На правах рукописи

### КАЗИЕВА ЕКАТЕРИНА ДМИТРИЕВНА

# Новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, улучшающие продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*

03.01.03 – Молекулярная биология

### ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва 2019

Работа выполнена в Лаборатории №3 Закрытого Акционерного Общества «научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»)

### Научный руководитель:

кандидат биологических наук, ЗАО «АГРИ»

Ж.И. Каташкина

### Официальные оппоненты:

Кульбачинский Андрей Владимирович, доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН,

> Голденкова-Павлова Ирина Васильевна доктор биологических наук, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

### Ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_» 2019 года в 14<sup>00</sup> на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01. при ФГБУ «Государственный научноисследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Научно-исследовательского центра «Курчатовский институт» по адресу: 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Научно-исследовательского центра «Курчатовский институт Автореферат диссертации разослан «\_» \_\_\_\_ 2019 года.

Ученый секретарь Диссертационного Совета, Т.Л. Воюшина Кандидат химический наук, доцент

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 1.1.Актуальность проблемы

Мевалонаткиназа (МVК) – один из ключевых ферментов мевалонатного (MVA) пути (Lynen, 1967), продукты которого (IPP и DMAPP), служат предшественниками более 50 тысяч изопреноидов - регуляторов метаболизма, таких как гормоны, витамины, пигменты, антиоксиданты, сигнальные и защитные молекулы, а также холестерин (Durr et al., 1960). Изучение регуляции MVК приобрело особую актуальность в связи с исследованием генетических заболеваний человека, вызываемых недостаточностью фермента (Tanaka et al., 1990; Schafer et al., 1992). Ограничение активности MVK при избыточном биосинтезе продуктов (ретроингибирование) является важнейшим механизмом регуляции синтеза необходимых клетке изопреноидов. Различие профиля ингибирования MVK человека и некоторых патогенных микроорганизмов и паразитов используется при создании лекарств.

Всё большее внимание привлекает разработка процессов микробной ферментации представляющих коммерческий интерес изопреноидов. Большинство бактерий используют альтернативный, метилэретритолфосфатный (МЕР), путь биосинтеза изопреноидов. До сих пор не удалось создать эффективный штамм-продуцент изопреноидов на базе этого пути, по-видимому, из-за особенностей его регуляции. Успехи синтетической биологии привели в последние годы к созданию высокоэффективных бактериальных продуцентов изопрена и ряда изопреноидов на базе гетерологичного МVA пути. Основой создания эффективных рекомбинантных штаммов-продуцентов изопреноидов является наличие МVK, устойчивой к ретроингибированию нижестоящих производных МVA пути.

К моменту начала нашего исследования такой фермент был выделен из археи Methanosarcina mazei и охарактеризован (Primak et al., 2011). Преимущества устойчивой к ретроингибированию MVK из *M. mazei* были продемонстрированы в штамме-продуценте изопрена на базе Escherichia coli (Whited et al., 2010). Это революционное открытие явилось важным шагом на промышленных пути создания штаммов-продуцентов изопреноидов. Обнаружение других неингибируемых MVK, помимо несомненной практической ценности, позволило бы выявить общие особенности структур

таких ферментов и, возможно, помогло бы прогнозировать свойства других MVK и их распространённость в разных таксономических группах.

При несбалансированной экспрессии генов любого биосинтетического пути происходит накопление интермедиатов, которые будут оказывать влияние на продукцию. В частности известно, что фосфорилированные производные MVA пути токсичны для клетки. Поэтому актуальна дальнейшая разработка и совершенствование методов интеграции нескольких генов, позволяющих быстро и эффективно добиваться оптимизации уровня их экспрессии.

### 1.2. Цели и задачи работы

Целью данной работы являлся поиск не подверженных ретроингибированию мевалонаткиназ, определение их кинетических параметров *in vitro* и конструирование на их основе штаммов-продуцентов *Pantoea ananatis* с увеличенным накоплением изопрена.

В ходе работы решались следующие задачи:

1. Выбор генов мевалонаткиназ, предположительно не подверженных ретроингибированию.

2. Клонирование и экспрессия генов выбранных мевалонаткиназ и очистка, определение кинетических параметров и проверка ингибирования интермедиатами мевалонатного пути соответствующих белков.

3. Введение гетерологичных генов мевалонатного пути в хромосому *P. ananatis*. Конструирование линии изогенных штаммов, содержащих гены кандидатных мевалонаткиназ, способных продуцировать изопрен. Сравнение продукции изогенных штаммов с различными мевалонаткиназами.

4. Дальнейшее увеличение продукции штамма с лучшей мевалонаткиназой за счёт сбалансированного усиления экспрессии генов мевалонатного пути.

### 1.3. Научная новизна и практическая значимость работы

1. Были обнаружены новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы из *M. concilii* и *M. paludicola*, обладающие лучшими кинетическими параметрами, чем ранее известная мевалонаткиназа из *M. mazei*.

2. Было продемонстрировано преимущество мевалонаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola* для продукции изопрена.

3. Была разработана новая стратегия, позволяющая отбирать оптимальное соотношение числа дополнительных копий генов биосинтетического пути за один раунд интеграции смеси интегративных плазмид в штамм-продуцент.

### 1.4. Положения выносимые на защиту

1. Получены клоны новых устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ (MVK<sup>R</sup>) из архей *M. concilii* и *M. paludicola* на основании эвристического анализа гомологов мевалонаткиназы из *Methanosarcina mazei*, известного фермента, устойчивого к ретроингибированию изопреноидами.

2. Все новые MVK<sup>R</sup> присутствуют в геноме не как индивидуальные гены, а в составе оперона генов мевалонатного пути, что предполагает существование регуляции мевалонатного пути в зависимости от взаимного расположение его генов. В результате выравнивания аминокислотных последовательностей мевалонаткиназ, имеющих разный профиль ингибирования, выявлены особенности их структур, отвечающих за спектр ингибиторов и за уникальные свойства мевалонаткиназы из *M. concilii*.

