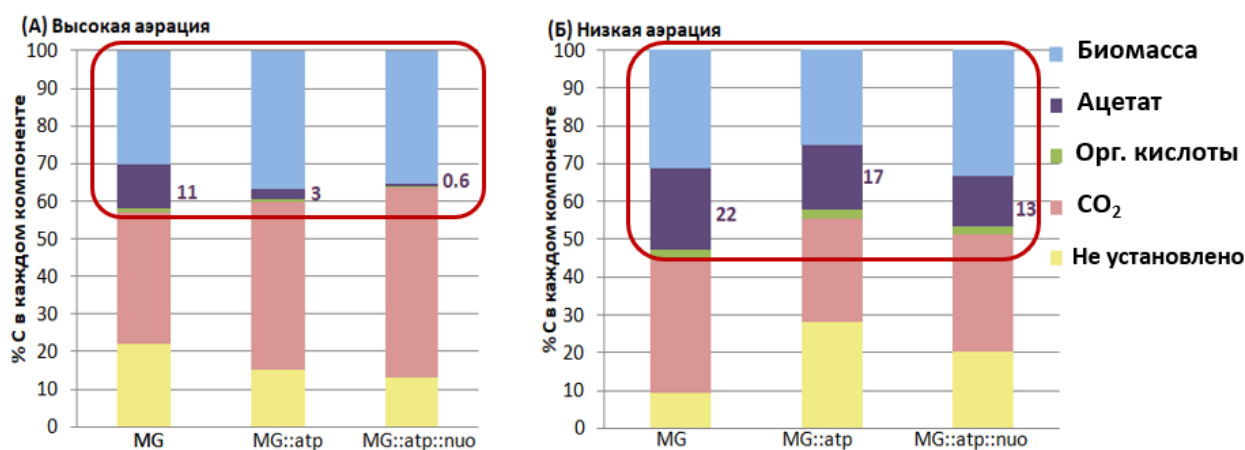


Рисунок 28 – Влияние увеличения копийности генов H^+ -АТФ-синтазы и NADH:убихинон оксидоредуктазы I на общее распределение углерода из субстрата (глюкозы) при синтезе биомассы и побочных продуктов в процессе культивирования в условиях разной аэрации. Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

4.2.2. Влияние мутантного комплекса NAD(P)H: убихинон-оксидоредуктазы I (NDH-1) с измененной субстратной специфичностью на продукцию L-гистидина

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). При сверхсинтезе ГИС в клетках штаммов-продуцентов в пентозофосфатном пути (ПФП) может происходить избыточное образование NADPH. Это связано с тем, что, с одной стороны, ПФП должен усиленно функционировать, чтобы обеспечить рибозо-5-фосфатом синтез ФРПФ – предшественника ГИС и пуринов, а с другой, – с тем, что образующийся при этом NADPH непосредственно в пути биосинтеза данной аминокислоты не используется. Однако, надо иметь в виду, что потребность в R-5-P может удовлетворяться и за счёт неокислительной ветви ПФП – из образующихся в пути гликолиза фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата с помощью трансальдозазы (Tal) и транскетолазы (Tkt) (Stincone et al., 2015). Имеется указание на

то, что у продуцента ГИС этот путь может функционировать, а потому сверхэкспрессия гена трансальдолазы (*tal*) повышала его продукцию (Klyachko et al., 2004b).

В следующих разделах работы проверялось предположение о том, что изменение специфичности NDH-1 с NADH-зависимого фермента на NADPH-зависимый позволит задействовать избыточный NADPH в процессе дыхания, что увеличит, в свою очередь, доступность молекул АТФ для обеспечения сверхсинтеза ГИС.

4.2.2.1. Конструирование штаммов *E. coli*, содержащих мутантный комплекс NAD(P)H: убихинон-оксидоредуктазы I типа с измененной субстратной специфичностью

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. Последнее обстоятельство особенно важно, поскольку NDH-1 представляет собой многокомпонентный белковый комплекс, организация которого может быть нарушена при дисбалансе синтеза отдельных субъединиц в случае изменения экспрессии отдельных генов в процессе генно-инженерных манипуляций.

Известно, что полное удаление *nuoA-N* оперона, как и инактивация отдельных генов, не имеет выраженного фенотипического проявления, подходящего для простой селекции Nuo^+ и Nuo^- вариантов. Поэтому при конструировании штамма *E. coli* MG1655 *nuoF*^{E183A}, содержащего мутацию в гене *nuoF*, был применен подход, основанный на λ -Red рекомбинации с использованием гена левансуказы *sacB* из *Bacillus subtilis* в качестве маркера для контрселекции: штаммы, содержащие этот ген, не способны к росту на среде с сахарозой (Pelicic et al., 1996, раздел «Материалы и Методы»).

Полученный штамм MG1655 *nuoF*^{E183A}, содержащий NDH-1 с измененной субстратной специфичностью, исследовали на эффективность аэробного роста на жидкой минимальной среде M9 с добавлением 0,4% глюкозы. Кинетику роста

штаммов анализировали как описано в «Материалах и методах». Оказалось, что мутация E183A в субъединице NuoF практически не влияет на рост клеток полученного штамма в указанных условиях (Рисунок 29).

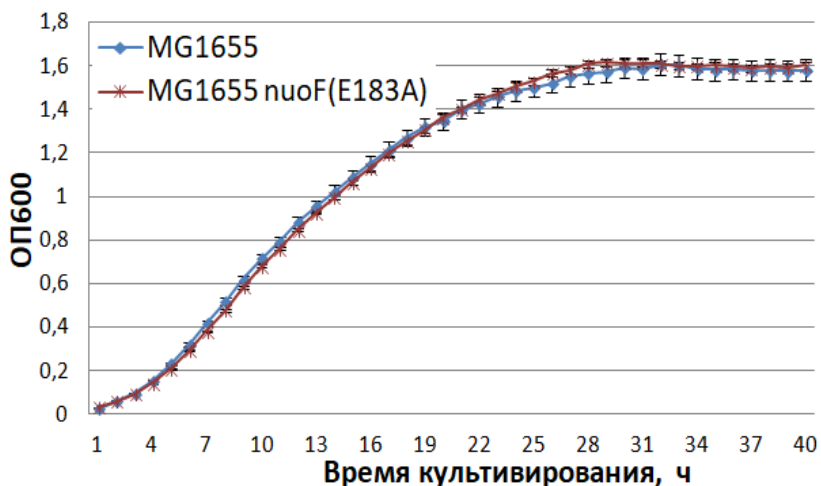


Рисунок 29 – Кинетика роста клеток штамма *E. coli* дикого типа MG1655 и штамма MG1655 *nuoF*^{E183A}, несущего NDH-1 с измененной субстратной специфичностью в минимальной среде M9 с 0.4% глюкозы.

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

Изучали влияние 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 (Noda et al., 2006; раздел «Материалы и Методы»). Для увеличения проницаемости мембран для указанных веществ измерения осуществляли в присутствии антибиотика-ионофора аламетицина (Milov et al., 2009). Важно отметить, что добавление аламетицина не влияет на активность комплекса NDH-1 (Гривенникова и Виноградов, 2013). Таким образом, при

добавлении аламетицина по повышению активности устанавливали соотношение везикул в бесклеточной мембранной фракции, которое составляло около 50 % (Таблица 14), что согласуется с литературными данными (Futai et al, 1974).

Было показано, что удельная активность мутантной NDH-1 с использованием NADPH в качестве субстрата, в бесклеточном экстракте MG1655 составляла 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 14). 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}.

При этом, модификация *nuo* оперона влияет не только на специфичность в отношении субстрата, но также на активность NDH-1. Мутантная NDH-1 обладает почти в два раза меньшей активностью, чем NDH-1 дикого типа (Таблица 14). Интересно, что после внесения мутации в субъединицу NuoF комплекса NDH-1, общая NADH-дегидрогеназная активность не изменилась. По-видимому, это связано с увеличением вклада альтернативной NADH-дегидрогеназы NDH-2 в общую активность. Такой компенсаторный эффект отмечался и ранее при снижении активности NDH-1 (Schmidt and Gerloff, 2004). Существенный вклад NDH-2 в общую NDH-активность наблюдался в случае обоих штаммов. При этом активность NDH-2 у штамма MG1655 *nuoF*^{E183A} с мутантной NDH-1 увеличивалась более чем на 50%.

Таблица 14 – Анализ активности NADH: убихинон-оксидоредуктазы (NDH-1, NDH-2) у штаммов *E. coli*, содержащих ген *nuoF* дикого (*nuoF*^{wt}) и мутантного (*nuoF*^{E183A}) типа.

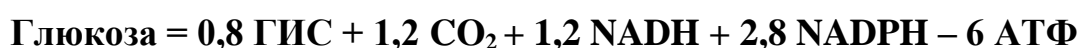
Штамм	<i>nuoF</i> аллель	Субстрат	Общая NDH активность, нмоль/мин*мг	NDH-1 активность, нмоль/мин*мг	NDH-2 активность, нмоль/мин*мг

Пробы без аламецитина	MG1655	Дикий тип	NADH	260 ± 6	130 ± 3	130 ± 3
			deamino-NADH	130 ± 3	130 ± 3	< 5
			NADPH	< 5	< 5	< 5
	MG1655 <i>nuoF</i> ^{E183A}	E183A	NADH	265 ± 7	67 ± 2	198 ± 5
			deamino-NADH	67 ± 2	67 ± 1	< 5
			NADPH	55 ± 1	55 ± 1	< 5
Пробы с добавлением аламецитина	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.

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

При сверхсинтезе ряда клеточных метаболитов, сопровождающемся потреблением большого количества ФРПФ и АТФ, синтез NADPH может быть избыточным и в ряде случаев сопровождается недостатком молекул АТФ, ингибируя рост 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 Cm^R -*nuoF*^{E183A}, которую перенесли в штамм EA92 методом общей трансдукции (раздел «Материалы и методы»). При культивировании полученного штамма EA92 Cm^R -*nuoF*^{E183A}, содержащего мутантный *nuo* оперон, наблюдали увеличение накопления ГИС на 15% (Таблица 15).

Таблица 15 – 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 Cm^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.

4.3. Влияние инактивации гена *yjjK* (*ettA*), кодирующего трансляционный фактор EttA, на уровень накопления L-гистидина

В ранней работе, касающейся изучения локуса *flr* *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 появившиеся позднее данные о первичной нуклеотидной последовательности этого локуса, мы предположили, что указанные мутации могут быть связаны с геном *yjjK*. На тот момент, функция гена *yjjK* оставалась неизвестной, хотя белковый продукт этого гена был уже идентифицирован с использованием двумерного электрофореза белков (Link et al., 1997). Позднее появились публикации, свидетельствующие о том, что этот ген кодирует новый, ранее неизвестный, фактор трансляции EttA (**e**nergy-**d**e**pendent t**ranslational **t**hrottle **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 $\Delta yjjK$ (Раздел «Материалы и Методы»), которую перенесли трансдукцией в штамм KF37. Как показано в Таблице 16, по результатам пробирочной ферментации инактивация гена *yjjK* на 22% увеличивает продукцию ГИС.

Таблица 16 – Инактивация YjjK (EttA) увеличивает продукцию гистидина штаммом-продуцентом *E. coli* KF37.

Штамм	ОП ₅₅₀	ГИС, г/л
KF37	18,3 ± 0,5	0,9 ± 0,05
KF37 $\Delta yjjK::(\text{Km}^R\text{-}\phi 80)$	19,1 ± 1	1,1 ± 0,1

Приведены усредненные результаты 5-7 независимых экспериментов.

Кроме того, были получены данные, свидетельствующие о том, что действительно, делеция указанного гена положительно влияет не только на продукцию ГИС, но также L-валина и L-аргинина (данные не приведены). На этом основании была подана заявка и получены патенты на изобретение в ряде стран (US 9175319 B2, EP2796560 B1, CN104120157 B, JP6459203 B2).

Механизм позитивного влияния инактивации EttA на синтез ГИС точно не известен. Однако, на основании современных данных о природе и функции белка EttA, можно выдвинуть следующие предположения. Как упоминалось в «Обзоре литературы», фактор EttA регулирует трансляцию в зависимости от соотношения внутриклеточных пулов АТФ/АДФ, координируя скорость синтеза белка с энергетическим статусом клетки (Prossliner et al., 2018). В ответ на высокий уровень АДФ EttA ингибирует трансляцию до тех пор, пока уровень АТФ снова не увеличится (Chen et al., 2014). Таким образом, эта, так называемая, «заслонка» («trotter») тормозит синтез белка, процесс, наиболее затратный с точки зрения потребления АТФ. Учитывая эти данные, можно предположить, что инактивация фактора EttA блокирует механизм, ограничивающий синтез белка в ответ на снижение пула АТФ, что обычно происходит в стационарной фазе роста при периодическом культивировании. В

результате, продолжающийся синтез ферментов, необходимых для образования ГИС, обеспечивает более высокое его накопление. Для проверки этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

4.4. 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 L-гистидина

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. Можно предположить, что существование мембранных H^+ -пирофосфатаз открывает новые возможности для практического использования образующегося в клетках PP_i в качестве дополнительного источника энергии клетки, в том числе и для синтеза различных биологически активных соединений. Наиболее изученным объектом класса бактериальных мембранных пирофосфатаз является H^+ -PPase из *Rhodospirillum rubrum*.

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

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

Для обеспечения эффективной экспрессии гена *hppa*^{Rru} из *R. rubrum* ATCC 11170 (*Ecocyc.org*) в клетках *E. coli*, была проведена «гармонизация» кодонов (codon harmonization) (Angov et al., 2011) *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/>). Т.е. проведен дизайн искусственного гена таким образом, чтобы частота встречаемости его кодонов в *E. coli* повторяла профиль частот встречаемости кодонов в *R. rubrum*. Такая замена, по-видимому, может способствовать сохранению скорости элонгации трансляции для правильного сворачивания белка в процессе его биосинтеза (Quah et al., 2015). Ген *hppa*^{Rru} с оптимизированной таким образом для *E. coli* структурой был химически синтезирован (TDK service, Russia) в составе мультикопийного вектора pUC57 (GenScript®, USA) (Рисунок 30). Последовательность первичной структуры ДНК химически синтезированного гена *hppa*^{Rru} была подтверждена секвенированием (раздел «Материалы и методы»).

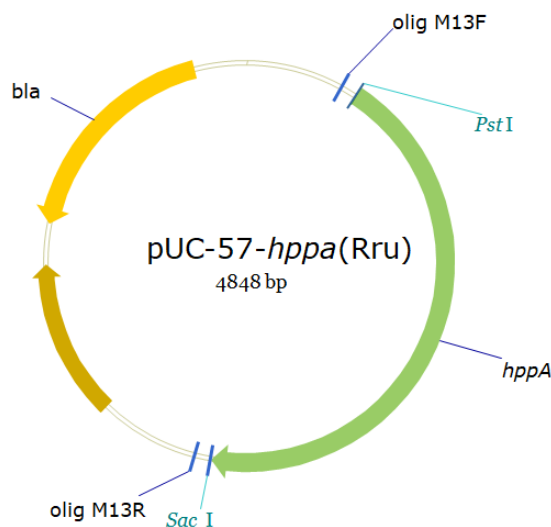


Рисунок 30 – Карта плазмиды pUC57-*hppa*^{Rru}, содержащей синтетический ген *hppa* *R. rubrum*. Обозначения: *hppa*^{Rru} – гармонизированный для экспрессии в клетках *E. coli* ген мембранной пирофосфатазы из *R. rubrum*; *bla* – ген бета-лактамазы, придающий устойчивость к ампицилину; *PstI* и *SacI*, сайты рестрикции; M13F и M13R, праймеры для секвенирования гена *hppa*^{Rru}.

Далее, ген *hppa*^{Rru} был переклонирован в интегративный малокопийный вектор рАН162-Тс^R-2Ter (Minaeva et al., 2008), как описано в разделе «Материалы и методы», для последующей интеграции в хромосому. Обеспечение оптимальной экспрессии интегрированных в хромосому генов часто вызывает трудности, особенно если ген кодирует гетерологичный мембранный белок. Поэтому оптимизацию уровня экспрессии гена *hppa*^{Rru} проводили после интеграции в хромосому *E. coli* беспромоторного гена.

Наличие гена *hppa*^{Rru} в заданной ориентации, а также ожидаемая структура плазмиды были подтверждены рестрикционным анализом и секвенированием. Схема клонирования гена *hppa*^{Rru} на интегративный вектор рАН162-Тс^R-2Ter показана на Рисунке 31.