3. Новые мевалонаткиназы из *M. concilii* и *M. paludicola* могут быть использованы для синтеза изопрена в промышленных масштабах. Они имеют в пять раз большее сродство к мевалонату и ATP, в 2-4 раза большую каталитическую эффективность по сравнению с ранее описанным ферментом из *M. mazei*. Мевалонаткиназа из *M. concilii* обнаружена в активной форме в виде тетрамера, в отличие от димеров, характерных для данного семейства GHMP киназ. Активность мевалонаткиназа из *M. concilii* возрастает на 20% под действием одного из ретро-ингибиторов DMAPP.

4. Преимущества новых  $MVK^R$  из *M. concilii* и *M. paludicola* были продемонстрированы в штамме-продуценте изопрена на базе *P. ananatis*.

5. Сбалансированное усиление экспрессии генов целевого биосинтетического пути одновременной адресной интеграцией их в бактериальную хромосому, и последующая селекция лучших рекомбинантных продуцентов изопрена обеспечили повышение его продукции на 30%.

### Публикации и апробация работы.

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК, 1 патентная заявка. Материалы диссертации докладывались на конкурсе работ сотрудников ЗАО «АГРИ» (июнь 2014) г.

Диссертационная работа была апробирована на совместном семинаре секции «Молекулярная биология» Ученого совета ФГУП ГосНИИгенетика и НТС ЗАО «АГРИ» \_\_\_\_\_\_ года.

### Структура и объем работы.

Диссертация состоит из 6 разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Работа изложена на <u>137</u> страницах, включая <u>24</u> рисунка и <u>10</u> таблиц. Список цитируемой литературы содержит<u>314</u> источников, в том числе<u>1</u> на русском языке.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

#### 1. Новые мевалонаткиназы и их характеристика

Снятие ингибирования ферментов конечным продуктом является одной из важнейших задач при конструировании штаммов-продуцентов. На сегодняшний день из всех ферментов мевалонатного пути ретроингибирование хорошо изучено только для мевалонаткиназ, из-за сложности получения субстратов соответствующих реакций и потенциальных ингибиторов. Поиск мевалонаткиназ с лучшими кинетическими параметрами лежит в основе успешного конструирования штаммов-продуцентов.

### 1.1. Выбор генов, предположительно кодирующих устойчивые к ретро-ингибированию мевалонаткиназы

Впервые устойчивая к ретро-ингибированию MVK была найдена в архее Methanosarcina mazei из класса Methanomicrobia (Primak et al., 2011). Высокая гомология наблюдалась только для мевалонаткиназ того же рода *Methanosarcina*. Максимальная представителей гомология среди остальных класса Methanomicrobia составила 53% для мевалонаткиназы из Methanocella paludicola (Рисунок 1) из другого порядка Methanocellales. Самая высокая гомология для представителей порядка Methanosarcinales составила 42% одного лля мевалонаткиназы из Methanosaeta concilii. Интересно, что только эти два рода Methanosarcina и Methanosaeta из метаногенных архей, способны использовать ацетаты для роста и генерации метана (Ferry et al., 2010).



### Рисунок 1 - Филогенетический анализ белковых последовательностей мевалонаткиназ представителей архей из класса *Methanomicrobia*.

Последовательности MVK получены из базы данных DDBJ/EMBL/GenBank и RefSeq (ID):: WP\_042697404.1: *M. bavaricum* DSM 4179; WP\_013720012.1: *M. concilii* GP6; AAB99088.1: *M. jannaschii* DSM 2661; AAM31458.1: *M mazei* Go1; BAI61711.1: *M. paludicola* SANAE; ABX12211.1: *N. maritimus* SCM1.



### Рисунок 2 - Филогенетический анализ последовательностей 16S рРНК представителей архей из класса *Methanomicrobia*.

Последовательности 16S rRNA получены из базы данных DDBJ/EMBL/GenBank и RefSeq (ID): AUMX01000033, 12...1465: *M. bavaricum* DSM 4179; CP002565, 291377...292844: *M. concilii* GP6; AE008384, 235306...236779: NC\_000909, 157985...159459: *M. jannaschii* DSM 2661; *M. mazei* Go1; AP011532, 106585...108054: *M. paludicola* SANAE; CP000866, 896241... 897709: *N. maritimus* SCM1.

Для дальнейшего анализы были выбраны MVK из *M. paludicola* и *M. concilii;* оба являются хорошо изученными мезофильными микроорганизмы I уровня биобезопасности с аннотированными геномами. *M. concilii* относится к тому же порядку *Methanosarcinales*, что и *M. mazei*, но последовательность MVK имеет меньшую гомологию, чем фермент из *M. paludicola*, которая не является близкородственной *M. mazei* (Рисунок 2).

### 1.2. Клонирование генов мевалонаткиназ из *M. concilii, M. paludicola, M. mazei, N. maritimus* и *S. cerevisiae* их экспрессия в *E. coli* и очистка соответствующих рекомбинантных белков.

Нуклеотидные последовальности для генов мевалонаткиназ из *M. concilii* GP6, *M. paludicola* SANAE, *M. mazei* Go1, *N. maritimus* и ERG12 гена из *Saccharomyces cerevisiae* были модифицированы для эффективного клонирования и экспрессии в *E. coli*, последовательности представлены ранее (Kazieva et al., 2017). Фрагменты ДНК клонировали на pET-21a(+) (С-концевой

Ніз-Тад) и pET-28b(+) (N-концевой His-Tag) экспрессионные векторы. Полученные рекомбинантные плазмиды трансформировали в штамм *E. coli* BL21 (DE3) (Studier & Moffatt, 1986). Полученные клоны культивировали в среде LB при +34°C до OD<sub>600</sub> = 0,8. Для индукции синтеза PHK полимеразы фага T7 добавляли 1 мМ IPTG и культивировали в течение 1 часа. SDS-PAAG электрофорез выявил в условиях индукции высокое накопление целевого белка в нерастворимой фракции и только следовые количества в растворимой фракции - типичная картина SDS-электрофореза проб белков для одного из полученных рекомбинантных штаммов представлена на Рисунке 3. Несколько более высокое накоплением наблюдалось в случае векторов на основе pET-28b(+).



Рисунок 3 - Электрофорез в ПААГ лизата BL21(DE3)/pET28b(+)-*mvk<sup>mpd</sup>* 

Рисунок 4 - Электрофорез в ПААІ МVК очищенных с помощью металлаффинной хроматографии

Растворимость рекомбинантных полипептидов могла быть существенно повышена при культивировании клеток при пониженной температуре (20°С). Рекомбинантные мевалонаткиназы из *M. concilii, M. paludicola, M. mazei, N. maritimus* и *S. cerevisiae* были очищены с помощью металл-аффинной хроматографии до 95% гомогенности, оцениваемой визуально в ПААГ с окрашиванием Coomassie.

Мевалонаткиназы принадлежат к семейству GHMP киназ (Bork et al., 1993), для которых обычно наблюдается мономерный или гомодимерный состав. Массы, определенные с помощью гель-фильтрации, составляют 158 кДа для *M. concilii* и 72 кДа для *M. paludicola*. Рассчитанные из аминокислотных последовательностей молекулярные массы, составляют 35,6 кДа и 33,9 кДа соответственно. Следовательно, MVK<sup>mpd</sup> образует димер в растворе, тогда как

MVK<sup>mcl</sup> имеет необычную тетрамерную структуру. Недавно была охарактеризована еще одна мевалонаткиназа имеющая тетрамерную структуру из *Trypanosoma evensi* (Duarte et al., 2018). Интересно, что этот фермент имеет структурные особенности более характерные для мевалонаткиназ из архей, чем для эукариот.

# 1.3. Определение кинетических параметров $MVK^{Mma}$ , $MVK^{Mpd}$ , $MVK^{Mma}$ , $MVK^{Nmr}$ и $MVK^{Sce}$

Для фермента скорость фосфорилирования каждого мевалоната контролировалась сопряженной реакции С пируваткиназой В И лактатдегидрогеназой (Andreassi et al., 2004). С использованием уравнения Михаэлиса-Ментен были рассчитаны значения K<sub>m</sub> по отношению к АТР (K<sub>m-ATP</sub>) и мевалонату (K<sub>m-Mey</sub>) для каждого His-tag рекомбинантного фермента.

| MVK | К <sub>m-Mev</sub><br>(мкМ) | К <sub>m-АТР</sub><br>(мкМ) | Удельная активность<br>мкмоль/мин*мг | $k_{cat}$ (c <sup>-1</sup> ) | <i>k<sub>cat</sub> /</i> K <sub>m-Mev</sub><br>(мкМ/с) |
|-----|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| mcl | 17.0±0.5                    | 74±1                        | 233±2                                | 14.0±0.1                     | 0.824  |
| mpd | 15.0±0.5                    | 119±2                       | 129±1                                | 7.30±0.04                    | 0.487  |
| тта | 83±2                        | 687±9                       | 348±3                                | 19.0±0.2                     | 0.229  |
| nmr | 461±7.5                     | 1006±20                     | 204±2                                | 12±0.11                      | 0.026  |
| sce | 73±2                        | 464±8                       | 188±3                                | 16.0±0.1                     | 0.219  |

Таблица 1 - Кинетические характеристики мевалонаткиназ

Таким образом,  $K_{m-Mev}$  для MVK<sup>mcl</sup> и MVK<sup>mpd</sup>, в 4-5 раз ниже, чем у MVK<sup>mma</sup>или MVK<sup>sce</sup>. Сравнимый  $K_{m-Mev} = 19,0$  мкМ наблюдался только для MVK свиньи, чувствительной к ретро-ингибированию (Houten et al., 2000). Число оборотов оказалось самым низким для MVK<sup>mpd</sup> и сравнимым с MVK<sup>mma</sup> и MVK<sup>sce</sup> для MVK<sup>mcl</sup>. Каталитическая эффективность MVK<sup>mpd</sup> хоть и меньше, чем для MVK<sup>mcl</sup>, но в 2 раза выше, чем для MVK<sup>mma</sup> (Таблица 1).

# 1.4. Превращение мевалоната в фосфо- и дифосфомевалонат *in vitro* в присутствии очищенной мевалонаткиназы и фосфомевалонаткиназы из *S. cerevisiae*.

Мевалоновая кислота содержит две гидроксильные группы (С3 и С5), которые могут быть фосфорилированы. Мевалонат-5-фосфат является

промежуточным звеном в классическом мевалонатном пути. С другой стороны недавно обнаружены две мевалонат-3-киназы в археях *T. acidophilum* (Azami et al., 2014) и *P. torridus* (Rossoni et al., 2015). Продукты реакций, катализируемых двумя другими мевалонаткиназами из архей *M. mazei* и *M. jannaschii*, могут быть затем превращены в дифосфомевалонат 5-фосфомевалонаткиназой из *S. cerevisiae* (PMK) (Primak et al., 2011).



Рисунок 5 - Превращение фосфомевалоната, продуцируемого MVK<sup>mma</sup>, MVK<sup>sce</sup>, MVK<sup>mcl</sup>, MVK<sup>mpd</sup> и MVK<sup>nmr</sup> в дифосфомевалонат РМК из S. cerevisiae. Скорость фосфорилирования контролировалась в сопряженной реакции с пируваткиназой и

лактатдегидрогеназой (коэффициент поглощения NADH при 386 нм - 0,61 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>).

Для определения того, какая группа подвергается фосфорилированию MVK<sup>mcl</sup> и MVK<sup>mpd</sup>, применялся метод *in vitro*, разработанный ранее (Andreassi et al., 2001). В этом подходе сначала в присутствии MVK фосфорилируется мевалонат с последующей конверсией фосфомевалоната в DPM после добавления PMK. Полученные кривые количественно подтвердили полное превращение мевалоната в DPM через фосфомевалонат (Рисунок 5), что свидетельствуют о том, что MVK<sup>mcl</sup> и MVK<sup>mpd</sup> следует рассматривать как мевалонат-5-киназы.