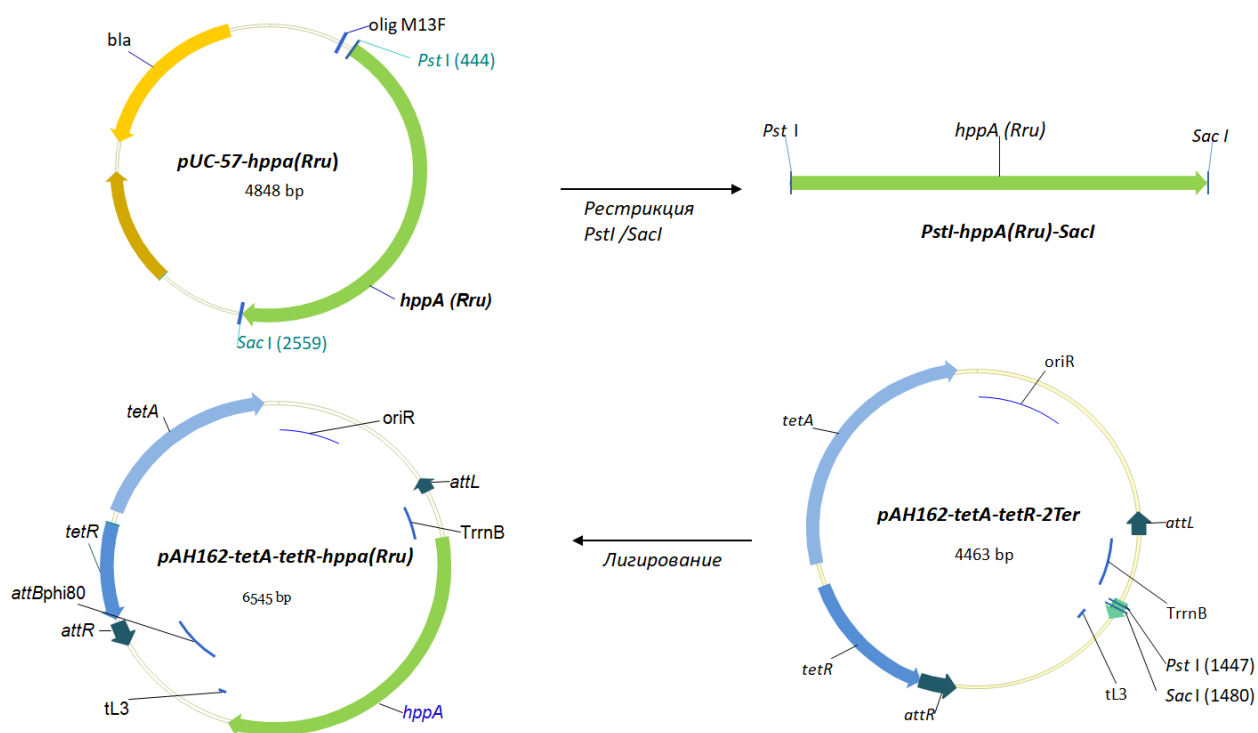


Рисунок 31 – Схема клонирования гена *hppa*^{Rru} на интегративную плазмиду рАН162-Тс^R-2Ter. Обозначения: *hppa* (Rru) – оптимизированный ген мембранной пирофосфатазы из *R. rubrum*; *Pst*I и *Sac*I, сайты рестрикции.

Полученная в результате рекомбинантная плазмиды рАН162-Тс^R-2Ter-*hppa*^{Rru} была далее интегрирована в локус IS5.8 хромосомы ранее сконструированного штамма

E. coli MG1655 IS5.8::($\phi 80$ -attB)^{native} (Minaeva et al., 2008). Экспрессию гена *hppA*^{Rru} в хромосоме интегранта MG1655 $\Delta(\phi 80$ -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 $\Delta(\phi 80$ -attB)^{native} IS5.8::P_L-SD1-*hppA*^{Rru}, который использовали в дальнейшей работе (Рисунок 32).

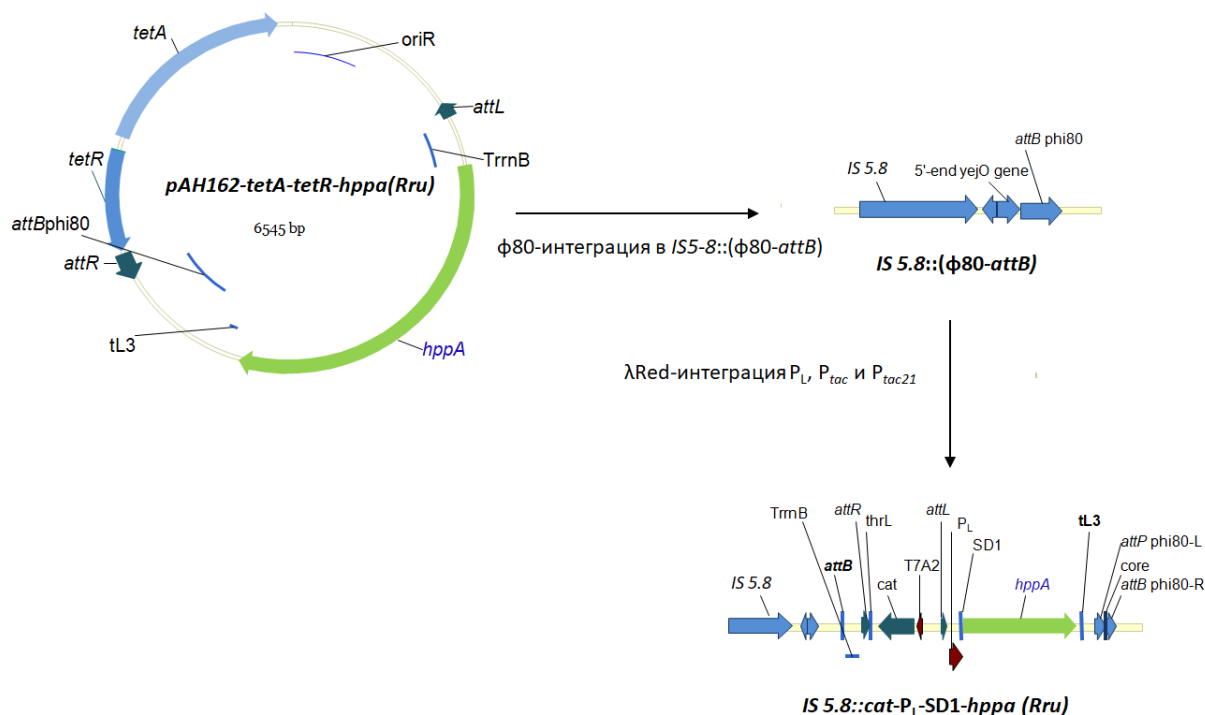


Рисунок 32 – Схема интеграции гена *hppA*^{Rru} в хромосому *E. coli* и замены его регуляторной области. Обозначения: *hppA*^{Rru} – оптимизированный ген *hppA*^{Rru} мембранной пирофосфатазы из *R. rubrum*.

4.4.2. 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} (раздел «Материалы и методы»). Клоны штамма *E. coli* MG1655 IS5.8::P_L-*hppa*^{Rru}, содержащие по результатам ПЦР-анализа делецию гена *ppa* в хромосоме, растут медленнее по сравнению с реципиентным штаммом (см. ниже). Стоит отметить, что предпринимались попытки инактивировать ген *ppa* также в штаммах, у которых ген *hppa*^{Rru} находился под контролем более “слабых” промоторов P_{tac} и P_{tac21}. Однако целевых делеционных вариантов при этом отобрать не удалось.

Факт делеции существенного гена *ppa* в штамме *E. coli* MG1655 IS5.8::P_L-SD1-*hppa*^{Rru} Δ *ppa*::*cat* был подтвержден гибридизацией по Саузерну. Для проведения ДНК-ДНК гибридизации, из единичного клона штамма дикого типа MG1655 и анализируемого штамма MG1655 IS5.8::P_L-SD1-*hppa*^{Rru} Δ *ppa*::*cat*, предположительно содержащего делецию гена *ppa*, были выделены хромосомы, гидролизованы по сайтам рестрикции *EcoRI* и *HindIII*, присутствующим в хромосоме *E. coli*, но не затрагивающим ген *ppa*. После разделения полученных ДНК фрагментов на электрофореze в агарозном геле была осуществлена ДНК-ДНК гибридизация с биотинилированным зондом, содержащим структурную часть гена *ppa* и полученным с помощью ПЦР в присутствии Biotin-11dUTP (Раздел «Материалы и методы»). Было обнаружено, что штамм дикого типа содержал выявляемый гибридизацией фрагмент гена *ppa* (в обеих гидролизованных по сайтам рестрикции *EcoRI* и *HindIII* пробах), как и предполагалось. В то же время, в пробе с ДНК из анализируемого штамма, содержащего замену гена неорганической пирофосфатазы Ppa на H^+ -PPase^{Rru}, указанный фрагмент гена *ppa* отсутствовал (Рисунок 33).

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}. Это само по себе интересно, поскольку известные организмы, имеющие природную мембран-связанную пирофосфатазу, имеют наряду с ней также и цитоплазматическую пирофосфатазу. Дальнейшее изучение характеристик полученных штаммов

представляло большой интерес для оценки функционирования, физиологической роли мембранной H^+ -PPase^{Rru} в клетках *E. coli* и возможности её практического использования.

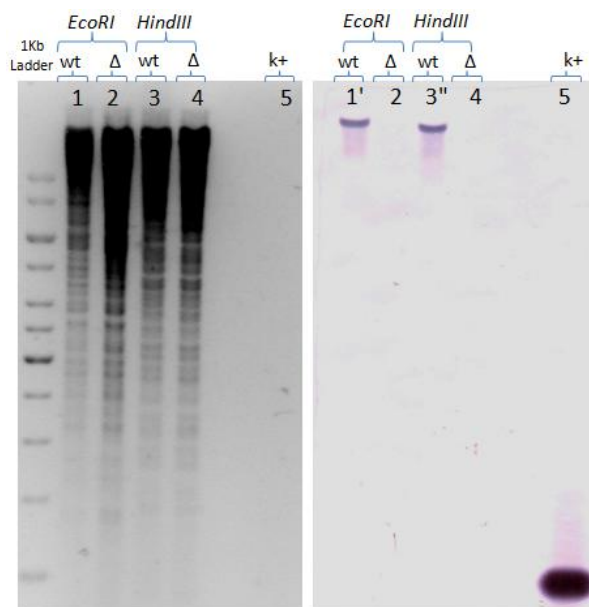


Рисунок 33 – Подтверждение делеции существенного гена растворимой пирофосфатазы *ppa* в хромосоме *E. coli* при помощи Саузерн-блоттинга.

wt – рестрикт хромосомы дикого типа MG1655 (гидролизированный по сайтам рестрикции *EcoRI* или *HindIII*); Δ – рестрикт хромосомы MG 1655::IS 5.8-PL-*hppa*^{Rru} Δ*ppa*::*cat*, содержащий делецию существенного гена *ppa* (гидролизированный по сайтам рестрикции *EcoRI* или *HindIII*); k+ – меченный биотином Biotin-11dUTP ПЦР-фрагмент гена *ppa*; 1' – размер фрагмента 18,447 пн; 3'' – размер фрагмента 16,618 пн.

4.4.3. 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 34). Полученные результаты могут свидетельствовать о не оптимальном уровне экспрессии гена *hppa*^{Rru}. Другой причиной значительного снижения скорости роста и некоторого уменьшения оптической плотности у

модифицированного может быть низкая каталитическая активность гетерологичного фермента. Согласно известным литературным данным, с точки зрения скорости катализа, мембранные пирофосфатазы самые «медленные» (Kajander et al., 2013). Несмотря на это, мембранная пирофосфатаза при определённом уровне экспрессии способна компенсировать отсутствие цитоплазматической, в норме существенной, пирофосфатазы у *E. coli*.

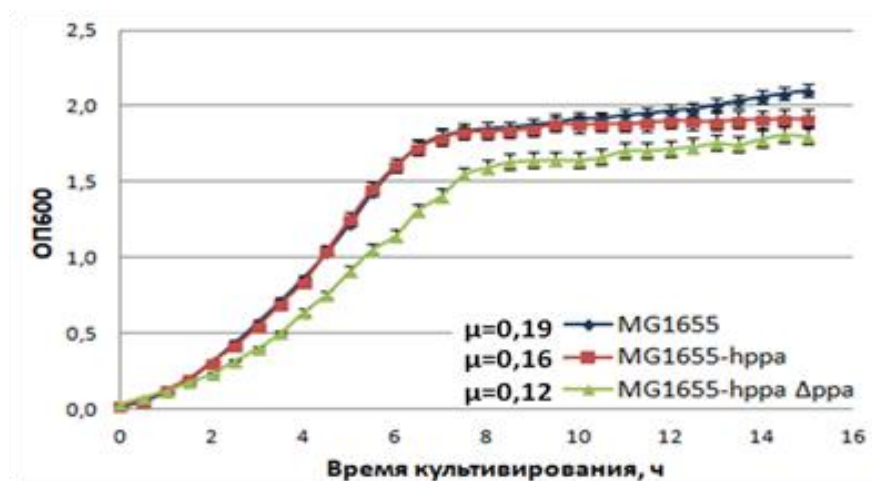


Рисунок 34 – Кинетика роста штаммов, содержащих экспрессионную кассету с геном *hppa*^{Rru} в клетках *E. coli*. Представлены усредненные значения 3 экспериментов.

Для повышения уровня экспрессии H^+ -PPase^{Rru} в клетках *E. coli* была увеличена копияность экспрессионной кассеты P_L -*hppa*^{Rru}. Для этого, ген *hppa*^{Rru} был интегрирован в межгенную область локуса *adrA* хромосомы *E. coli* по аналогии с тем, как это было описано выше. Полученная в результате экспрессионная кассета *adrA*Ω::*cat*- P_L -SD1-*hppa*^{Rru} (раздел «Материалы и методы») трансдукцией была внесена в хромосомы штаммов MG1655 IS5.8:: P_L -SD1-*hppa*^{Rru} и MG1655 IS5.8:: P_L -SD1-*hppa*^{Rru} Δ*ppa*, уже содержащих одну копию гена *hppa*^{Rru}.

В результате были получены штаммы *E. coli* MG1655 IS5.8:: P_L -*hppa*^{Rru} *adrA*Ω::*cat*- P_L -*hppa*^{Rru} (*ppa*⁺) и MG1655 IS5.8:: P_L -*hppa*^{Rru} Δ*ppa* *adrA*Ω::*cat*- P_L -*hppa*^{Rru}, содержащие две копии гена *hppa*^{Rru} на фоне *ppa* дикого типа и делеции соответствующего гена. Анализ ростовых характеристик показал, что вторая копия гена *hppa*^{Rru} в хромосоме снижает скорость роста штамма дикого типа, содержащего

функционально активный ген *ppa*. Возможно, подобный негативный эффект связан с избыточной экспрессией гена мембранного белка H^+ -PPase^{Rru} с сильного конститутивного промотора P_L. На фоне делеции гена *ppa*, дополнительные копии гена *hppa*^{Rru} не улучшают ростовых характеристик (Рисунок 35). С другой стороны, это могло быть связано со всё ещё недостаточным уровнем активности данного фермента. Интеграция в хромосому третьей копии гена *hppa*^{Rru} – содержащей кассеты *adhE::cat*-P_L-SD1-*hppa*^{Rru} (раздел «Материалы и Методы») также не улучшала ростовых характеристик штамма (Рисунок 35). Стоит отметить, что при введении маркера *cat* в используемые для интеграции гена *hppa*^{Rru} локусы хромосомы не вызывало изменения скорости роста на минимальной среде. Также, функциональность введенных экспрессионных кассет, содержащих ген *hppa*^{Rru} была независимо подтверждена путем последующего введения делеции гена *ppa*.

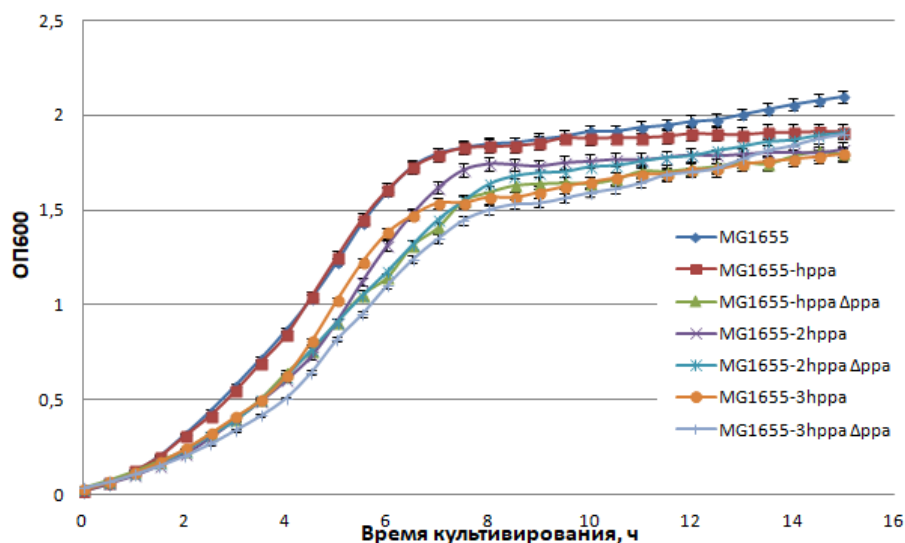


Рисунок 35 – Кинетика роста штаммов, содержащих одну, две или три экспрессионных кассеты с геном *hppa*^{Rru} в клетках *E. coli*, содержащих либо ген цитоплазматической пирофосфатазы *ppa* дикого типа, либо делецию этого гена. MG1655, K-12 штамм дикого типа. Представлены усредненные значения 3 независимых экспериментов.