### 1.5. Проверка ретро-ингибирования мевалонаткиназ

Производилась оценка ингибирования MVK из *M. concilii, M. paludicola, M. mazei, S. cerevisiae и N. maritimus* нижестоящими промежуточными продуктами биосинтеза изопреноидов (DPM, DMAPP, GPP и FPP). Для этого проводилось измерение активности в присутствии высокой концентрации потенциального ингибитора и без него.

Согласно ранее опубликованным данным, MVK из *S. cerevisiae* сильно ингибируется 5 мМ DMAPP, 0,1 мМ GPP и 0,1 мМ FPP, но не ингибируется 1 мМ DPM. Для MVK *из М. janashii* уже при концентрации 5 мкМ GPP и FPP активность снижается примерно в два раза (Huang et al., 1999).

| MVK | DPM | DMAPP | GPP     | FPP     |
|-----|-----|-------|---------|---------|
|     | 1мМ | 5 мМ  | 100 мкМ | 100 мкМ |
| sce | 96  | 8     | 9       | 10      |
| тта | 85  | 91    | 96      | 98      |
| mcl | 99  | 122   | 104     | 105     |
| mpd | 105 | 97    | 101     | 101     |
| nmr | 97  | 95    | 100     | 92      |

**Таблица 2 - Влияние потенциальных ингибиторов на активность мевалонаткиназы.** В таблице указаны относительные каталитические активности (%) каждого фермента. Активность в реакционной смеси без ингибиторов принималась равной 100%.

Мевалонаткиназа из *M. mazei* не ингибируется 0,1 мМ GPP и 0,1 мМ FPP. Ни МVК<sup>mcl</sup>, ни МVК<sup>mpd</sup> не ингибировались 1 мМ DPM, 5 мМ DMAPP, 0,1 мМ GPP или 0,1 мМ FPP (Таблица 2). Напротив, фермент из *M. concilii* даже слегка активировался 5 мМ DMAPP (его активность увеличилась на 20% по сравнению с контролем). Более низкие концентрации (33,6 мкМ или 168 мкМ) DMAPP или IPP не влияли на активность этого фермента.

### 1.6. Анализ генетического окружения генов mvk

Суммируя приведённые выше данные можно заключить, что все проверенные нами MVK из архей, оказались устойчивыми к ретроингибированию. Исходя из этого, можно предположить, что данные археи могут использовать другой механизм регуляции MVA пути. Вполне вероятно, что экспрессия части генов MVA пути, координируется в этих организмах на уровне транскрипции.

Было проанализировано окружение MVK с помощью программного обеспечения STRING v.10 (Szklarczyk et al., 2015). У всех представителей *Methanomicrobia* ген *mvk* входит в состав протяженных оперонов, включающих и

другие гены нижнего мевалонатного пути (Рисунок 6). Ген, кодирующий чувствительную к ретро-ингибированию MVK из *M. jannaschii* (Huang et al., 1999), расположен отдельно, что является характерным и для других организмов, содержащих мевалонаткиназы, подверженные ретроингибированию. Т.о. анализ генетического окружения может быть полезен для поиска мевалонаткиназ, устойчивых к ретро-ингибированию.



#### Рисунок 6 – Устойчивые к ретро-ингибированию MVK в составе оперонов

(a) RpoK, (b) 30S рибосомальный белок S2, (c) гипотетический белок, (d) мевалонаткиназа, (e) изопентенилкиназа, (f) изопентенилпирофосфатизомераза, (g) изопренилдифосфатсинтаза, (h) бета-лактамаза, (i) енолаза, (j) шикимат-5-дегидрогеназа, (k) и (1) гипотетические белки.

# 1.7. Анализ структурных особенностей устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ

В настоящее время получена кристаллическая структура МVК крысы в комплексе с ATP (ингибируется по конкурентному механизму) и были определены аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с фосфатными остатками ATP, на основании которой можно было бы попытаться выявить структурные особенности устойчивых к конкурентному ингибированию ферментов (Fu et al., 2002). Было проведено выравнивание известных аминокислотных последовательностей MVK с разным профилем ингибирования с помощью программы CLUSTALX и веб-инструмента ESPRIPT 3.0. Вторичная

структура MVK *Rattus norvegicus*, размещенная над выравниванием, была загружена из базы данных PDB (Рисунок 7).

Среди аминокислотных остатков МVК крысы, участвующих в связывании изопреноидной группы фарнезилтиофосфата, четыре аминокислоты расположены в консервативной области, а пять расположены в спейсере, между консервативными областями 1 и 2. В прокариотических МVК спейсер значительно короче, чем у эукариотических ферментов, что возможно, и определяет спектр ингибиторов. В Мотиве 4, участвующим в связывании фосфатной части АТР, только последовательность МVК<sup>mcl</sup> содержит две положительно заряженные аминокислоты - лизин и аргинин, скорее всего отвечающих за необычные свойства MVK<sup>mcl</sup>.



Рисунок 7 - Структурное выравнивание последовательности белков МVК.

Консервативные остатки во всех четырех белках, выделены черным цветом. Остатки, вовлеченные в связывание фосфатных групп АТР, обозначены кружками, а изопреноидных фрагментов - звездочками. Положительно заряженные лизин и аргинин в Мотиве 4 MVK<sup>mcl</sup> обозначены треугольниками.

Дальнейшее изучение MVK из архей, бактерий и эукариот и сравнение их структур могут обеспечить понимание механизма взаимодействия между потенциальными ингибиторами прокариотических и эукариотических MVK, что очень важно, поскольку у человека как избыточная, так и недостаточная активность фермента вызывает соответствующие заболевания (Qiu et al., 2006; Schneiders et al., 2006). Кроме того, они могут составлять отдельный класс новых антимикробных агентов (Gharehbeglou et al., 2015).