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

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}.

Измерение пирофосфатазной активности в грубых экстрактах клеток *E. coli* показало, что делеция гена *ppa*, как и ожидалось, приводит к отсутствию детектируемой активности пирофосфатазы в растворимой фракции соответствующего штамма *E. coli* MG1655 (Δ *ppa* *hppa*^{Rru}) (Таблица 17). Экспрессия гена *hppa*^{Rru} в штамме дикого типа MG1655 существенно не повлияла на активность неорганической пирофосфатазы в растворимой фракции по сравнению с контролем

Таблица 17 – 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- <i>hppa</i> ^{Rru}	5,5 ± 0,5
MG1655 IS5.8::P _L -SD1- <i>hppa</i> ^{Rru} Δ <i>ppa</i>	< 0,5

Представлены усредненные значения 3 экспериментов.

Определение активности мембранной H⁺-PPase^{Rru} в штаммах *E. coli* осуществлялось в везикулах мембранной фракции. Мембранные везикулы были получены в соответствии с ранее описанным методом (Belogurov et al., 2005) с некоторыми модификациями (раздел «Материалы и Методы»).

Оценивался вклад инвертированных мембранных везикул (ИМВ), так как только при данном типе ориентации мембран субстрат PP_i может быть доступным для

осуществления пирофосфатазной реакции H^+ -PPase^{Rru}. Для оценки количества инвертированных везикул в мембранной фракции в некоторых работах используется каналобразующий антибиотик пептидной природы грамицидин D (Belogurov et al., 2002, Belogurov et al., 2005). Как уже отмечалось, образование двух типов мембранных пузырьков (с прямой и инвертированной ориентацией мембран) носит вероятностный характер и составляет, по различным данным, около 50% (Futai et al., 1974).

Пирофосфатазная активность в мембранной фракции штамма *E. coli* с заменой гена растворимой пирофосфатазы *ppa* на ген *hppa*^{Rru} была в 10 раз выше по сравнению со штаммом MG1655 (Рисунок 36). Можно думать, что регистрируемая активность мембранного фермента в препаратах клеток дикого типа обусловлена контаминацией цитоплазматического фермента в полученных фракциях везикул. Таким образом, сам факт функционирования мембранной H^+ -PPase^{Rru} в клетках *E. coli* в качестве единственного PP_i -гидролизующего фермента был подтвержден прямым определением ее ферментативной активности во фракции инвертированных мембранных везикул *in vitro*.

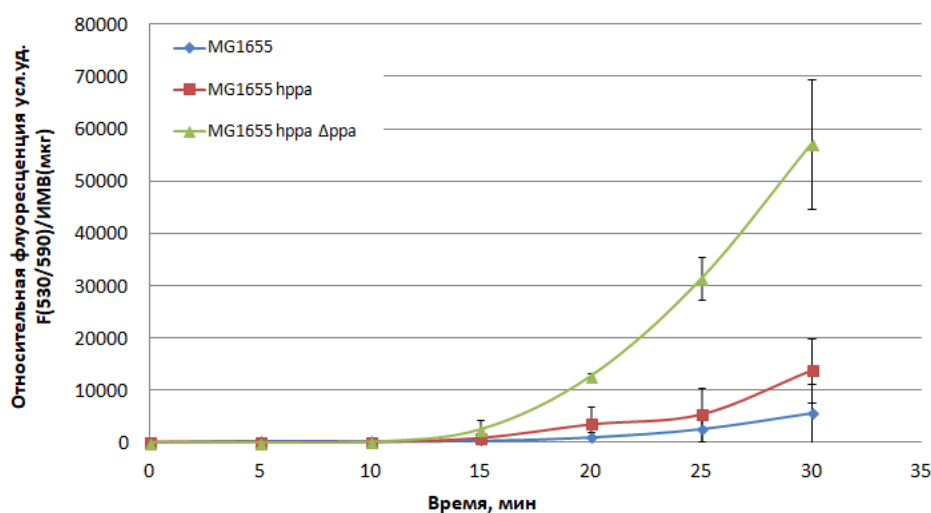


Рисунок 36 – Анализ пирофосфатазной активности в мембранных фракциях штаммов *E. coli*. MG1655; MG1655 *hppa*, MG1655 IS5.8::P_L-SD1-*hppa*^{Rru} (PPa⁺); MG1655 *hppa* Δppa, MG1655 IS5.8::P_L-SD1-*hppa*^{Rru} Δppa::cat. Представлены усредненные значения 3 экспериментов.

Следует отметить, что ферментативная активность в мембранной фракции штамма *E. coli* MG1655 *hppa*^{Rru}, содержащего оба типа пирогосфатаз – растворимую и мембранную, в пределах доверительного интервала была сравнима со штаммом дикого *E. coli* типа (MG1655). В настоящее время трудно объяснить причину этого явления. Возможно, оно как-то связано с конкурентным взаимодействием между мембранной и растворимой пирогосфатазами по отношению к субстрату и затрудненным доступом субстрата к мембранной пирогосфатазе в присутствии растворимого фермента, полностью исключить контаминацию которого в опытах не удаётся. Стоит отметить, что в данной работе не анализировали активность штаммов с увеличенной копийностью гена *hppa*^{Rru}. Это связано с тем, что ростовые характеристики штаммов с разным числом копий гена *hppa*^{Rru} друг от друга не отличались (Рисунок 35), из чего можно предположить, что уровень активности, обеспечиваемый каждой из этих PPase копий приблизительно одинаковый.

4.4.5. Экспрессия гена H^+ -PPase^{Rru} приводит к увеличению выхода белка YFP

Функционирование H^+ -PPase^{Rru} в качестве единственной пирогосфатазы в клетках *E. coli* было изучено при помощи анализа метаболических потоков (13C-MFA, metabolic flux analysis) нашими коллегами в лаборатории метаболической инженерии (АО «АГРИ»). Было подтверждено, что замена нативной PPase на H^+ -PPase^{Rru} приводит к перераспределению потока углерода в клетке (WO2020071538). В частности, было обнаружено статистически значимое снижение потоков углерода через цикл трикарбоновых кислот (ТЦК) на 45% в данном штамме по сравнению со штаммом дикого типа MG1655. Известно, что ЦТК является основным источником субстратов для окислительного фосфорилирования и образования АТФ в клетках во время аэробного роста. Следовательно, уменьшение потока углерода через ЦТК в штамме *E. coli*, содержащем H^+ -PPase^{Rru} вместо PPase, указывает на наличие альтернативного пути образования энергии (протон-движущей силы). В связи с этим, можно предположить, что экспрессия H^+ -PPase^{Rru} может быть применима для получения микробиологическим способом соединений, биосинтез которых требует

большого расхода АТФ.

Выше уже упоминалось о том, что образование биомассы у *E. coli* является одним из самых энергозатратных процессов в клетке. Были выделены, по крайней мере, три основных составляющих, необходимых для образования бактериальной биомассы. Первой и самой существенной являются реакции полимеризации, в частности, синтез белка, на который расходуется до 75% всей клеточной энергии (Maloney, 1986). Второй важной составляющей является сам по себе биосинтез мономеров (аминокислоты, нуклеотиды и т.д). Также, существенную роль в образовании биомассы играет транспорт источников углерода и осмотически активных веществ (Russell and Cook, 1995, Lane and Martin, 2010).

Учитывая уменьшение потока углерода через ЦТК в штамме *E. coli*, экспрессирующем H^+ -PPase^{Rru}, можно предположить, что функционирование мембран-связанной пиррофосфатазы должно сказываться на способности клеток к сверхсинтезу белка. Проверка влияния экспрессии H^+ -PPase^{Rru} на синтез белка осуществлялась на примере синтеза желтого флуоресцентного белка YFP (Sheff and Thorn, 2004) в качестве модели при помощи оптимизированного метода индивидуальной экспрессии соответствующего гена *yfp* в штамме *E. coli* BL21(DE3) (Studier and Moffatt, 1986), который наиболее часто используется для опосредованной T7 полимеразой ИПТГ-индуцируемой экспрессии.

Для осуществления индивидуальной экспрессии белка YFP использовали рекомбинантную плазмиду рРК-T7lac-*yfp*, любезно предоставленную А. А. Крыловым (АО «АГРИ», Москва) (Рисунок 37).

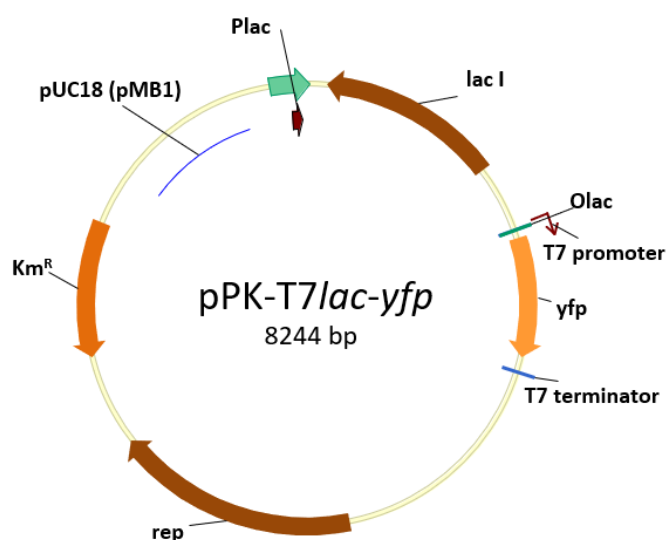


Рисунок 37 – Карта плазмиды pPK-T7lac-yfp. Km^R, ген устойчивости к канамицину *kan*, гибридный промотор/оператор T7lac \equiv ϕ 10/O_{lac}, *lacI*, ген лактозного репрессора, *yfp*, ген желтого флуоресцентного белка YFP, терминатор T7.

В штамм *E. coli* BL21(DE3) была перенесена трансдукцией экспрессионная кассета IS5.8::*cat*-P_L-SD1-*hppa*^{Rru} (раздел «Материалы и методы»). Полученный штамм был трансформирован плазмидой pPK-T7lac-yfp. Исходный штамм BL21(DE3) был также трансформирован плазмидой pPK-T7lac-yfp и служил в качестве контроля.

Для оптимизации экспрессии YFP, клетки штаммов *E. coli* BL21(DE3)/pPK-T7lac-yfp и BL21(DE3) IS5.8::*cat*-P_L-SD1-*hppa*^{Rru}/pPK-T7lac-yfp выращивали в пробирках при 36°C до ОП₆₀₀ = 0,6. Синтез белка YFP индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 1 ммоль. В качестве отрицательного контроля для измерения оптической плотности и флуоресценции, использовались пробирки с теми же штаммами, в которые не был добавлен ИПТГ. Анализируемые штаммы с добавлением ИПТГ инкубировали в течение 15 минут при температуре 36°C. Короткое время индукции обусловлено различием в скорости роста штаммов *E. coli* BL21(DE3) и штамма BL21(DE3) IS5.8::*cat*-P_L-SD1-*hppa*^{Rru}, содержащего ген *hppa*^{Rru} (Рисунок 38).

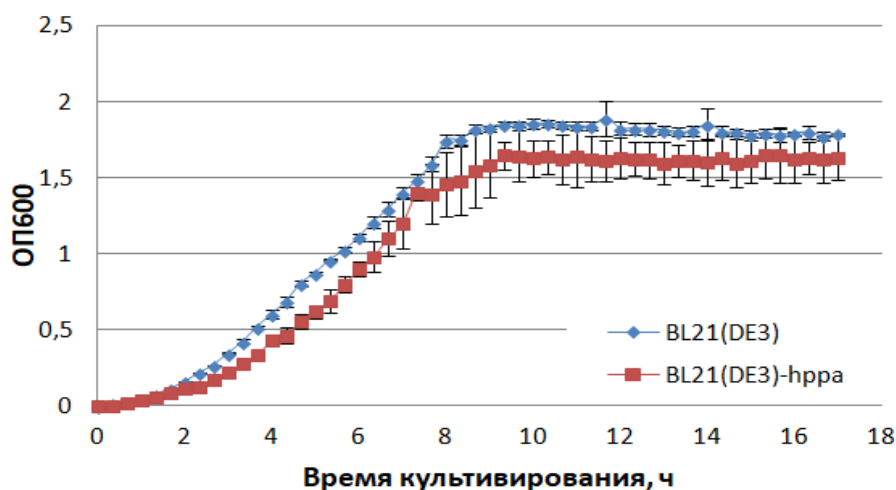


Рисунок 38 – Кинетика роста штамма, содержащего экспрессионную кассету с геном *hppa*^{Rru} в клетках *E. coli* BL21(DE3). Представлены усредненные значения 3 независимых экспериментов.

Далее, добавляли антибиотик рифампицин до конечной концентрации 200 мкг/мл. Рифампицин эффективно ингибирует бактериальную РНК-полимеразу, в то время как транскрипция с промотора T7 соответствующей РНК полимеразой продолжается в связи с устойчивостью этой полимеразы к данному антибиотику. Таким образом, добавление рифампицина к клеткам, содержащим ген T7 полимеразы, приводит к индивидуальной экспрессии генов, находящихся под контролем T7 промотора. После добавления рифампицина клетки продолжали расти при температуре 36°C и анализировали ОП и кинетику изменения флуоресценции в пробирках в течение 5 часов. Штаммы, которые не были индуцированы ИПТГ, использовались в качестве контроля. Для подсчета отношения относительной флуоресценции к ОП (F/ОП) использовалась следующая формула: $F = (F - F_0) / (ОП - ОП_0) - (F_k - F_0) / (ОП_k - ОП_0)$, где F и ОП, флуоресценция и ОП штаммов с добавлением ИПТГ, соответственно; F_k и ОП_k, флуоресценция и ОП штаммов без добавления ИПТГ (отрицательный контроль); F₀ и ОП₀, YFP флуоресценция и ОП физиологического раствора (отрицательный контроль).

Было показано, что продукция белка YFP (выраженная как отношение F/ОП) штаммом *E. coli* BL21(DE3) IS5.8::*cat*-P_L-SD1-*hppa*^{Rru}, содержащим ген *hppa*^{Rru} была приблизительно на 40% выше по сравнению с контролем (Рисунок 39). Таким образом,

был продемонстрирован положительный эффект экспрессии H^+ -PPase^{Rru} на синтез белка, очевидно, связанный с дополнительным образованием в клетках АТФ.

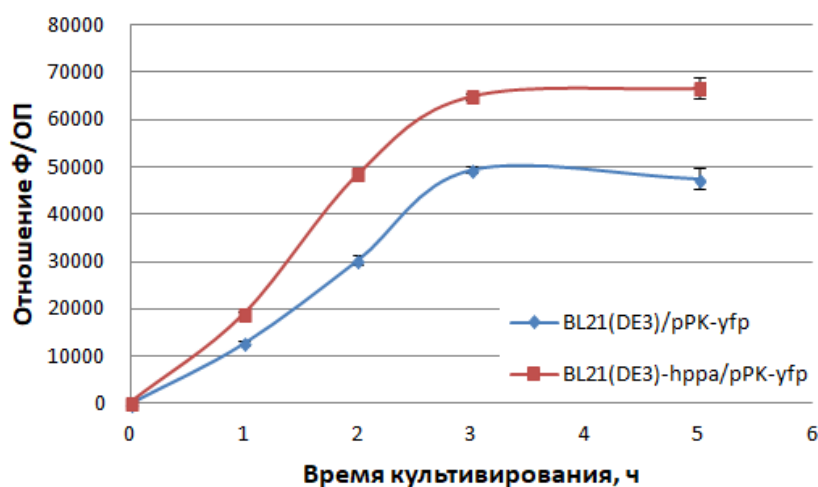


Рисунок 39 – Относительная флуоресценция (Ф/ОП) в штаммах BL21(DE3) и BL21(DE3) IS5.8::cat-P_L-hppa^{Rru} со сверхэкспрессией гена мембранной пирофосфатазы *hppa* *R. rubrum*, содержащих плазмиду pPK-T7lac-yfp. BL21(DE3)-hppa, BL21(DE3) IS5.8::cat-P_L-SD1-hppa^{Rru}, pPK-yfp, pPK-T7lac-yfp. Представлены усредненные данные 3 независимых экспериментов.

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

Проверка возможного влияния экспрессии гена мембранной H^+ -PPase^{Rru} на продукцию ГИС осуществлялась в штамме-продуценте *E. coli* EA92. Накопление ГИС полученными штаммами EA92 IS5.8::P_L-hppa^{Rru} и EA92 IS5.8::P_L-hppa^{Rru} Δ*ppa*::cat (раздел «Материалы и методы»). анализировали в пробирочной ферментации (Таблица 19). Было продемонстрировано, что штамм EA92 IS5.8::P_L-hppa^{Rru}, содержащий дополнительно H^+ -PPase^{Rru}, продуцировал на 7% больше ГИС, чем контрольный, EA92. Последующая полная замена нативной PPase *E. coli* на H^+ -PPase^{Rru} приводила к замедлению роста, однако продукция ГИС увеличивалась на 30% по сравнению с исходным штаммом (Таблица 19).

В случае замены цитоплазматической пирофосфатазы на мембранную, как и в

ранее описанных опытах наблюдалось уменьшение оптической плотности культуры. При этом в обоих случаях повышалась продуктивность клеток, которые приобретали способность более эффективно синтезировать ГИС. Таким образом, мы показали принципиальную возможность использования H^+ -PPase^{Rru} для увеличения продукции ГИС штаммом-продуцентом *E. coli*.

Таблица 19 – Влияние экспрессии гена мембранной пирофосфатазы H^+ -PPa^{Rru} на увеличение продукции ГИС соответствующим штаммом-продуцентом *E. coli* EA92.

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

Приведены усредненные результаты 6 независимых экспериментов.

Кроме того, был продемонстрировано позитивное влияние сверхэкспрессии гена *hppa*^{Rru} на продукцию других соединений, чей синтез зависит от АТФ, таких как L-треонин и нуклеозиды пуринов, соответствующими штаммами-продуцентами *E. coli* and *Bacillus amiloliquefaciens* (WO2020071538).

В дальнейшем, возможным подходом к повышению эффективности штаммов-продуцентов, содержащих H^+ -PPase^{Rru}, может явиться улучшение их ростовых характеристик, в частности, за счёт изменения фермента H^+ -PPa^{Rru} путём проведения адаптивной эволюции.

5. Заключение

При изучении особенностей регуляции ключевого фермента биосинтеза ГИС – АТФ-ФРТ было показано, что как нативный фермент *E. coli*, так и описанный ранее фермент АТФ-ФРТ^{E271K}, устойчивый к ретроингибированию, подвержены ингибированию структурным аналогом АМФ, 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотидом (АИКАР). Измеренная ферментативная активность АТФ-ФРТ дикого типа и устойчивого к ретроингибированию варианта АТФ-ФРТ^{E271K} в присутствии АИКАР показала, что уровень ингибирования для мутантного фермента АТФ-ФРТ^{E271K} оказывался даже более значительным (52%), чем для фермента дикого типа (35%). Как известно, АИКАР может образоваться в клетках *E. coli* как в пути синтеза пуринов *de novo*, так и в процессе синтеза ГИС. В настоящей работе впервые было показано, что в последнем случае АИКАР способен негативно регулировать самый первый этап своего синтеза за счет ингибирования фермента АТФ-ФРТ. Этот факт интересен сам по себе, поскольку микробный синтез АИКАР в последнее время приобретает существенное практическое значение. Этот факт также важно принимать во внимание и при конструировании штаммов – продуцентов гистидина. Обнаруженную способность к ингибированию молекулой АИКАР (фактически, интермедиатом синтеза ГИС) первого ключевого фермента, в том числе, и мутантного, устойчивого к ретроингибированию конечным продуктом, необходимо учитывать: важным фактором для продукции ГИС представляется снижение пула АИКАР за счет его дальнейшего преобразования в нуклеотиды аденина.

Для обеспечения эффективного превращения АИКАР в нуклеотиды аденина, на основе ранее описанного штамма-продуцента *E. coli* KF37 был сконструирован новый улучшенный штамм EA83 с увеличенной продукцией ГИС, по сравнению с исходным. Было продемонстрировано, что улучшение продукции ГИС связано с усилением конверсии АИКАР в нуклеотиды аденина за

счет сверхэкспрессии генов *purH* и *purA*. В ходе работы было обнаружено, что инактивация PitA, транспортера неорганического фосфата в комплексе с двухвалентными катионами ($\text{Me}^{2+}\text{-P}_i$), также приводила к увеличению продукции ГИС. Хотя исследование механизма позитивного влияния инактивации PitA на синтез ГИС выходило за рамки настоящей работы, нами были сделаны некоторые предположения, основанные на возможном изменении внутриклеточного уровня фосфатов и гомеостаза Mg^{2+} . Позже, последнее предположение было экспериментально подтверждено (Yin et al., 2019). Так, было показано, что экспрессия небольшого белка MgtS, который, в свою очередь, индуцирует PhoQ-PhoP регулон в ответ на нехватку Mg^{2+} в клетке, активируется за счет симпортера PitA. MgtS связывается с PitA, далее образовавшийся комплекс связывает и стабилизирует транспортер магния MgtA, что в конечном итоге приводит к повышению уровня Mg^{2+} в клетке.

В дополнение, в нашей работе на примере штамма KF37, было показано, что штамм, продуцирующий ГИС, неожиданно проявлял сниженную активность щелочной фосфатазы при низких концентрациях P_i по сравнению со штаммом дикого типа. На этом основании была предложена гипотеза о возможном негативном влиянии АИКАР и на двухкомпонентную систему PhoBR, которая контролирует экспрессию генов Pho регулона, в том числе, ген щелочной фосфатазы *phoA*.

Таким образом, были предложены и изучены новые факторы, позитивно влияющие на сверхсинтез ГИС, а полученные результаты описаны в соответствующей публикации (Malykh et al., 2018). Стоит отметить, что важность настоящего исследования была впоследствии подтверждена группами других ученых, специализирующимся в данной области (Yin et al., 2019, Schwentner et al., 2019, Wu et al., 2020). Так, современным методом анализа метаболических потоков (FBA, flux balance analysis) была показана ключевая необходимость эффективной регенерации АИКАР в АТФ, а также усиления центрального метаболизма углерода (C1-метаболизма) для обеспечения сверхсинтеза ГИС в

клетках штамма-продуцента *C. glutamicum* (Schwentner et al., 2019). В частности, было продемонстрировано, что сверхэкспрессия генов *purA* и *purB* скорректировала уровень внутриклеточных концентраций ИМФ, аденилсукцината и АДФ, что подтверждает более эффективную регенерацию АТФ в пути биосинтеза ГИС. Несмотря на это, усиление *purA* и *purB* не приводило к снижению внутриклеточных концентраций АИКАР, а также не приводило к увеличению накопления ГИС во всех штаммах-продуцентах. Авторы предположили, что данные результаты указывают на возможные различные регуляторные механизмы у *C. glutamicum* по сравнению с *E. coli*. Также, авторы отмечают значимость полученных в нашей работе результатов, показывающих негативное влияние АИКАР на активность АТФ-ФРТ. Более того, недавно для *E. coli* было показано, что при ограничении фолиевой кислоты АИКАР накапливается и связывается со специфическим рибопереключателем, который негативно контролирует экспрессию генов биосинтеза пуринов (Kim et al., 2020). В связи с этим, авторами был предложен подход, основанный на усилении центрального метаболизма углерода (С1-метаболизма) путем экспрессии генов соответствующих генов *gcvTHP* из *Corynebacterium jeikeium*.

Стоит отметить, что важность рециркуляции АИКАР в АТФ, а также усиление С1-метаболизма для обеспечения сверхсинтеза ГИС было дополнительно подтверждено в одной из последних работ по конструированию сверхпродуцента ГИС на основе штамма *C. glutamicum* (Wu et al., 2020). В этой работе, реализация известных подходов (удаление аттенюации транскрипции *his* оперона, снятие ретроингибирования АТФ-ФРТ (HisG), увеличение экспрессии генов биосинтеза ГИС, а также усиление пентозофосфатного пути) в сочетании с новыми эффективными подходами (конверсии АИКАР в АТФ, изменение пути биосинтеза пуринов, усиление экспорта ГИС в клетках *C. glutamicum* и пр.) позволили сконструировать штамм *C. glutamicum*, продуцирующий 11,8 г/л ГИС.

Также, в настоящей работе было показано, что делеция гена *yjjK* увеличивает продукцию ГИС соответствующим штаммом-продуцентом KF37. Белок YjjK из *E.*

coli был впоследствии охарактеризован в качестве энергозависимого трансляционного фактора A (energy-dependent translational throttle protein A, EttA), роль которого заключается в контроле процесса трансляции в зависимости от энергетического статуса клетки.

Таким образом, были найдены новые факторы, улучшающие продукцию ГИС, которые можно в дальнейшем применять при конструировании соответствующих штаммов-продуцентов.

Далее, был осуществлен поиск новых альтернативных подходов для дальнейшего усиления пути конверсии нуклеотидов аденина в АТФ для обеспечения сверхсинтеза ГИС.

С этой целью исследовали роль усиления экспрессии оперонов *nuo* и *atp*, кодирующих комплексы H^+ -АТФ-синтазу и NADH: убихинон оксидоредуктазу I (NDH-1) на рост и выход биомассы *E. coli* в различных физиологических условиях. NDH-1 является важным компонентом дыхательной цепи клеток *E. coli* и объединяет окисление NADH с переносом протона через цитоплазматическую мембрану; генерируемый при этом мембранный потенциал может быть использован для синтеза АТФ при участии H^+ -АТФ-синтазного комплекса. Был проанализирован рост штаммов MG1655, MG1655::*atp* и MG1655::*atp*::*nuo*, содержащих дополнительные копии указанных оперонов, в процессе культивирования в периодической культуре с подпиткой (Fed-Batch) при условиях низкой и высокой аэрации. В условиях лимита по кислороду, сверхэкспрессия *atp* оперона не влияет на клеточный рост, однако комбинация сверхэкспрессии *atp* и *nuo* оперонов приводит к увеличению потребления глюкозы, повышению накопления биомассы, а также отношения биомассы к потребленному источнику углерода. При высокой аэрации, как сверхэкспрессия *atp* оперона, так и комбинация сверхэкспрессии *atp* и *nuo* оперонов, приводит к увеличению всех приведенных выше значений. Таким образом, можно считать, что уровень экспрессии *atp* и *nuo* оперонов является лимитирующим фактором даже при аэробном росте клеток *E. coli*.

Исследовались ростовые характеристики штаммов, содержащих мутантный

комплекс NDH-1 с измененной субстратной специфичностью. Микробный синтез ГИС ассоциирован с избыточным синтезом NADPH, что является известным фактором, ингибирующим рост клеток. Можно предположить, что изменение субстратной специфичности NDH-1 (появление наряду со сродством к NADH, также и сродства к NADPH) позволит задействовать избыточный NADPH в процессе дыхания, что увеличит, в свою очередь, способность клетки к дополнительному синтезу АТФ. В частности, была исследована роль известной мутации E183A в субъединице NuoF (NuoF^{E183A}), приводящей к двойной субстратной специфичности комплекса NDH-1 в условиях сверхсинтеза ГИС. Был проведен сайт-направленный мутагенез гена *nuoF*, кодирующего растворимую субъединицу комплекса NDH-1, что приводило к образованию мутантного комплекса NAD(P)H: убухинон оксидоредуктазы I, способного использовать NADPH в качестве альтернативного субстрата. Анализ активности NDH-1 подтвердил, что мутантный штамм MG1655 *nuoF*^{E183A} приобретает специфичность к NADPH. Таким образом, образование протон-движущей силы у полученных штаммов может осуществляться не только за счет окисления NADH, но и NADPH. Было продемонстрировано позитивное влияние мутации E183A в гене *nuoF* на продукцию ГИС штаммом-продуцентом EA92.

В заключение, исследовали экспрессию гена неорганической мембранной H⁺-переносящей пирофосфатазы из *Rhodospirillum rubrum* (H⁺-PPase^{Rru}) с целью ее потенциального применения в микробиологических процессах, требующих высоких затрат АТФ. Ген *hppa*^{Rru} из *R. rubrum*, с набором кодонов, «гармонизированным» для функционирования фермента в *E. coli*, был экспрессирован в этих клетках. Для подтверждения функционирования *in vivo* H⁺-PPase^{Rru} в клетках *E. coli* впервые была продемонстрирована возможность замены существенного гена неорганической растворимой пирофосфатазы PPase на H⁺-PPase^{Rru} в клетках *E. coli*. Измерение пирофосфатазной активности штаммов, содержащих только H⁺-PPase^{Rru}, подтвердило отсутствие пирофосфатазной активности в растворимой фракции, а также ее наличие в нерастворимой фракции мембранных везикул.

Соответственно, было продемонстрировано позитивное влияние экспрессии гена мембранной H^+ -PPase^{Rru} на продукцию ГИС штаммом-продуцентом EA92. Последующая замена природной, цитоплазматической, PPase *E. coli* на гетерологичную, мембран-связанную, H^+ -PPase из *R. rubrum* приводила к замедленному росту штамма EA92, однако продукция ГИС увеличивалась на 30% по сравнению с исходным штаммом.

В попытках расширить практическое применение H^+ -PPase^{Rru} ввиду биоэнергетических преимуществ данного фермента, в данной работе изучалось влияние экспрессии гена H^+ -PPase^{Rru} на синтез белка как одного из наиболее энергозатратных процессов в клетке. В результате проведенных экспериментов было показано, что уровень синтеза репортерного белка YFP у штамма *E. coli* BL21(DE3), дополнительно содержащем H^+ -PPase^{Rru}, был выше, чем у исходного штамма, у которого этот фермент отсутствовал.

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 сокращений

АДФ – аденозиндифосфат;
АИКАР – 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид, ZMP;
АИКАр – 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибофуранозид, дефосфорилированная форма АИКАР;
АМРК – АМР-активируемая протеинкиназа;
АМФ – аденозинмонофосфат;
АСП – L-аспартат;
АТФ – аденозин трифосфат;
АТФ-ФРТ – АТФ-фосфорибозилтрансфераза;
б.м. – без маркера антибиотикоустойчивости;
ГИС – L-гистидин, L-Гис
ГСД – гистидин-содержащие дипептиды;
ИМВ – инвертированные везикулы внутренней мембраны;
ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
КАР – карнозин, β -аланил-L-гистидин;
Me²⁺-P_i – комплексы неорганического фосфата с двухвалентными металлами;
НАД/НАДН – никотинамидадениндинуклеотид, окисленный/восстановленный;
НАДФ/НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленный/восстановленный;
ОП – оптическая плотность;
п.н. – пар нуклеотидов;
ПОЛ – перекисное окисление липидов;
ПФП – пентозо-фосфатный путь;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;
ТСХ – тонкослойная хроматография;
ФРПФ – фосфорибозил пирофосфат;
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
(p)ppGpp – гуанозин пентафосфат;
Adk – аденилат киназа;
АМДР – амидометилендифосфанат;
Ар – ампициллин;
AS – аденилосукцинат;
BCIP – 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат;
Cm – хлорамфеникол;
F – фторид;
FAICAR – 5-фосфорибозил-формамидо-карбоксамид;

fTHF – формил-тетрагидрофолат;
fum – фумаровая кислота;
GDP – гуанозиндифосфат;
Gln – L-глутамин;
Glu – L-глутамат;
GTP – гуанозинтрифосфат;
H⁺-PPase – мембрано-связанная H⁺-переносящая неорганическая пирофосфатаза;
His-ol – L-гистидинол;
His-ol-P – L-гистидинолфосфат;
Histidinal – L-гистидиналь;
HPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография;
HT – белок, меченный His₆-Tag;
IA-P – имидазол ацетилфосфат;
IGP – имидазол глицеролфосфат;
IMP – инозин-5-монофосфат;
Km – канамицин;
LP – лидерный пептид;
M-PPase – мембрано-связанная неорганическая пирофосфатаза;
NAD⁺/NADH – никотинамидадениндинуклеотид окисленная/восстановленная форма;
NADP/NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
NDH-1 – NADH: убихинон оксидоредуктаза I;
PAGE – полиакриламидный гель-электрофорез;
P_i – неорганический фосфат;
PLP – пиридоксаль фосфат;
PPases – неорганические пирофосфатазы;
ppGpp – гуанозин тетрафосфат;
PP_i – неорганический пирофосфат;
PR-AMP – фосфорибозил-АМФ;
PR-ATP – фосфорибозил-АТФ;
PR-F-AICAR-P – фосфорибозилформимино-АИКАР-фосфат;
PR-FAR – фосфорибулозилформимино-АИКАР-фосфат;
Prs – рибозо-фосфат дифосфокиназа;
R5P – рибозо-5-фосфат;
RNS – активные формы азота;
ROS – активные формы кислорода;
SD – последовательность Шайна-Далгарно;
SDS – додецилсульфат натрия;
S-PPase – цитоплазматическая растворимая пирофосфатаза;
Tc – тетрациклин;
THF – тетрагидрофолиевая кислота;
UQ – убихинон;
YFP – желтый флуоресцентный белок.
ZTP – 5-амино-4-имидазол карбоксамид рибозид 5'-трифосфат;

α -KG – α -кетоглутаровая кислота;