# 2. Сопоставление продукции изопрена изогенными штаммами с разными мевалонаткиназами

Целью данной работы являлся поиск устойчивых к ретро-ингибированию MVK, которые могли бы обеспечить увеличение продукции изопрена клетками *P. ananatis*. В первой части работы были найдены и охарактеризованы две новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, обладающие существенно лучшими кинетическими параметрами, чем ранее описанная MVK<sup>Mma</sup>. Однако измерение кинетических параметров зачастую проводится в условиях далеких от физиологических. Кроме того, продуцирующая способность штамма зависит не от кинетических параметров соответствующих биосинтетических только ферментов, но и от их содержания в клетках, т.е. от уровня экспрессии кодирующих их генов. Как известно, уровень экспрессии гена определяется совокупностью целого ряда факторов (эффективность инициации транскрипции, мРНК, стабильность эффективность eë трансляции, стабильность И растворимость образующегося белка). Поэтому невозможно гарантировать, что введение в штамм-продуцент генов высокоэффективных мевалонаткиназ *mvk<sup>mcl</sup>* или *mvk<sup>mpd</sup>* улучшит его продуцирующую способность.

Чтобы выяснить, какой из генов действительно обеспечивает максимальную продукцию, было необходимо сконструировать набор изогенных штаммов, содержащих все гены мевалонатного пути, различающиеся только геном мевалонаткиназы.

На момент начала работы в нашей лаборатории был получен модельный штамм-продуцент изопрена *P. ananatis* ISP3-S (SC17(0) $\Delta ampC$ ::KKDyIispS(K) $\Delta ampH$ ::P<sub>ara</sub>-mvaES  $\Delta crt$ ::P<sub>tac</sub>-ispS(M)-mvk<sup>mma</sup>), в геном которого были интегрированы все гены мевалонатного пути и ген изопренсинтазы (Mihara et al., 2016). На его базе была получена линия изогенных штаммов ISP3-mvk<sup>mpd</sup> ISP3.2-

 $mvk^{mcl}$  и ISP3.2- $mvk^{mma}$  с генотипом SC17(0) $\Delta ampC$ :: P<sub>tac</sub>-KKDyI-ispS(K) $\Delta ampH$ ::P<sub>ara</sub>-mvaES  $\Delta crt$ ::P<sub>tac</sub>-mvk(X), различающихся только геном мевалонаткиназы.

Для проверки продуцирующей способности, изогенные штаммы ISP3*mvk<sup>mpd</sup>*, ISP3.2-*mvk<sup>mma</sup>* и ISP3.2-*mvk<sup>mcl</sup>* были трансформированы многокопийной плазмидой pSTV28- $P_{tac}$ -ispS(K) (Mihara et al., 2015), несущей ген изопренсинтазы ИЗ Kudzu (Pueraria montana). Полученные плазмидные штаммы культивировировали в соответствии с протоколом, подробно описанным в разделе «Материалы и Методы». Особенностью изопреновой ферментации является то, что её конечный продукт находится в газообразном состоянии (температура кипения изопрена +34°С). В ходе ферментации измерялась концентрация изопрена в выходящем газе в режиме реального времени с проточного мультигазового анализатора (F10, GASERA Ltd). помощью Накопление изопрена за время ферментации приведено в Таблице 3.

Таблица 3 - Продукция изопрена штаммами, содержащими различные гены мевалонаткиназ.

| Штамм           | Изопрен, мг | Глюкоза, г | Выход, г/г % |
|-----------------|-------------|------------|--------------|
| ISP3.2-mvk(Mma) | 276         | 64.3       | 0,42         |
| ISP3.2-mvk(Mcl) | 301         | 67.2       | 0,48         |
| ISP3.2-mvk(Mpd) | 307         | 60.1       | 0,51         |

Из полученных данных видно, что даже в штамме, несущем дополнительный ген мевалонаткиназы из *S. cerevisiae*, введение генов *mvk* из *M. paludicola* или *M. concilii*, обеспечило большую продукцию изопрена, чем интеграция ранее известного гена из *M. mazei*.

В дальнейшем, была продолжена линия штаммов с мевалонаткиназой из *M. paludicola*. Для улучшения экспрессии генов фосфомевалонаткиназы, дифосфомевалонат декарбоксилазы и IPP изомеразы в этом штамме, был удален ген мевалонаткиназы из *S. cerevisiae* (проксимальный ген KKDyI оперона). Для этого был осуществлён химический синтез фрагмента, включающего гены PMK, MVD и *yldI* с оптимизированной последовательностью ДНК и осуществлено его

клонирование и интеграция в хромосому штамма-продуцента (Tajima et al., 2017).

Благодаря этой модификации, продукция изопрена значительно увеличилась и составила 563 мг. Последующая замена арабинозного промотора перед генами верхнего MVA пути на авторегулируемый промотор  $P_{phoC}$ , активирующийся лимитом по фосфату, привело к дальнейшему увеличению продукции до 869 мг (Tajima et al., 2017).

### 3. Обеспечение баланса биосинтетических активностей в штамме, продуцирующем DMAPP, при введении дополнительных копий генов мевалонатного пути.

Баланс активностей ферментов гетерологичного пути является важной задачей. В данном случае, накопление части интермедиатов мевалонатного пути является токсичным для клетки (Martin et al., 2003; Pitera et al., 2008; Kizer et al., 2008). Продуктами реакции мевалонаткиназы и последующих ферментов мевалонатого пути являются фосфорилированные интермедиаты, которые накапливаются в клетке. И являются ингибиторами большинства мевалонаткиназ. С другой стороны, ІРР, DMAPP и пирофосфаты с более длинной цепью (GPP, FPP и т.д.) являются необходимыми для клетки, и истощение их пула также приводит к остановке роста (Sánchez et al., 2015; George et al., 2018). Кроме того, для синтеза необходимых клетке изопреноидов необходимо строго определенное соотношение концентраций IPP и DMAPP, которое определяется свойствами IPP изомеразы (Berthelot et al., 2012) и нарушается при биосинтезе изопрена (Martin et al., 2003). Можно было ожидать, что сбалансированное увеличение числа копий отдельных генов позволит обеспечить повышенное накопление изопрена.