Список цитируемой литературы

1. Аствацатурянц Г. В., Лисенков А. Ф., Смирнов Ю. В., Шакулов Р. С. Получение мутантов с нарушенным ретроингибированием биосинтеза гистидина //Генетика. – 1988. – Т. 24. – №. 10. – С. 1928-1934.
2. Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями //Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – №. 12. – С. 245-296.
3. Дорошенко В. Г., Лобанов А. О., Федорина Е. А. Направленное изменение *Escherichia coli* MG1655 с целью получения мутантов, продуцирующих гистидин //Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49. – №. 2. – С. 149-149.
4. Дьякова, Е. В. Влияние экспрессии гена мембранной Н-пирофосфатазы *Rhodospirillum rubrum* на уровень солеустойчивости растений табака //Москва. – 2012.
5. Клячко Е.В., Шакулов Р.С., Козлов Ю.И. Бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*-продуцент L-гистидина и способ получения L-гистидина. Патент РФ 2276688 (20.05.2006).
6. Клячко, Е. В., Зиброва, М. Г., Шакулов, Р. С., Дебабов, В. Г. и Козлов, Ю. И. Штамм *Escherichia coli*-продуцент L-гистидина. Патент РФ 2119536 (27.09.1998).
7. Клячко, Е. В., Шакулов, Р. С., Дебабов, В. Г. и Козлов, Ю. И. Штамм бактерий *Escherichia coli*-продуцент L-гистидина. Патент РФ 2003677 (30.11.1993).
8. Кошенко, Т. А. Генетическая и биохимическая характеристика FoF1-АТФ-синтазы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 //Москва. – 2012.
9. Лобанов, К. В., Королькова, Н. В., Тяглов, Б. В., Глазунов, А. В., Шакулов, Р. С. и Миронов, А. С. Реконструкция пуринового метаболизма у *Bacillus subtilis* с целью получения штамма-продуцента АIсAR—нового препарата широкого терапевтического применения //Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2011. – Т. 3. – №. 2. – С. 83-93.
10. Попова, О. В., Коротаева, К. Н., Пенкина, Ю. А., Вязников, В. А., Трухина, С. И. и Циркин, В. И. Влияние гистидина на амплитуду сокращений изолированного миокарда человека и показатели кардиоинтервалографии и электроэнцефалографии //Вятский медицинский вестник. – 2010. – №. 2. – С. 32-35.
11. Попова О. В., Трухина С. И., Циркин В. И. Влияние гистидина на вариабельность сердечного ритма и электрическую активность мозга. – 2010.
12. Хлыбова С. В., Циркин В. И. Свободный L-гистидин как один из регуляторов физиологических процессов //Вятский медицинский вестник. – 2006. – №. 3-4. – С. 43-49.

13. Abe H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle //Biochemistry C/C Of Biokhimiia. – 2000. – T. 65. – №. 7. – C. 757-765.
14. Akiyama M., Crooke E., Kornberg A. An exopolyphosphatase of Escherichia coli. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon //Journal of Biological Chemistry. – 1993. – T. 268. – №. 1. – C. 633-639.
15. Allen S., Zilles J. L., Downs D. M. Metabolic flux in both the purine mononucleotide and histidine biosynthetic pathways can influence synthesis of the hydroxymethyl pyrimidine moiety of thiamine in Salmonella enterica //Journal of bacteriology. – 2002. – T. 184. – №. 22. – C. 6130-6137.
16. Ambudkar S. V., Larson T. J., Maloney P. C. Reconstitution of sugar phosphate transport systems of Escherichia coli //Journal of Biological Chemistry. – 1986. – T. 261. – №. 20. – C. 9083-9086.
17. Amemura M., Makino K., Shinagawa H., Nakata A. Nucleotide sequence of the phoM region of Escherichia coli: four open reading frames may constitute an operon //Journal of bacteriology. – 1986. – T. 168. – №. 1. – C. 294-302.
18. Amemura M., Makino K., Shinagawa H., Nakata A. Cross talk to the phosphate regulon of Escherichia coli by PhoM protein: PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2 //Journal of bacteriology. – 1990. – T. 172. – №. 11. – C. 6300-6307.
19. Ames B. N., Martin R. G., Garry B. J. The first step of histidine biosynthesis //Journal of Biological Chemistry. – 1961. – T. 236. – №. 7. – C. 2019-2026.
20. Angov E., Hillier C. J., Kincaid R. L., Lyon J. A. Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host //PloS one. – 2008. – T. 3. – №. 5. – C. e2189.
21. Angov E., Legler P. M., Mease R. M. Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding //Heterologous Gene Expression in E. coli. – 2011. – C. 1-13.
22. Aoki R., Wada M., Takesue N., Tanaka K., Yokota A. Enhanced glutamic acid production by a H⁺-ATPase-defective mutant of Corynebacterium glutamicum //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2005. – T. 69. – №. 8. – C. 1466-1472.
23. Araki K., Nakayama K. Studies on histidine fermentation: Part I. L-histidine production by histidine analog-resistant mutants from several bacteria// *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1971. – T. 35. – №. 13. – C. 2081-2088.
24. Araki K., Nakayama K. A biochemical characterization of histidine auxotrophs of Corynebacterium glutamicum //Agricultural and Biological Chemistry. – 1974. – T. 38. – №. 11. – C. 2219-2225.
25. Araki K., Nakayama K. Studies on histidine fermentation. VI Accumulation of L-histidinol by a histidine auxotroph of Corynebacterium glutamicum and its conversion into

L-histidine by and Escherichia coli strain //Agricultural and Biological Chemistry. – 1975. – T. 39. – №. 1. – C. 127-132.

26. Araki K., Shimojo S., Nakayama K. Histidine production by Corynebacterium glutamicum mutants, multiresistant to analogs of histidine, tryptophan, purine and pyrimidine //Agricultural and Biological Chemistry. – 1974. – T. 38. – №. 4. – C. 837-846.

27. Astvatsaturiants G. V., Lisenkov A. F., IuV S., Shakulov R. S. Isolation of mutants with impaired retroinhibition of histidine biosynthesis //Genetika. – 1988. – T. 24. – №. 11. – C. 1928-1934.

28. Atkinson D. E. Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers //Biochemistry. – 1968. – T. 7. – №. 11. – C. 4030-4034.

29. Atkinson D. E., Walton G. M. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation: rat liver citrate cleavage enzyme //Journal of Biological Chemistry. – 1967. – T. 242. – №. 13. – C. 3239-3241.

30. Auriol C. et al. Stress-induced evolution of Escherichia coli points to original concepts in respiratory cofactor selectivity //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – T. 108. – №. 4. – C. 1278-1283.

31. 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. – T. 2. – №. 1. – C. 2006.0008.

32. Babizhayev M. A., Kasus-Jacobi A. State of the art clinical efficacy and safety evaluation of N-acetylcarnosine dipeptide ophthalmic prodrug. Principles for the delivery, self-bioactivation, molecular targets and interaction with a highly evolved histidyl-hydrazide structure in the treatment and therapeutic management of a group of sight-threatening eye diseases //Current Clinical Pharmacology. – 2009. – T. 4. – №. 1. – C. 4-37.

33. Babizhayev M., E Yegorov Y. An “Enigmatic” l-Carnosine (β -Alanyl-l-Histidine)? Cell Proliferative Activity as a Fundamental Property of a Natural Dipeptide Inherent to Traditional Antioxidant, Anti-Aging Biological Activities: Balancing and a Hormonally Correct Agent, Novel patented oral therapy dosage formulation for mobility, skeletal muscle power and functional performance, hypothalamic-pituitary-brain relationship in health, aging and stress studies //Recent Patents on Drug Delivery & Formulation. – 2015. – T. 9. – №. 1. – C. 1-64.

34. Babizhayev M., I Deyev A., E Yegorov Y. L-carnosine modulates respiratory burst and reactive oxygen species production in neutrophil biochemistry and function: may oral dosage form of non-hydrolyzed dipeptide L-carnosine complement anti-infective anti-influenza flu treatment, prevention and self-care as an alternative to the conventional vaccination? //Current Clinical Pharmacology. – 2014. – T. 9. – №. 2. – C. 93-115.

- 35.** Bachhawat P., Swapna G. V. T., Montelione G. T., Stock, A. M. Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states //Structure. – 2005. – T. 13. – №. 9. – C. 1353-1363.
- 36.** Baltscheffsky H. Inorganic pyrophosphate and the evolution of biological energy transformation //Acta chemica Scandinavica. – 1967. – T. 21. – №. 7. – C. 1973-1974.
- 37.** Baltscheffsky H. Energy conversion leading to the origin and early evolution of life: did inorganic pyrophosphate precede adenosine triphosphate //Origin and evolution of biological energy conversion. – 1996. – C. 1-9.
- 38.** Baltscheffsky H. Major “anastrophes” in the origin and early evolution of biological energy conversion //Journal of theoretical biology. – 1997. – T. 187. – №. 4. – C. 495-501.
- 39.** Baltscheffsky H., von Stedingk L. V., Heldt H. W., Klingenberg M. Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation //Science. – 1966. – T. 153. – №. 3740. – C. 1120-1122.
- 40.** Baltscheffsky M. Some characteristics of the pyrophosphatase reaction in energy-generating systems //Abstracts 1st FEBS Meeting. – 1964. – C. 67.
- 41.** Baltscheffsky M. Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from Rhodospirillum rubrum //Nature. – 1967. – T. 216. – №. 5112. – C. 241-243.
- 42.** Baltscheffsky M., Nadanaciva S., Schultz A. A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphate synthase from Rhodospirillum rubrum //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1998. – T. 1364. – №. 3. – C. 301-306.
- 43.** Batelli G., Verslues P. E., Agius F., Qiu Q., Fujii H., Pan S., Schumaker K. S., Grillo S., Zhu J. K. SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity //Molecular and cellular biology. – 2007. – T. 27. – №. 22. – C. 7781-7790.
- 44.** Baykov A. A., Malinen A. M., Luoto H. H., Lahti R. Pyrophosphate-fueled Na⁺ and H⁺ transport in prokaryotes //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2013. – T. 77. – №. 2. – C. 267-276.
- 45.** Bazarro J. V., Downs D. M. Amino-4-imidazolecarboxamide ribotide directly inhibits coenzyme A biosynthesis in Salmonella enterica //Journal of bacteriology. – 2014. – T. 196. – №. 4. – C. 772-779.
- 46.** Bazarro J. V., Dearth S. P., Tague E. D., Campagna S. R., Downs D. M. Untargeted metabolomics confirms and extends the understanding of the impact of aminoimidazole carboxamide ribotide (AICAR) in the metabolic network of Salmonella enterica //Microbial Cell. – 2018. – T. 5. – №. 2. – C. 74.
- 47.** Belogurov G. A., Malinen A. M., Turkina M. V., Jalonen U., Rytönen K., Baykov A. A., Lahti R. Membrane-bound pyrophosphatase of Thermotoga maritima requires sodium for activity //Biochemistry. – 2005. – T. 44. – №. 6. – C. 2088-2096.

- 48.** Belogurov G. A., Turkina M. V., Penttinen A., Huopalahti S., Baykov A. A., Lahti R. H⁺-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: high yield expression in *Escherichia coli* and identification of the Cys residues responsible for inactivation by mersalyl // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – T. 277. – №. 25. – C. 22209-22214.
- 49.** Bennett B. D., Kimball E. H., Gao M., Osterhout R., Van Dien S. J., Rabinowitz J. D. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli* // *Nature chemical biology*. – 2009. – T. 5. – №. 8. – C. 593-599.
- 50.** Blanco A. G., Sola M., Gomis-Rüth F. X., Coll M. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator // *Structure*. – 2002. – T. 10. – №. 5. – C. 701-713.
- 51.** Blank L. M., McLaughlin R. L., Nielsen L. K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate // *Biotechnology and bioengineering*. – 2005. – T. 90. – №. 6. – C. 685-693.
- 52.** 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. – T. 277. – №. 5331. – C. 1453-1462.
- 53.** Bochner B. R., Ames B. N. ZTP (5-amino 4-imidazole carboxamide riboside 5'-triphosphate): a proposed alarmone for 10-formyl-tetrahydrofolate deficiency // *Cell*. – 1982. – T. 29. – №. 3. – C. 929-937.
- 54.** Boël G., Smith P. C., Ning W., Englander M. T., Chen B., Hashem Y., Testa A. J., Fischer J. J., Wieden H., Frank J., Gonzalez Jr R. L., Hunt, J. F. The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle // *Nature structural & molecular biology*. – 2014. – T. 21. – №. 2. – C. 143-151.
- 55.** Boldyrev A. A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine // *Physiological reviews*. – 2013.
- 56.** Boldyrev A., Fedorova T., Stepanova M., Dobrotvorskaya I., Kozlova E., Boldanova Ivanova-Smolenskaya I., Illarioshkin S. Carnosine increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study // *Rejuvenation research*. – 2008. – T. 11. – №. 4. – C. 821-827.
- 57.** Borisov V. B., Murali R., Verkhovskaya M. L., Bloch D. A., Han H., Gennis R. B. and Verkhovsky M. I. Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – T. 108. – №. 42. – C. 17320-17324.
- 58.** Borodina I., Kenny L. C., McCarthy C. M., Paramasivan K., Pretorius E., Roberts T. J., van der Hoek S. A., Kell D. B. The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical // *Nutrition Research Reviews*. – 2020. – T. 33. – №. 2. – C. 190-217.
- 59.** Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. – 1976. – T. 72. – №. 1-2. – C. 248-254.

60. Brandt U. Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I) //Annu. Rev. Biochem. – 2006. – T. 75. – C. 69-92.
61. Brenner M., Ames B. N. The histidine operon and its regulation //Metabolic regulation. – Academic Press, 1971. – C. 349-387.
62. Brickman E., Beckwith J. Analysis of the regulation of Escherichia coli alkaline phosphatase synthesis using deletions and $\phi 80$ transducing phages //Journal of molecular biology. – 1975. – T. 96. – №. 2. – C. 307-316.
63. Brown M. R. W., Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – T. 101. – №. 46. – C. 16085-16087.
64. Campas C., López J. M., Santidrián A. F., Barragán M., Bellosillo B., Colomer D., Gil J. Adenosine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2003. – T. 101. – №. 9. – C. 3674-3680.
65. Candela T., Fouet A. Poly- gamma- glutamate in bacteria //Molecular microbiology. – 2006. – T. 60. – №. 5. – C. 1091-1098.
66. Cararo J. H., Streck E. L., Schuck P. F., da C Ferreira G. Carnosine and related peptides: therapeutic potential in age-related disorders //Aging and disease. – 2015. – T. 6. – №. 5. – C. 369.
67. Carlomagno M. S., Chiariotti L., Alifano P., Nappo A. G., Bruni C. B. Carlomagno M. S. et al. Structure and function of the Salmonella typhimurium and Escherichia coli K-12 histidine operons //Journal of molecular biology. – 1988. – T. 203. – №. 3. – C. 585-606.
68. Carmany D. O., Hollingsworth K., McCleary W. R. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR //Journal of bacteriology. – 2003. – T. 185. – №. 3. – C. 1112-1115.
69. Chakraborty S., Gruber T., Barry C. E., Boshoff H. I., Rhee, K. Y. Para-aminosalicylic acid acts as an alternative substrate of folate metabolism in Mycobacterium tuberculosis //Science. – 2013. – T. 339. – №. 6115. – C. 88-91.
70. Chandransu P., Huang X., Gaballa A., Helmann, J. D. Bacillus subtilis FolE is sustained by the ZagA zinc metallochaperone and the alarmone ZTP under conditions of zinc deficiency //Molecular microbiology. – 2019. – T. 112. – №. 3. – C. 751-765.
71. Chang C. N., Inouye H., Model P., Beckwith J. Processing of alkaline phosphatase precursor to the mature enzyme by an Escherichia coli inner membrane preparation //Journal of Bacteriology. – 1980. – T. 142. – №. 2. – C. 726-728.
72. Chatterji D., Ojha A. K. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling //Current opinion in microbiology. – 2001. – T. 4. – №. 2. – C. 160-165.
73. Chen B., Boël G., Hashem Y., Ning W., Fei J., Wang C., Gonzalez Jr R. L., Hunt, J. F., Frank, J. EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting

- ribosome-tRNA dynamics //Nature structural & molecular biology. – 2014. – T. 21. – №. 2. – C. 152-159.
- 74.** Chen H., Chu J., Zhang S., Zhuang Y., Qian J., Wang Y., Hu X. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris* //Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – T. 74. – №. 6. – C. 1205-1212.
- 75.** Chen J., Brevet A., Fromant M., Leveque F., Schmitter J. M., Blanquet S., Plateau P. Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli* //Journal of bacteriology. – 1990. – T. 172. – №. 10. – C. 5686-5689.
- 76.** Cheng Y., Zhou Y., Yang L., Zhang C., Xu Q., Xie X., Chen, N. Modification of histidine biosynthesis pathway genes and the impact on production of L-histidine in *Corynebacterium glutamicum* //Biotechnology letters. – 2013. – T. 35. – №. 5. – C. 735-741.
- 77.** Cooperman B. S., Baykov A. A., Lahti R. Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase //Trends in biochemical sciences. – 1992. – T. 17. – №. 7. – C. 262-266.
- 78.** Cornelli U. Treatment of Alzheimer's disease with a cholinesterase inhibitor combined with antioxidants //Neurodegenerative Diseases. – 2010. – T. 7. – №. 1-3. – C. 193-202.
- 79.** Cserjan-Puschmann M., Kramer W., Duerrschmid E., Striedner G., Bayer K. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes //Applied microbiology and biotechnology. – 1999. – T. 53. – №. 1. – C. 43-50.
- 80.** Daignan-Fornier B., Pinson B. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-Monophosphate (AICAR), a highly conserved purine intermediate with multiple effects //Metabolites. – 2012. – T. 2. – №. 2. – C. 292-302.
- 81.** Dall-Larsen T. Stopped flow kinetic studies of adenosine triphosphate phosphoribosyl transferase, the first enzyme in the histidine biosynthesis of *Escherichia coli* //The International Journal of Biochemistry. – 1988. – T. 20. – №. 8. – C. 811-815.
- 82.** Dall- Larsen, T., Klungsøyr, L. The Binding of Specific Ligands to Adenosine-Triphosphate Phosphoribosyltransferase //European Journal of Biochemistry. – 1976. – T. 69. – №. 1. – C. 195-201.
- 83.** Datsenko K. A., Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – T. 97. – №. 12. – C. 6640-6645.
- 84.** Decker E. A., Ivanov V., Zhu B. Z., Frei, B. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by carnosine and histidine //Journal of agricultural and food chemistry. – 2001. – T. 49. – №. 1. – C. 511-516.
- 85.** Derave W., Everaert I., Beeckman S., Baguet, A. Muscle carnosine metabolism and β -alanine supplementation in relation to exercise and training //Sports medicine. – 2010. – T. 40. – №. 3. – C. 247-263.

- 86.** DiNicolantonio J. J., McCarty M. F., O'Keefe J. H. Role of dietary histidine in the prevention of obesity and metabolic syndrome //Open Heart. – 2018. – T. 5. – №. 2. – C. e000676.
- 87.** Dougherty M. J., Boyd J. M., Downs D. M. Inhibition of fructose-1, 6-bisphosphatase by aminoimidazole carboxamide ribotide prevents growth of *Salmonella enterica* purH mutants on glycerol //Journal of Biological Chemistry. – 2006. – T. 281. – №. 45. – C. 33892-33899.
- 88.** Ellison D. W., McCleary W. R. The unphosphorylated receiver domain of PhoB silences the activity of its output domain //Journal of Bacteriology. – 2000. – T. 182. – №. 23. – C. 6592-6597.
- 89.** Ernster L., Lindberg O. Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analysis //Methods of biochemical analysis. – 1956. – T. 3. – C. 1-22.
- 90.** Feng J., Zhao T., Zhang Y., Ma Y., Jiang, Y. Differences in aqueous concentrations of cytokines in macular edema secondary to branch and central retinal vein occlusion //PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 7. – C. e68149.
- 91.** Fredrick K., Ibba M. The ABCs of the ribosome //Nature structural & molecular biology. – 2014. – T. 21. – №. 2. – C. 115-116.
- 92.** Fresta C. G., Fidilio A., Lazzarino G., Musso N., Grasso M., Merlo S., Amorini A. M., Bucolo C., Tavazzi B., Lazzarino G., Lunte S. M., Caraci F., Caruso, G. Modulation of pro-oxidant and pro-inflammatory activities of m1 macrophages by the natural dipeptide carnosine //International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 21. – №. 3. – C. 776.
- 93.** Frey A. D., Farrés J., Bollinger C. J., Kallio, P. T. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli* //Applied and environmental microbiology. – 2002. – T. 68. – №. 10. – C. 4835-4840.
- 94.** Futai M. Orientation of membrane vesicles from *Escherichia coli* prepared by different procedures //The Journal of membrane biology. – 1974. – T. 15. – №. 1. – C. 15-28.
- 95.** Gaidhu M. P., Fediuc S., Anthony N. M., So M., Mirpourian M., Perry R. L., Ceddia R. B. Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL //Journal of lipid research. – 2009. – T. 50. – №. 4. – C. 704-715.
- 96.** García-Contreras R., Celis H., Romero I. Importance of *Rhodospirillum rubrum* H⁺-pyrophosphatase under low-energy conditions //Journal of bacteriology. – 2004. – T. 186. – №. 19. – C. 6651-6655.
- 97.** Gardner S. G., Miller J. B., Dean T., Robinson T., Erickson M., Ridge P. G., McCleary W. R. Genetic analysis, structural modeling, and direct coupling analysis suggest a mechanism for phosphate signaling in *Escherichia coli* //BMC genetics. – 2015. – T. 16. – №. 2. – C. 1-11.

- 98.** Gaxiola R. A., Li J., Undurraga S., Dang L. M., Allen G. J., Alper S. L., Fink G. R. Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98. – №. 20. – C. 11444-11449.
- 99.** Gaxiola R. A., Palmgren M. G., Schumacher K. Plant proton pumps //FEBS letters. – 2007. – T. 581. – №. 12. – C. 2204-2214.
- 100.** Gibbs N. K., Tye J., Norval M. Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology //Photochemical & photobiological sciences. – 2008. – T. 7. – №. 6. – C. 655-667.
- 101.** Gotoh K., Masaki T., Chiba S., Higuchi K., Kakuma T., Shimizu H., Mori M., Sakata T., Yoshimatsu H. Hypothalamic neuronal histamine signaling in the estrogen deficiency- induced obesity //Journal of neurochemistry. – 2009. – T. 110. – №. 6. – C. 1796-1805.
- 102.** Guo H., Suzuki T., Rubinstein J. L. Structure of a bacterial ATP synthase //Elife. – 2019. – T. 8. – C. e43128.
- 103.** Hainonen P., Baykov A. A., Goldman A., Lahti R., Cooperman B. S. Single-turnover kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* inorganic pyrophosphatase //Biochemistry. – 2002. – T. 41. – №. 40. – C. 12025-12031.
- 104.** Hakulinen J. K., Klyszejko A. L., Hoffmann J., Eckhardt-Strelau L., Brutschy B., Vonck J., Meier, T. Structural study on the architecture of the bacterial ATP synthase Fo motor //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – T. 109. – №. 30. – C. E2050-E2056.
- 105.** Haldimann A., Wanner B. L. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria //Journal of bacteriology. – 2001. – T. 183. – №. 21. – C. 6384-6393.
- 106.** Hara K. Y., Kondo A. ATP regulation in bioproduction //Microbial cell factories. – 2015. – T. 14. – №. 1. – C. 1-9.
- 107.** Harada K. Asymmetric Synthesis of α -Amino-acids by the Strecker Synthesis //Nature. – 1963. – T. 200. – №. 4912. – C. 1201-1201.
- 108.** Hardie D. G., Carling D., Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? //Annual review of biochemistry. – 1998. – T. 67. – №. 1. – C. 821-855.
- 109.** Hardie D. G., Salt I. P., Hawley S. A., Davies S. P. AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge //Biochemical Journal. – 1999. – T. 338. – №. 3. – C. 717-722.
- 110.** Harris R. M., Webb D. C., Howitt S. M., Cox G. B. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli* //Journal of bacteriology. – 2001. – T. 183. – №. 17. – C. 5008-5014.

- 111.** Hayashi S., Koch J. P., Lin E. C. C. Active transport of L- α -glycerophosphate in *Escherichia coli* //Journal of Biological Chemistry. – 1964. – T. 239. – №. 9. – C. 3098-3105.
- 112.** He B., Choi K. Y., Zalkin H. Regulation of *Escherichia coli* *glnB*, *prsA*, and *speA* by the purine repressor //Journal of bacteriology. – 1993. – T. 175. – №. 11. – C. 3598-3606.
- 113.** Heikinheimo P., Pohjanjoki P., Helminen A., Tasanen M., Cooperman B. S., Goldman A., Baykov A., Lahti R. A Site- Directed Mutagenesis Study of *Saccharomyces cerevisiae* Pyrophosphatase: Functional Conservation of the Active Site of Soluble Inorganic Pyrophosphatases //European journal of biochemistry. – 1996. – T. 239. – №. 1. – C. 138-143.
- 114.** Heikinheimo P., Tuominen V., Ahonen A. K., Teplyakov A., Cooperman B. S., Baykov A. A., Lahti R., Goldman A. Toward a quantum-mechanical description of metal-assisted phosphoryl transfer in pyrophosphatase //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98. – №. 6. – C. 3121-3126.
- 115.** Heinonen J. K., Lahti R. J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase //Analytical biochemistry. – 1981. – T. 113. – №. 2. – C. 313-317.
- 116.** Henriksen C. M., Nielsen J., Villadsen J. Influence of the dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady-state cultures of *Penicillium chrysogenum* //Biotechnology progress. – 1997. – T. 13. – №. 6. – C. 776-782.
- 117.** Heppel L. A., Harkness D. R., Hilmoe R. J. A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli* //J Biol Chem. – 1962. – T. 237. – C. 841-846.
- 118.** Herrero M., De Lorenzo V., Timmis K. N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria //Journal of bacteriology. – 1990. – T. 172. – №. 11. – C. 6557-6567.
- 119.** Heuser F., Schroer K., Lütz S., Bringer- Meyer S., Sahm H. Enhancement of the NAD (P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation //Engineering in Life Sciences. – 2007. – T. 7. – №. 4. – C. 343-353.
- 120.** Holeček M. Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement //Nutrients. – 2020. – T. 12. – №. 3. – C. 848.
- 121.** Hook C. D., Samsonov V. V., Ublinskaya A. A., Kuvaeva T. M., Andreeva E. V., Gorbacheva L. Y., Stoyanova N. V. A novel approach for *Escherichia coli* genome editing combining in vivo cloning and targeted long-length chromosomal insertion //Journal of microbiological methods. – 2016. – T. 130. – C. 83-91.
- 122.** Hsieh Y. J., Wanner B. L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system //Current opinion in microbiology. – 2010. – T. 13. – №. 2. – C. 198-203.
- 123.** Huang P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome //Disease models & mechanisms. – 2009. – T. 2. – №. 5-6. – C. 231-237.

- 124.** Hulett F. M. The signal- transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis* //Molecular microbiology. – 1996. – T. 19. – №. 5. – C. 933-939.
- 125.** Ikeda M. Amino acid production processes //Microbial production of l-amino acids. – 2003. – C. 1-35.
- 126.** Il'Chenko N. I., Pyatnitskii Y. I., Pavlenko N. V. Catalytic properties of the carbides of transition metals in oxidation reactions //Theoretical and Experimental Chemistry. – 1998. – T. 34. – №. 5. – C. 239-256.
- 127.** Ingledew W. J., Poole R. K. The respiratory chains of *Escherichia coli* //Microbiological reviews. – 1984. – T. 48. – №. 3. – C. 222-271.
- 128.** Jackson R. J., Binet M. R., Lee L. J., Ma R., Graham A. I., McLeod C. W., Poole R. K. Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels //FEMS microbiology letters. – 2008. – T. 289. – №. 2. – C. 219-224.
- 129.** Johnson M. S., Taylor B. L. Comparison of methods for specific depletion of ATP in *Salmonella typhimurium* //Applied and environmental microbiology. – 1993. – T. 59. – №. 10. – C. 3509-3512.
- 130.** Johnston H. M., Roth J. R. Histidine mutants requiring adenine: selection of mutants with reduced *hisG* expression in *Salmonella typhimurium* //Genetics. – 1979. – T. 92. – №. 1. – C. 1-15.
- 131.** Johnston H. M., Barnes W. M., Chumley F. G., Bossi L., Roth J. R. Model for regulation of the histidine operon of *Salmonella* //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1980. – T. 77. – №. 1. – C. 508-512.
- 132.** Jones C. P., Ferré-D'Amaré A. R. Recognition of the bacterial alarmone ZMP through long-distance association of two RNA subdomains //Nature structural & molecular biology. – 2015. – T. 22. – №. 9. – C. 679-685.
- 133.** Josse J., Wong S. C. K. 20 Inorganic Pyrophosphatase of *Escherichia coli* //The enzymes. – Academic Press, 1971. – T. 4. – C. 499-527.
- 134.** Kajander T., Kellosalo J., Goldman A. Inorganic pyrophosphatases: one substrate, three mechanisms //FEBS letters. – 2013. – T. 587. – №. 13. – C. 1863-1869.
- 135.** Kanarek N., Keys H. R., Cantor J. R., Lewis C. A., Chan S. H., Kunchok T., Abu-Remaileh M., Freinkman E., Lawrence D., Schweitzer L. D., Sabatini D. M. Histidine catabolism is a major determinant of methotrexate sensitivity //Nature. – 2018. – T. 559. – №. 7715. – C. 632-636.
- 136.** Kasahara, M., Anraku, Y. Succinate-and NADH Oxidase Systems of *Escherichia coli* Membrane Vesicles Mechanism of Selective Inhibition of the Systems by Zinc Ions //The journal of Biochemistry. – 1974. – T. 76. – №. 5. – C. 967-976.
- 137.** Kasimoglu E., Park S. J., Malek J., Tseng C. P., Gunsalus R. P. Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (*atpIBEFHAGDC*) operon of *Escherichia coli*: control by cell growth rate //Journal of bacteriology. – 1996. – T. 178. – №. 19. – C. 5563-5567.

- 138.** Katashkina J. I., Skorokhodova A. Y., Zimenkov D. V., Gulevich A. Y., Minaeva N. I., Doroshenko V. G., Biryukova I. V., Mashko S. V. Tuning the expression level of a gene located on a bacterial chromosome //Molecular Biology. – 2005. – T. 39. – №. 5. – C. 719-726.
- 139.** Kellosalo J., Kajander T., Honkanen R., Goldman A. Crystallization and preliminary X-ray analysis of membrane-bound pyrophosphatases //Molecular Membrane Biology. – 2013. – T. 30. – №. 1. – C. 64-74.
- 140.** Kellosalo J., Kajander T., Kogan K., Pokharel K., Goldman A. The structure and catalytic cycle of a sodium-pumping pyrophosphatase //Science. – 2012. – T. 337. – №. 6093. – C. 473-476.
- 141.** Kerscher S., Dröse S., Zickermann V., Brandt U. The three families of respiratory NADH dehydrogenases //Bioenergetics. – 2007. – C. 185-222.
- 142.** Kezic S., Kammeyer A., Calkoen F., Fluhr J. W., Bos J. D. Natural moisturizing factor components in the stratum corneum as biomarkers of filaggrin genotype: evaluation of minimally invasive methods //British journal of dermatology. – 2009. – T. 161. – №. 5. – C. 1098-1104.
- 143.** Kim H. J., Kwon Y. D., Lee S. Y., Kim P. An engineered Escherichia coli having a high intracellular level of ATP and enhanced recombinant protein production //Applied microbiology and biotechnology. – 2012. – T. 94. – №. 4. – C. 1079-1086.
- 144.** Kim P. B., Nelson J. W., Breaker R. R. An ancient riboswitch class in bacteria regulates purine biosynthesis and one-carbon metabolism //Molecular cell. – 2015. – T. 57. – №. 2. – C. 317-328.
- 145.** King Z., Feist A., Desplats C., Beyly A., Cuiñé S., Bernard L., Cournac L., Peltier G., Archer C., Elliott T., Minagawa J., Mogi T., Gennis R., Anraku Y., Ingledew W., Poole R., Kasahara M., Anraku Y., Kracke F., Vassilev I., Krömer J., Unden G., Steinmetz P., Degreif-Dünnwald P., Bongaerts J., Price C. and Driessen A. The respiratory chains of Escherichia coli //Ind. Biotechnol. – 2013. – T. 6. – C. 748–766.
- 146.** Kisumi M., Komatsubara S., Sugiura M., Takagi T., Demain A. L. Transductional construction of amino acid-hyperproducing strains of Serratia marcescens //Critical reviews in biotechnology. – 1987. – T. 6. – №. 3. – C. 233-252.
- 147.** Kisumi M., Nakanishi N., Takagi T., Chibata I. L-Histidine production by histidase-less regulatory mutants of Serratia marcescens constructed by transduction //Applied and environmental microbiology. – 1977. – T. 34. – №. 5. – C. 465-472.
- 148.** Kline, E. L. New amino acid regulatory locus having unusual properties in heterozygous merodiploids //Journal of Bacteriology. – 1972. – T. 110. – №. 3. – C. 1127-1134.
- 149.** Klyachko E., Shakulov R., Kozlov, Y. (2004a). Mutant phosphoribosylpyrophosphate synthetase and method for producing L-histidine. US Patent 10984821 (10.11.2004).