# 3.1. Конструирование базового штамма для одновременной интеграции нескольких экспрессионных кассет

Чтобы обеспечить сбалансированное увеличение уровней экспрессии генов мевалонатного пути, было решено первоначально осуществить конструирование рекомбинантного штамма, содержащего в своем геноме (1) все гены мевалонатного пути, (2) несколько точек потенциальной интеграции «дополнительных» копий уже интегрированных генов этого биосинтетического пути. В полученную таким образом хромосому реципиентного штамма, IR5-3Δ, в одном эксперименте должна была вводиться смесь CRIM плазмид (в нашем

случае – из 3 различных плазмид с 1 из двух селективных маркеров устойчивости к антибиотикам – Tc<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>) со всеми генами мевалонатного пути и интегрироваться по ф80-Int-зависимому механизму с последующим отбором целевых множественных интегрантов на среде с обоими антибиотическими маркерами. Индивидуальные клоны планировалось использовать в качестве реципиентов для электропорации плазмиды с геном изопренсинтазы, а полученные трансформанты – тестировать на продукцию изопрена.

### 3.1.1. Необходимость модификации метода Dual In/Out

Предлагаемая стратегия была реализована с получением штамма IR5-3Δ клонированием всех генов мевалонатного пути и созданием трех точек интеграции для дополнительных копий генов следующим образом. Первоначально в качестве основного метода для интеграции целевых генов планировалось использовать Dual In/Out стратегию (Minaeva et al., 2008). Однако, в данном случае прямое использование всех ранее созданных элементов метода Dual In/Out было осложнено тем, что при λRed-зависимой интеграции маркированных линейных кассет  $attL_{\phi 80}$ -kan-att $R_{\phi 80}$  с флангами 40 ПН, гомологичных целевому локусу хромосомы, происходила их рекомбинация с введенными ранее кассетами из-за присутствия на их флангах  $attL_{\phi 80}$  и  $attR_{\phi 80}$  в составе более протяженных участков исходной кассеты (463 пн и 388 пн).

Чтобы последовательно вводить несколько *attB*<sub>\$\$80</sub> сайтов с помощью  $\lambda$ Redинтеграции непосредственно в продуцент, было решено провести некоторую модификацию ранее разработанной стратегии Dual In/Out. Каждый раз при внесении будущей точки \$\$0-Int-зависимой для интеграции CRIM плазмиды, первоначально в выбранную область бактериальной хромосомы осуществлялась Red-зависимая интеграция линейного фрагмента ДНК следующей структуры –  $\lambda attR-attL_{$$0}-kan-attR_{$$0}$ , т.е. содержащего дополнительный сайт  $attR_{\lambda}$  перед сайтом  $attL_{$$0}$ . После \$\$0-Xis/Int-зависимого удаления введенного Km<sup>R</sup>-маркера это позволяет получить в составе хромосомы точку последующей \$\$0-Intзависимой интеграции CRIM плазмиды в виде  $\lambda attR-attB_{$$80}$  вместо стандартного  $attB_{$$80}$ . Тогда, при интеграции CRIM плазмид в модифицированный сайт интеграции вновь образующийся рекомбинантный сайт  $attL_{$$80}$  оказывается окруженным прямым повтором двух сайтов  $\lambda attR$ , т.е.,  $-\lambda attR_1-attL_{$$80}-\lambda attR_2$ ,

одним ( $\lambda attR_1$ ) — ранее введенным в хромосому при образовании точки интеграции, и вторым ( $\lambda attR_2$ ) — из структуры вновь введенной CRIM плазмиды.



В этом случае при экспрессии в клетках генов xis-int фага  $\lambda$  и удаления векторной части CRIM плазмиды, равновероятна рекомбинация между единственным рекомбиногенным сайтом λattL и одним из двух имеющихся в хромосоме сайтов  $\lambda attR_1$  или  $\lambda attR_2$ . В результате этих событий образуются интересующие нас рекомбинанты, утратившие векторную часть плазмиды и сайт  $attL_{\phi 80}$  (при рекомбинации по сайту  $\lambda attR_1$ ) или из хромосомы удаляется только векторная часть плазмиды (при рекомбинации по сайту  $\lambda attR_2$ ) (Рисунок 8), соответственно. Отметим, что хотя предварительное удаление  $\lambda attR_2$  из состава интегративного вектора делает безальтернативным результат финальной рекомбинации, на практике при использовании интегративных плазмид, содержащих  $\lambda attR_2$ , желаемые варианты образуются с частотой 50% и легко могут быть отобраны с помощью PCR. Поэтому в данном эксперименте мы использовали ранее сконструированные CRIM плазмиды. Для будущих экспериментов сайт λ*attR*<sub>2</sub> был удален из вектора pAH162-λ*attL*-Tc<sup>R</sup>-λattR.

# **3.1.2. Использование модифицированного метода Dual In/Out** для конструирования штамма IR5-3Δ

С помощью модифицированного метода Dual In/Out CRIM плазмиды pAH162-Km-P<sub>tac</sub>-KDyI, pAH162-P<sub>phoC</sub>-mvaES И pAH162-P<sub>tac</sub>-mvk<sup>mpd</sup> были последовательно интегрированы в локусы *атрС*, *атрН* и *crt*, соответственно, каждый раз за счет функционирования интегразы  $\phi$ 80-Int с последующим удалением векторной части CRIM плазмиды с помощью λ-Xis/Int и отбором вариантов, утративших  $attL_{\phi 80}$ . Затем в ген gcd с помощью Red-зависимой интеграции линейного фрагмента  $\lambda attR-attL_{\phi 80}$ -kan-attR\_{\phi 80} с последующим  $\phi 80$ -Xis/Int-зависимым удалением маркера была введена "точка интеграции" (*\attR* $attB_{0,0}$ ). Полученный штамм был назван IR5- $\Delta gcd$ . Аналогично была получена еще одна интеграции линейного фрагмента с одновременной делецией генов *атрС2*. Как и ожидалось, присутствие в геноме ранее интегрированных  $attR_{\phi 80}$ , но в отсутствие соответствующих  $attL_{\phi 80}$ , не снижало частоту  $\lambda$ Red-интеграции в целевые локусы хромосомы за счет «ошибочной интеграции» в ранее введенные кассеты. Полученный штамм, несущий  $\lambda attR-attL_{\phi 80}$ -kan-attR\_{\phi 80} в локусе ampC2, был назван IR5-2∆.