- 150.** Klyachko E.V., Shakulov R S., Kozlov, Y.I. (2004b). Process for producing L-histidine with the use of bacterium belonging to Enterobacteriaceae. EP 1647593 (16.07.2004).
- 151.** Knowles J. R. Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions //Annual review of biochemistry. – 1980. – T. 49. – №. 1. – C. 877-919.
- 152.** Kopple, J. D., Swendseid, M. E. Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man //The Journal of clinical investigation. – 1975. – T. 55. – №. 5. – C. 881-891.
- 153.** Kracke F., Vassilev I., Krömer J. O. Microbial electron transport and energy conservation—the foundation for optimizing bioelectrochemical systems //Frontiers in microbiology. – 2015. – T. 6. – C. 575.
- 154.** Krömer S., Heldt H. W. Respiration of pea leaf mitochondria and redox transfer between the mitochondrial and extramitochondrial compartment //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1991. – T. 1057. – №. 1. – C. 42-50.
- 155.** Kukko E., Heinonen J. The intracellular concentration of pyrophosphate in the batch culture of Escherichia coli //European Journal of Biochemistry. – 1982. – T. 127. – №. 2. – C. 347-349.
- 156.** Kulis- Horn R. K., Persicke M., Kalinowski J. Histidine biosynthesis, its regulation and biotechnological application in *Corynebacterium glutamicum* //Microbial biotechnology. – 2014. – T. 7. – №. 1. – C. 5-25.
- 157.** Kunitz M. Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from baker's yeast //The Journal of General Physiology. – 1952. – T. 35. – №. 3. – C. 423-450.
- 158.** Kuramitsu H. K., Udaka S., Moyed H. S. Induction of Inosine 5'-Phosphate Dehydrogenase and Xanthosine 5'-Phosphate Aminase by Ribosyl-4-amino-5-imidazolecarboxamide in Purine-requiring Mutants of Escherichia coli B //Journal of Biological Chemistry. – 1964. – T. 239. – №. 10. – C. 3425-3430.
- 159.** Kwon K. J., Kim H. J., Shin C. Y., Han S. H. Melatonin potentiates the neuroprotective properties of resveratrol against beta-amyloid-induced neurodegeneration by modulating AMP-activated protein kinase pathways //Journal of clinical neurology. – 2010. – T. 6. – №. 3. – C. 127-137.
- 160.** Kwon Y. D., Lee S. Y., Kim P. A physiology study of Escherichia coli overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2008. – T. 72. – №. 4. – C. 1138-1141.
- 161.** Lagoni O. R., von Meyenburg K., Michelsen O. Limited differential mRNA inactivation in the atp (unc) operon of Escherichia coli //Journal of bacteriology. – 1993. – T. 175. – №. 18. – C. 5791-5797.
- 162.** Lahti R. Microbial inorganic pyrophosphatases //Microbiological reviews. – 1983. – T. 47. – №. 2. – C. 169-178.
- 163.** Laming E. M. Investigating the proton-translocating subunit of the rotary A-type ATPase : дис. – Victor Chang Cardiac Research Institute & UNSW Australia, 2016.

- 164.** Lane N., Martin W. The energetics of genome complexity //Nature. – 2010. – T. 467. – №. 7318. – C. 929-934.
- 165.** Lee J. W., Miyawaki H., Bobst E. V., Hester J. D., Ashraf M., Bobst A. M. Improved functional recovery of ischemic rat hearts due to singlet oxygen scavengers histidine and carnosine //Journal of molecular and cellular cardiology. – 1999. – T. 31. – №. 1. – C. 113-121.
- 166.** Li L. I., Zhang X. H., Guang-Rong L. I. U., Chang L. I. U., Yin-Mao D. O. N. G. Isoquercitrin suppresses the expression of histamine and pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF- κ B in human KU812 cells //Chinese journal of natural medicines. – 2016. – T. 14. – №. 6. – C. 407-412.
- 167.** Li X. T., Thomason L. C., Sawitzke J. A., Costantino N., Court D. L. Positive and negative selection using the tetA-sacB cassette: recombineering and P1 transduction in Escherichia coli //Nucleic acids research. – 2013. – T. 41. – №. 22. – C. e204-e204.
- 168.** Li Y., Chen J., Mao Y. Y., Lun S. Y., Koo Y. M. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant Escherichia coli //Process Biochemistry. – 1998. – T. 33. – №. 7. – C. 709-714.
- 169.** Li Y., Hugenholtz J., Chen J., Lun S. Y. Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy //Applied microbiology and biotechnology. – 2002. – T. 60. – №. 1. – C. 101-106.
- 170.** Lin S. M., Tsai J. Y., Hsiao C. D., Huang Y. T., Chiu C. L., Liu M. H., Tung L.Y., Liu T.H, Pan R. L., Sun Y. J. Crystal structure of a membrane-embedded H⁺-translocating pyrophosphatase //Nature. – 2012. – T. 484. – №. 7394. – C. 399-403.
- 171.** Link A. J., Robison K., Church G. M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Escherichia coli K- 12 //Electrophoresis. – 1997. – T. 18. – №. 8. – C. 1259-1313.
- 172.** Liu L., Li Y., Shi Z., Du G., Chen J. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: increase of NAD⁺ availability //Journal of biotechnology. – 2006. – T. 126. – №. 2. – C. 173-185.
- 173.** Lohkamp B., McDermott G., Campbell S. A., Coggins J. R., Laphorn A. J. The structure of Escherichia coli ATP-phosphoribosyltransferase: identification of substrate binding sites and mode of AMP inhibition //Journal of molecular biology. – 2004. – T. 336. – №. 1. – C. 131-144.
- 174.** Luoto, H. H., Baykov, A. A., Lahti, R. and Malinen, A. M. (2013). Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both Na⁺ and H⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), 1255-1260.
- 175.** Lv S., Jiang P., Tai F., Wang D., Feng J., Fan P., BaomH., Li Y. Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both Na⁺ and H⁺ //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – T. 110. – №. 4. – C. 1255-1260.
- 176.** Maeshima M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2000. – T. 1465. – №. 1-2. – C. 37-51.

- 177.** Makino K., Amemura M., Kawamoto T., Kimura S., Shinagawa H., Nakata A., Suzuki M. DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase //Journal of molecular biology. – 1996. – T. 259. – №. 1. – C. 15-26.
- 178.** Makino K., Shinagawa H., Amemura M., Kawamoto T., Yamada M., Nakata A. Signal transduction in the phosphate regulon of Escherichia coli involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins //Journal of molecular biology. – 1989. – T. 210. – №. 3. – C. 551-559.
- 179.** Makino K., Shinagawa H., Amemura M., Kimura S., Nakata A., Ishihama A. Regulation of the phosphate regulon of Escherichia coli: activation of pstS transcription by PhoB protein in vitro //Journal of molecular biology. – 1988. – T. 203. – №. 1. – C. 85-95.
- 180.** Malamy M., Horecker B. L. The localization of alkaline phosphatase in E., coli K12 //Biochemical and biophysical research communications. – 1961. – T. 5. – №. 2. – C. 104-108.
- 181.** Malinen A. M., Belogurov G. A., Baykov A. A., Lahti R. Na⁺-pyrophosphatase: a novel primary sodium pump //Biochemistry. – 2007. – T. 46. – №. 30. – C. 8872-8878.
- 182.** Maloney P. C. The vital force; a study of bioenergetics //Science. – 1986. – T. 234. – C. 768-769.
- 183.** Martínez de la Fuente Martínez I. A. et al. On the Dynamics of the Adenylate Energy System: Homeorhesis vs Homeostasis. – 2014.
- 184.** McIntosh M. T., Vaidya A. B. Vacuolar type H⁺ pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa //International journal for parasitology. – 2002. – T. 32. – №. 1. – C. 1-14.
- 185.** Mehta P., McAuley D. F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R. S., Manson J. J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression //The lancet. – 2020. – T. 395. – №. 10229. – C. 1033-1034.
- 186.** Melo A. M. P., Bandejas T. M., Teixeira M. New insights into type II NAD (P) H: quinone oxidoreductases //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2004. – T. 68. – №. 4. – C. 603-616.
- 187.** Miller J. H. Experiments in Molecular Genetics. – 1972.
- 188.** Milov A. D., Samoiloa R. I., Tsvetkov Y. D., De Zotti M., Formaggio F., Toniolo C., Handgraaf J. W., Raap J. Structure of self-aggregated alamethicin in ePC membranes detected by pulsed electron-electron double resonance and electron spin echo envelope modulation spectroscopies //Biophysical Journal. – 2009. – T. 96. – №. 8. – C. 3197-3209.
- 189.** Mimura H., Nakanishi Y., Hirono M., Maeshima M. Membrane topology of the H⁺-pyrophosphatase of Streptomyces coelicolor determined by cysteine-scanning mutagenesis //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279. – №. 33. – C. 35106-35112.
- 190.** Minaeva N. I., Gak E. R., Zimenkov D. V., Skorokhodova A. Y., Biryukova I. V., Mashko S. V. Dual-In/Out strategy for genes integration into bacterial chromosome: a novel approach to step-by-step construction of plasmid-less marker-less recombinant E.

coli strains with predesigned genome structure //BMC biotechnology. – 2008. – T. 8. – №. 1. – C. 1-11.

191. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism //Nature. – 1961. – T. 191. – №. 4784. – C. 144-148.

192. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. – 1966.

193. Mittelstädt G., Jiao W., Livingstone E. K., Moggré G. J., Nazmi A. R., Parker E. J. A dimeric catalytic core relates the short and long forms of ATP-phosphoribosyltransferase //Biochemical Journal. – 2018. – T. 475. – №. 1. – C. 247-260.

194. Mizukami T., Hamu A., Ikeda M., Oka T., Katsumata R. Cloning of the ATP phosphoribosyl transferase gene of *Corynebacterium glutamicum* and application of the gene to L-histidine production //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 1994. – T. 58. – №. 4. – C. 635-638.

195. Morton D. P., Parsons S. M. Inhibition of ATP phosphoribosyltransferase by AMP and ADP in the absence and presence of histidine //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1977a. – T. 181. – №. 2. – C. 643-648.

196. Morton D. P., Parsons S. M. Synergistic inhibition of ATP phosphoribosyltransferase by guanosine tetraphosphate and histidine //Biochemical and biophysical research communications. – 1977b. – T. 74. – №. 1. – C. 172-177.

197. Moyed H. S., Magasanik B. The biosynthesis of the imidazole ring of histidine //Journal of Biological Chemistry. – 1960. – T. 235. – №. 1. – C. 149-153.

198. Myers R. S., Amaron R. E., Luthey-Schulten Z. A., Davisson V. J. Reaction coupling through interdomain contacts in imidazole glycerol phosphate synthase //Biochemistry. – 2005. – T. 44. – №. 36. – C. 11974-11985.

199. Nakamoto R. K., Scanlon J. A. B., Al-Shawi M. K. The rotary mechanism of the ATP synthase //Archives of biochemistry and biophysics. – 2008. – T. 476. – №. 1. – C. 43-50.

200. Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger principles of biochemistry lecture notebook. – Macmillan, 2004.

201. Noda S. et al. Alterations of cellular physiology in *Escherichia coli* in response to oxidative phosphorylation impaired by defective F1-ATPase //Journal of bacteriology. – 2006. – T. 188. – №. 19. – C. 6869-6876.

202. Oksanen E., Ahonen A. K., Tuominen H., Tuominen V., Lahti R., Goldman A., Heikinheimo P. A complete structural description of the catalytic cycle of yeast pyrophosphatase //Biochemistry. – 2007. – T. 46. – №. 5. – C. 1228-1239.

203. Papp-Wallace K. M., Maguire M. E. Magnesium transport and magnesium homeostasis //EcoSal Plus. – 2008. – T. 3. – №. 1.

204. Parsons M. E., Ganellin C. R. Histamine and its receptors //British journal of pharmacology. – 2006. – T. 147. – №. S1. – C. S127-S135.

- 205.** Pedreño S., Pisco J. P., Larrouy-Maumus G., Kelly G., de Carvalho L. P. S. Mechanism of feedback allosteric inhibition of ATP phosphoribosyltransferase //Biochemistry. – 2012. – T. 51. – №. 40. – C. 8027-8038.
- 206.** Pelicic V., Reyrat J. M., Gicquel B. Expression of the Bacillus subtilis sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria //Journal of bacteriology. – 1996. – T. 178. – №. 4. – C. 1197-1199.
- 207.** Pinson B., Vaur S., Sagot I., Couplier F., Lemoine S., Daignan-Fornier B. Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways //Genes & Development. – 2009. – T. 23. – №. 12. – C. 1399-1407.
- 208.** Pogell B. M., Maity B. R., Frumkin S., Shapiro S. Induction of an active transport system for glucose 6-phosphate in Escherichia coli //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1966. – T. 116. – C. 406-415.
- 209.** Pohjanjoki P., Fabrichniy I. P., Kash, V. N., Cooperman B. S., Goldman A., Baykov A. A., Lahti R. Probing essential water in yeast pyrophosphatase by directed mutagenesis and fluoride inhibition measurements //Journal of Biological Chemistry. – 2001. – T. 276. – №. 1. – C. 434-441.
- 210.** Pold R., Jensen L. S., Jessen N., Buhl E. S., Schmitz O., Flyvbjerg A., Fujii N., Goodyear L. J., Gotfredsen C. F., Brand C. L., Lund S. Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats //diabetes. – 2005. – T. 54. – №. 4. – C. 928-934.
- 211.** Pons F. W., Neubert U., Müller P. Evidence for frameshift mutations in the hisH gene of Escherichia coli causing synthesis of a partially active glutamine amidotransferase //Genetics. – 1988. – T. 120. – №. 3. – C. 657-665.
- 212.** Price C. E., Driessen A. J. M. Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in Escherichia coli //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2010. – T. 1803. – №. 6. – C. 748-766.
- 213.** Prokopieva V. D., Yarygina E. G., BokhanN. A., Ivanova S. A. Use of carnosine for oxidative stress reduction in different pathologies //Oxidative medicine and cellular longevity. – 2016. – T. 2016.
- 214.** Prossliner T., Skovbo Winther K., Sørensen M. A., Gerdes K. Ribosome hibernation //Annual review of genetics. – 2018. – T. 52. – C. 321-348.
- 215.** Prüss B. M., Nelms J. M., Park C., Wolfe A. J. Mutations in NADH: ubiquinone oxidoreductase of Escherichia coli affect growth on mixed amino acids //Journal of Bacteriology. – 1994. – T. 176. – №. 8. – C. 2143-2150.
- 216.** Quax T. E., Claassens N. J., Söll D., van der Oost J. Codon bias as a means to fine-tune gene expression //Molecular cell. – 2015. – T. 59. – №. 2. – C. 149-161.
- 217.** Rao F., Yang J., Gong C., Huang R., Wang Q., Shen J. Systematic review of preservation solutions for allografts for liver transplantation based on a network meta-analysis //International Journal of Surgery. – 2018. – T. 54. – C. 1-6.

- 218.** Rébora K., Laloo B., Daignan-Fornier B. Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule //Genetics. – 2005. – T. 170. – №. 1. – C. 61-70.
- 219.** Ren A., Rajashankar K. R., Patel D. J. Global RNA fold and molecular recognition for a pfl riboswitch bound to ZMP, a master regulator of one-carbon metabolism //Structure. – 2015. – T. 23. – №. 8. – C. 1375-1381.
- 220.** Russell J. B., Cook G. M. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions //Microbiological reviews. – 1995. – T. 59. – №. 1. – C. 48-62.
- 221.** Rutter G. A., da Silva Xavier G., Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis //Biochemical Journal. – 2003. – T. 375. – №. 1. – C. 1-16.
- 222.** Salminen T., Kaepylae J., Heikinheimo P., Kankare J., Goldman A., Heinonen J., Baykov A. A., Cooperman B. S., Lahti, R. Structure and function analysis of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase: is a hydroxide ion the key to catalysis? //Biochemistry. – 1995. – T. 34. – №. 3. – C. 782-791.
- 223.** Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual/Joseph Sambrook, David W. Russell. – 2001.
- 224.** Samygina V. R., Popov A. N., Rodina E. V., Vorobyeva N. N., Lamzin V. S., Polyakov K. M., Kurilova S. A., Nazarova T. I., Avaeva S. M. The structures of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase complexed with Ca²⁺ or CaPPi at atomic resolution and their mechanistic implications //Journal of molecular biology. – 2001. – T. 314. – №. 3. – C. 633-645.
- 225.** Sano K., Tsuchida, T. Method for producing L-histidine by fermentation. US Patent 4,388,405 (06.12.1980).
- 226.** Sasahara I., Fujimura N., Nozawa Y., Furuhashi Y., Sato H. The effect of histidine on mental fatigue and cognitive performance in subjects with high fatigue and sleep disruption scores //Physiology & behavior. – 2015. – T. 147. – C. 238-244.
- 227.** Sastry A. V., Gao Y., Szubin R., Hefner Y., Xu S., Kim D., K. S. Choudhary, L. Yang, Z. A. King, Palsson B. O. The *Escherichia coli* transcriptome mostly consists of independently regulated modules //Nature communications. – 2019. – T. 10. – №. 1. – C. 1-14.
- 228.** Sazanov L. A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I //Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2015. – T. 16. – №. 6. – C. 375-388.
- 229.** Sazanov L. A., Hinchliffe P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus* //science. – 2006.
- 230.** Schmid R., Gerloff D. L. Functional properties of the alternative NADH: ubiquinone oxidoreductase from *E. coli* through comparative 3-D modelling //FEBS letters. – 2004. – T. 578. – №. 1-2. – C. 163-168.