На последнем этапе мы решили проверить возможность одновременного удаления сразу двух маркеров антибиотической устойчивости из генома *P. ananatis* с использованием плазмиды-помощника pAH129-*cat*. Т.к. специфически направленная  $\lambda$ Red-интеграция кассеты, фланкированной *attR*<sub> $\lambda$ </sub>-*attL*<sub> $\phi$ 80</sub> и *attR*<sub> $\phi$ 80</sub>, в целевой локус хромосомы штамма, уже несущего  $\lambda attR$ -*attL*<sub> $\phi$ 80</sub>-*kan-attR*<sub> $\phi$ 80</sub>, была невозможна, хромосомная модификация  $\Delta bla::\lambda attR$ -*attL*<sub> $\phi$ 80</sub>-*tetAR-attR*<sub> $\phi$ 80</sub> была сконструирована в штамме SC17(0) дикого типа, как описано в разделе "Материалы и методы", и перенесена в штамм IR5-2 $\Delta$  методом электропорации геномной ДНК. Описанная выше стандартная процедура  $\phi$ 80-Xis/Int-зависимого удаления маркера была применена для одновременного удаления генов канамициновой и тетрациклиновой устойчивости из полученного штамма, в результате чего был получен штамм IR5-3 $\Delta$ . Частота отбора клонов, чувствительных к обоим антибиотикам, составила в этом эксперименте около 1%. Т.к. общее число клонов в таких экспериментах превосходит 10<sup>4</sup>,

представляется возможным излечивание штаммов даже от трех маркеров антибиотической устойчивости одновременно, что может существенно ускорить их конструирование.

С другой стороны, полученный результат показывает, при  $\phi$ 80-Xis/Intзависимом удалении маркера антибиотической устойчивости из "точки интеграции" с достаточно высокой вероятностью могут утрачиваться ранее введенные экспрессионные кассеты, если они фланкированы сайтами *attL*<sub> $\phi$ 80</sub> и *attR*<sub> $\phi$ 80</sub>. Проведенная нами модификация метода Dual In/Out, обеспечивающая удаление *attL*<sub> $\phi$ 80</sub> из состава интегрированной генетической кассеты, позволяет предотвратить такие нежелательные события.

## 3.1.3. Подтверждение зависимости уровня экспрессии гена от его локализации в геноме *P. ananatis*

Введенные в хромосому штамма IR5-3 $\Delta$  сайты  $\lambda attR-attB_{\phi 80}$  были расположены на разном расстоянии от точки начала репликации хромосомы (Рисунок 9). Мы не могли исключать, что продуцирующая способность штамма зависит не только от числа копий того или иного гена, но и от их расположения в хромосоме. Для E. coli хорошо известно, что в логарифмической фазе роста локусы хромосомы, расположенные вблизи начала репликации, присутствуют в большем копий, клетках В числе чем локусы, расположенные на противоположной стороне хромосомы за счет присутствия разветвленной  $\Theta$ структуры частично реплицированной кольцевой бактериальной хромосомы (Minaeva et al., 2008). Интегративная кассета может подвергаться сквозной транскрипции с хромосомы, хотя для снижения влияния этого эффекта в используемой для интеграции конструкции был предусмотрен терминатор, предотвращающий эту сквозную транскрипцию (Minaeva et al., 2008). Зная соотношение времени репликации C ко времени удвоения  $\tau$ , для E. coli может быть рассчитан уровень экспрессии гена Е в зависимости от его положения на хромосоме относительно начала репликации *p* по формуле  $E = E_0 2^{-p^*C/\tau}$ , где  $E_0 - E_0$ уровень экспрессии при  $p_0$ , т.е. в *oriC* (Bloch et al., 2012).

Для подтверждения зависимости уровня экспрессии гена от его локализации в геноме *P. anantis* была проведена интеграция плазмиды pAH162-*P<sub>tac</sub>*-FDH, несущей ген NAD-зависимой форматдегидрогеназы из *Candida boidinii* под контролем *P<sub>tac</sub>* промотора, в указанные локусы и измерена

форматдегидрогеназная активность по описанному ранее протоколу (Schüte et al., 1976). Уровни экспрессии гена форматдегидрогеназы, интегрированного в локусы *bla* и *ampC*, расположенные рядом с терминатором репликации, совпадали ( $36 \pm 4$  и  $33 \pm 5$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>, соответственно), а в случае локуса *ampH*, как и при интеграции в локус *crt* на плазмиде pEA320, экспрессия возрастала в 1.3 раза до  $46 \pm 2$  и  $48 \pm 3$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>. Используя данные значения, было рассчитано соотношение *C*/ $\tau = 1.5$ , что совпадает с ранее опубликованным значением для *E. coli* (Bloch et al., 2012).



**Рисунок 9 - Схема расположения локусов в хромосоме** *P. ananatis*. Локус *crt* расположен на мегаплазмиде pEA320, являющейся частью генома *P. ananatis* AJ13355.

В нашем эксперименте мы сравнили продуцирующую способность штаммов, различавшихся не только числом копий интегративных кассет, но и их локализацией в хромосоме.

# 3.1.4. Предварительное определение лимитирующей активности MVA пути в модельном штамме

Наличие дополнительной "точки интеграции" позволяет легко получить набор изогенных штаммов, несущих в ней дополнительную копию той или иной экспрессионной кассеты. Сравнив продуцирующую способность таких штаммов, можно определить "узкое место" метаболического пути.

В одной из недавних работ проводился расчет лимитирующей активности для гетерологичного MVA пути на основании известных кинетических параметров ферментов (Dalwadi et al., 2018). Проведенные в данной работе расчеты показали, что для увеличения выхода конечного продукта необходимо одновременное увеличение активностей гидроксиметилглутарил-КоА синтазы и гидроксиметилглутарил-КоА редуктазы, что, в нашем случае, соответствует амплификации генов *mvaES*.