- 231.** Schultz A., Baltscheffsky M. Properties of mutated *Rhodospirillum rubrum* H⁺-pyrophosphatase expressed in *Escherichia coli* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2003. – T. 1607. – №. 2-3. – C. 141-151.
- 232.** Schwentner A., Feith A., Münch E., Stiefelmaier J., Lauer I., Favilli L., Massner C., Johannes Öhrlein J., Grund B., Hüser A., Takors R., Blombach B. Modular systems metabolic engineering enables balancing of relevant pathways for l-histidine production with *Corynebacterium glutamicum* // *Biotechnology for biofuels*. – 2019. – T. 12. – №. 1. – C. 1-21.
- 233.** Scott I. R., Harding C. R., Barrett J. G. Histidine-rich protein of the keratohyalin granules: source of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 1982. – T. 719. – №. 1. – C. 110-117.
- 234.** Sengupta T. K., Leclerc G. M., Hsieh-Kinser T. T., Leclerc G. J., Singh I., Barredo J. C. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy // *Molecular cancer*. – 2007. – T. 6. – №. 1. – C. 1-12.
- 235.** Senior A. E., Nadanaciva S., Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2002. – T. 1553. – №. 3. – C. 188-211.
- 236.** Serganov A., Patel D. J. Metabolite recognition principles and molecular mechanisms underlying riboswitch function // *Annual review of biophysics*. – 2012. – T. 41. – C. 343-370.
- 237.** Serrano A., Pérez- Castiñeira J. R., Baltscheffsky M., Baltscheffsky H. H⁺- PPases: yesterday, today and tomorrow // *IUBMB life*. – 2007. – T. 59. – №. 2. – C. 76-83.
- 238.** Seufferheld M., Lea C. R., Vieira M., Oldfield E., Docampo R. The H⁺-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T. 279. – №. 49. – C. 51193-51202.
- 239.** Seufferheld M., Vieira M. C., Ruiz F. A., Rodrigues C. O., Moreno S. N., Docampo R. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278. – №. 32. – C. 29971-29978.
- 240.** Shao X., Zhang W., Umar M. I., Wong H. Y., Seng Z., Xie Y., Zhang Y., Yang L., Kwok C. K., Deng X. RNA G-quadruplex structures mediate gene regulation in bacteria // *MBio*. – 2020. – T. 11. – №. 1. – C. e02926-19.
- 241.** Shedlovsky A. E., Magasanik B. The enzymatic basis of an adenine-histidine relationship in *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1962a. – T. 237. – №. 12. – C. 3731-3736.

- 242.** Shedlovsky A. E., Magasanik B. A defect in histidine biosynthesis causing an adenine deficiency //Journal of Biological Chemistry. – 1962b. – T. 237. – №. 12. – C. 3725-3730.
- 243.** Sheff M. A., Thorn K. S. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae* //Yeast. – 2004. – T. 21. – №. 8. – C. 661-670.
- 244.** Shibasaki M., Kanai M. Asymmetric synthesis of tertiary alcohols and α -tertiary amines via Cu-Catalyzed C–C bond formation to ketones and ketimines //Chemical reviews. – 2008. – T. 108. – №. 8. – C. 2853-2873.
- 245.** Skorokhodova A. Y., Katashkina Z. I., Zimenkov D. V., Smirnov S. V., Gulevich A. Y., Biriukova I. V., Mashko S. V. Design and Study on Characteristics of Auto- and Smoothly Regulated Genetic Element O3/PlacUV5/Olac \rightarrow lacI //Biotechnology in Russia. – 2004. – №. 5. – C. 1-27.
- 246.** Smolik S., Nogaj P., Szpakowska A., Lodowska J., Weglarz L. The role of amino acids supplementation of protective Na₂H₂EDTA containing ointments in chelation of allergenic metal ions //Acta poloniae pharmaceutica. – 2010. – T. 67. – №. 6. – C. 737-740.
- 247.** Sousa P. M., Videira M. A., Bohn A., Hood B. L., Conrads T. P., Goulao L. F., Melo A. M. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*: from genes to supercomplexes //Microbiology. – 2012. – T. 158. – №. 9. – C. 2408-2418.
- 248.** Sprague G. F., Bell R. M., Cronan J. E. A mutant of *Escherichia coli* auxotrophic for organic phosphates: evidence for two defects in inorganic phosphate transport //Molecular and General Genetics MGG. – 1975. – T. 143. – №. 1. – C. 71-77.
- 249.** Stephanopoulos G., Aristidou A. A., Nielsen J. Metabolic engineering: principles and methodologies. – 1998.
- 250.** Stincone A., Prigione A., Cramer T., Wamelink M. M. C., Campbell K., Cheung E., Olin-Sandoval V. Grüning NM, Krüger A., Tauqeer A. M., Keller M.A., Breitenbach M., Brindle K.M., Rabinowitz J.D., Ralser M. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway //Biological Reviews. – 2015. – T. 90. – №. 3. – C. 927-963.
- 251.** Studier F. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes //Methods Enzymol. – 1990. – T. 185. – C. 60-89.
- 252.** Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes //Journal of molecular biology. – 1986. – T. 189. – №. 1. – C. 113-130.
- 253.** Sugiura M., Kisumi M. Stabilization of a histidine-producing strain of *Serratia marcescens* //Applied and environmental microbiology. – 1984. – T. 48. – №. 1. – C. 43-47.
- 254.** Sun X., Feng R., Li Y., Lin S., Zhang W., Li Y., Sun C., Li S. Histidine supplementation alleviates inflammation in the adipose tissue of high-fat diet-induced

obese rats via the NF- κ B-and PPAR γ -involved pathways //British journal of nutrition. – 2014. – T. 112. – №. 4. – C. 477-485.

255. Suzuki Y., Nakao T., Maemura H., Sato M., Kamahara K., Morimatsu F., Takamatsu K. Carnosine and anserine ingestion enhances contribution of nonbicarbonate buffering //Medicine and science in sports and exercise. – 2006. – T. 38. – №. 2. – C. 334.

256. Swedes J. S., Sedo R. J., Atkinson D. E. Relation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine-requiring mutant of Escherichia coli //Journal of Biological Chemistry. – 1975. – T. 250. – №. 17. – C. 6930-6938.

257. Swinnen J. V., Beckers A., Brusselmans K., Organe S., Segers J., Timmermans L., Vanderhoydonc F., Deboel L., Derua R., Waelkens E., De Schrijver E., Van de Sande T., Noël A., Foufelle F., Verhoeven G. Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype //Cancer research. – 2005. – T. 65. – №. 6. – C. 2441-2448.

258. Szcześniak D., Budzeń S., Kopeć W., Rymaszewska J. Anserine and carnosine supplementation in the elderly: Effects on cognitive functioning and physical capacity //Archives of Gerontology and Geriatrics. – 2014. – T. 59. – №. 2. – C. 485-490.

259. Tabor S. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system //Current protocols in molecular biology. – 1990. – T. 11. – №. 1. – C. 16.2. 1-16.2. 11.

260. Tan S. P., Brown S. B., Griffiths C. E., Weller R. B., Gibbs N. K. Feeding filaggrin: effects of l-histidine supplementation in atopic dermatitis //Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology. – 2017. – T. 10. – C. 403.

261. Tébar A. R., Ballesteros A. O. Kinetic properties of ATP phosphoribosyltransferase of Escherichia coli //Molecular and Cellular Biochemistry. – 1976. – T. 11. – №. 3. – C. 131-136.

262. Thangam E. B., Jemima E. A., Singh H., Baig M. S., Khan M., Mathias C. B., Martin K. C., Saluja R. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: the hunt for new therapeutic targets //Frontiers in immunology. – 2018. – T. 9. – C. 1873.

263. Torriani A. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in Escherichia coli //Bioessays. – 1990. – T. 12. – №. 8. – C. 371-376.

264. Tsai J., Douglas M. G. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding //Journal of Biological Chemistry. – 1996. – T. 271. – №. 16. – C. 9347-9354.

265. Ublinskaya A. A., Samsonov V. V., Mashko S. V., Stoyanova N. V. A PCR-free cloning method for the targeted ϕ 80 Int-mediated integration of any long DNA fragment, bracketed with meganuclease recognition sites, into the Escherichia coli chromosome //Journal of microbiological methods. – 2012. – T. 89. – №. 3. – C. 167-173.

266. Uhlin U., Cox G. B., Guss J. M. Crystal structure of the ϵ subunit of the proton-translocating ATP synthase from Escherichia coli //Structure. – 1997. – T. 5. – №. 9. – C. 1219-1230.

- 267.** Uden G., Bongaerts J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 1997. – T. 1320. – №. 3. – C. 217-234.
- 268.** Van Maris A. J., Winkler A. A., Porro D., van Dijken J. P., Pronk, J. T. Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export // *Applied and environmental microbiology*. – 2004. – T. 70. – №. 5. – C. 2898-2905.
- 269.** Van Veen H. W., Abee T., Kortstee G. J., Konings W. N., Zehnder A. J. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli* // *Biochemistry*. – 1994. – T. 33. – №. 7. – C. 1766-1770.
- 270.** Varma A., Boesch B. W., Palsson B. O. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli* // *Biotechnology and bioengineering*. – 1993. – T. 42. – №. 1. – C. 59-73.
- 271.** Vázquez-Ciros O. J., Alvarez A. F., Georgellis D. Identification of Z nucleotides as an ancient signal for two-component system activation in bacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – T. 117. – №. 52. – C. 33530-33539.
- 272.** Vázquez-Salazar A., Becerra A., Lazcano A. Evolutionary convergence in the biosyntheses of the imidazole moieties of histidine and purines // *PLoS One*. – 2018. – T. 13. – №. 4. – C. e0196349.
- 273.** Velez S., Nair N. G., Reddy V. P. Transition metal ion binding studies of carnosine and histidine: biologically relevant antioxidants // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2008. – T. 66. – №. 2. – C. 291-294.
- 274.** Vera-Aviles M., Vantana E., Kardinasari E., Koh N. L., Latunde-Dada G. O. Protective role of histidine supplementation against oxidative stress damage in the management of anemia of chronic kidney disease // *Pharmaceuticals*. – 2018. – T. 11. – №. 4. – C. 111.
- 275.** Von Ballmoos C., Wiedenmann A., Dimroth P. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases // *Annual review of biochemistry*. – 2009. – T. 78. – C. 649-672.
- 276.** Walker J. E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown // *Biochemical Society Transactions*. – 2013. – T. 41. – №. 1. – C. 1-16.
- 277.** Walker J. E., Saraste M., Gay N. J. The unc operon nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*. – 1984. – T. 768. – №. 2. – C. 164-200.
- 278.** Wanner B. L. et al. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon // *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. – 1996. – T. 1. – C. 1357-1381.
- 279.** Ward D. E., de Vos W. M., van der Oost J. Molecular analysis of the role of two aromatic aminotransferases and a broad-specificity aspartate aminotransferase in the aromatic amino acid metabolism of *Pyrococcus furiosus* // *Archaea*. – 2002. – T. 1. – №. 2. – C. 133-141.

- 280.** Wei Z., Peterson J. M., Wong G. W. Metabolic regulation by C1q/TNF-related protein-13 (CTRP13): activation OF AMP-activated protein kinase and suppression of fatty acid-induced JNK signaling //Journal of Biological Chemistry. – 2011. – T. 286. – №. 18. – C. 15652-15665.
- 281.** Wilkens S., Capaldi R. A. Electron microscopic evidence of two stalks linking the F1 and F0 parts of the Escherichia coli ATP synthase //Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1998. – T. 1365. – №. 1-2. – C. 93-97.
- 282.** Wilkens S., Rodgers A., Ogilvie I., Capaldi R. A. Structure and arrangement of the δ subunit in the E. coli ATP synthase (ECF1F0) //Biophysical chemistry. – 1997. – T. 68. – №. 1-3. – C. 95-102.
- 283.** Winkler H. H. A hexose-phosphate transport system in Escherichia coli //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 1966. – T. 117. – №. 1. – C. 231-240.
- 284.** Winkler, M. E. Biosynthesis of histidine //Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology. – 1987.
- 285.** Winkler M. E., Ramos-Montañez S. Biosynthesis of histidine //EcoSal Plus. – 2009. – T. 3. – №. 2.
- 286.** Wood H. G. Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy //Federation Proceedings. – 1977. – T. 36. – №. 9. – C. 2197-2206.
- 287.** Wu H., Tian D., Fan X., Fan W., Zhang Y., Jiang S., Wen C., M, Q., Chen N., Xie X. Highly efficient production of L-histidine from glucose by metabolically engineered Escherichia coli //ACS Synthetic Biology. – 2020. – T. 9. – №. 7. – C. 1813-1822.
- 288.** Yang H., Knapp J., Koirala P., Rajagopal D., Peer W. A., Silbart L. K., Murphy A., Gaxiola R. A. Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over- expressing a phosphorus- responsive type I H⁺- pyrophosphatase //Plant biotechnology journal. – 2007. – T. 5. – №. 6. – C. 735-745.
- 289.** Yang Y., Tang R. J., Mu B., Ferjan, A., Shi J., Zhang H., Fugeng Zhao F., Lan W. Luan S. Vacuolar proton pyrophosphatase is required for high magnesium tolerance in Arabidopsis //International journal of molecular sciences. – 2018. – T. 19. – №. 11. – C. 3617.
- 290.** Yasuda R., Noji H., Yoshida M., Kinoshita K., Itoh H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase //Nature. – 2001. – T. 410. – №. 6831. – C. 898-904.
- 291.** Yin X., Wu Orr M., Wang H., Hobbs E. C., Shabalina S. A., Storz G. The small protein MgtS and small RNA MgrR modulate the PitA phosphate symporter to boost intracellular magnesium levels //Molecular microbiology. – 2019. – T. 111. – №. 1. – C. 131-144.
- 292.** Yoshida M., Muneyuki E., Hisabori T. ATP synthase—a marvellous rotary engine of the cell //Nature reviews Molecular cell biology. – 2001. – T. 2. – №. 9. – C. 669-677.

- 293.** Yoshimatsu H., Chiba S., Tajima D., Akehi Y., Sakata T. Histidine suppresses food intake through its conversion into neuronal histamine //Experimental biology and medicine. – 2002. – T. 227. – №. 1. – C. 63-68.
- 294.** Yu B., Li A. H., Muzny D., Veeraraghavan N., De Vries P. S., Bis J. C., Musani S.K., Alexander D., Morrison A.C., Franco O.H., Uitterlinden A., Hofman A., Dehghan A., Wilson J.G., Psaty B.M., Gibbs R., Wei P., Boerwinkle E. Urocanic acid and skin photodamage: New light on an old chromophore //Skin Stress Response Pathways. – Springer, Cham, 2016. – C. 79-99.
- 295.** Zhang L., Li Y., Wang Z., Xia Y., Chen W., Tang K. Recent developments and future prospects of Vitreoscilla hemoglobin application in metabolic engineering //Biotechnology Advances. – 2007. – T. 25. – №. 2. – C. 123-136.
- 296.** Zhang X., Liu S., Takano T. Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (AtMtATP6) confers tolerance to several abiotic stresses in Saccharomyces cerevisiae and Arabidopsis thaliana //Biotechnology letters. – 2008. – T. 30. – №. 7. – C. 1289-1294.
- 297.** Zhang Y., Shang X., Deng A., Chai X., Lai S., Zhang G., Wen T. Genetic and biochemical characterization of Corynebacterium glutamicum ATP phosphoribosyltransferase and its three mutants resistant to feedback inhibition by histidine //Biochimie. – 2012. – T. 94. – №. 3. – C. 829-838.
- 298.** Zhou J., Liu L., Shi Z., Du G., Chen J. ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives //Biotechnology advances. – 2009. – T. 27. – №. 1. – C. 94-101.
- 299.** Zupančič G. D., Roš M. Aerobic and two-stage anaerobic–aerobic sludge digestion with pure oxygen and air aeration //Bioresource technology. – 2008. – T. 99. – №. 1. – C. 100-109.
- 300.** Zyryanov A. B., Pohjanjoki P., Kasho V. N., Shestakov A. S., Goldman A., Lahti R., Baykov A. A. The electrophilic and leaving group phosphates in the catalytic mechanism of yeast pyrophosphatase //Journal of Biological Chemistry. – 2001. – T. 276. – №. 21. – C. 17629-17634.