Рисунок 10 - Накопление изопрена штаммами с дополнительной копией одной из кассет *P<sub>tac</sub>-mvk<sup>mpd</sup>*, *P<sub>phoC</sub>-mvaS* или *P<sub>phoC</sub>-mvaES* 

Штаммы были трансформированы мультикопийной плазмидой pSTV-P<sub>tac</sub>- $\phi$ 10-ispS(M) (Hayashi et al., 2013). Культивирование проводили в среде 1. Приведены усредненные данные для четырех плазмидных клонов каждого штамма.

- $1 IR5 \Delta gcd$
- $2 \text{IR5-}\Delta gcd$ ::  $P_{tac}$ -mvk<sup>mpd</sup>
- $3 IR5 \Delta gcd:: \mathbf{P}_{phoC}$ -mvaS
- $4 IR5 \Delta gcd:: P_{phoC}$ -mvaES

Эти расчеты хорошо согласуются с нашими данными по продукции изопрена штаммами, полученными при интеграции вторых копий генов *mvaES*, *mvaS* и *mvk<sup>mpd</sup>* в штамм IR5- $\Delta gcd$  (Рисунок 10). Введение дополнительных копий *mvk<sup>mpd</sup>* и *mvaS* не только не увеличило, но даже несколько снизило продукцию, что может быть связано с токсичностью фосфорилированных интермедиатов или гидроксиметилглутарил-КоА. Увеличение продукции наблюдалось лишь при интеграции *mvaES* оперона.

## 3.1.5. Получение набора штаммов, содержащих дополнительные копии генов MVA пути, за один раунд интеграции

Штамм IR5-3Δ был трансформирован смесью трех плазмид (0,5 мкг каждой плазмиды): pAH162-P<sub>phoC</sub>-mvaES и pAH162-P<sub>tac</sub>-mvk<sup>mpd</sup>, несущей маркер тетрациклиновой устойчивости, и pAH162-P<sub>tac</sub>-KDyI, маркированной геном *kan*. Исходя из результатов выше описанного опыта, можно было ожидать, что в

нашем случае увеличенную продукцию будут давать клоны, несущие хотя бы одну дополнительную копию *mvaES*.

Эффективность электропорации клеток *P. ananatis* и частота интеграции, обеспечиваемая плазмидой-помощником pAH123-cat, оказались достаточными для одновременной интеграции трех плазмид. Из расчета полученных частот интеграции можно ожидать, что в данных условиях эксперимента возможна интеграция 5-6 плазмид одновременно. Такой подход возможно использовать с немаркированными кассетами для введения одновременно всех генов биосинтетического пути природного метаболита в штамм ауксотроф по нему, с восстановлением прототрофности. Можно добиться оптимизации соотношения экспрессии генов, вводимого биосинтетического пути, созданием уровня комбинаторной библиотеки, используя смесь плазмид С различными промоторами.

Для клонов, выросших на обоих антибиотиках, был проведен ПЦР анализ (см. "Материалы и методы"). Среди 95 проверенных клонов были отобраны 18 интегрантов, несущих вставки во всех трех локусах gcd, ampC2 и bla. Детальный анализ тройных интегрантов показал, какая именно плазмида интегрирована в каждый локус. Среди тройных интегрантов, были отобраны 6 групп клонов имевших разный генотип (Таблица 4).

# 3.2. Отбор клонов с оптимальным сочетанием числа копий генов MVA пути с увеличенной продукцией изопрена

Для способности оценки продуцирующей штаммы были трансформированы плазмидой pHSG398-P<sub>tac</sub>- $\phi$ 10-*ispS*(*M*), содержащей ген изопренсинтазы из Mucuna bracteata. Поскольку как было установлено ранее (Hayashi et al., 2013), изопренсинтаза малоактивный фермент, то для получения продукции требуется видимой изопрена введение соответствующего структурного гена на многокопийной плазмиде. Культивирование проводилось в виалах для газовой хроматографии в соответствии с протоколом, описанном в разделе «Материалы и методы». Полученные результаты приведены в таблице 4. Как и ожидалось, в этом эксперименте более высокой (по сравнению с родительским штаммом) продуцирующей способностью, обладали интегранты, содержащие дополнительную копию *mvaES*. Напротив, в штаммах с двумя mvk<sup>mpd</sup> дополнительными копиями наблюдалось снижение продукции. Наилучший результат был получен для штамма с двумя дополнительными

копиями KDyI и одной дополнительной копией *mvaES*. Хотя в этом опыте нам удалось отобрать и проверить только 6 из 27 возможных вариантов штаммов, было достигнуто увеличение продукции изопрена на 30%, что подтверждает потенциальные возможности выбранного подхода.

Таблица 4 - Накопление изопрена производными штамма IR5-3Δ, содержащими дополнительные копии экспрессионных кассет

Производные штаммы IR5-3∆-S были трансформированы мультикопийной плазмидой pHSG398-P<sub>tac</sub>- $\phi$ 10-*ispS(M)*. Культивирование проводили в среде 2. Приведены усредненные данные для пяти плазмидных клонов каждого штамма.

| помер штамма | bla  | ampC2 | gcd   | изопрен, міул |  |
|--------------|------|-------|-------|---------------|--|
| IR5-3∆-S     | -    | -     | -     | 215 ± 15      |  |
| 1            | KDyI | mvk   | mvk   | $170 \pm 15$  |  |
| 2            | mvk  | KDyI  | mvk   | $180 \pm 30$  |  |
| 3            | mvk  | mvk   | KDyI  | $190 \pm 30$  |  |
| 4            | -    | -     | mvaES | $240 \pm 30$  |  |
| 5            | mvk  | KDyI  | mvaES | $220 \pm 40$  |  |
| 6            | mvk  | mvaES | KDyI  | $260 \pm 30$  |  |
| 7            | KDyI | mvaES | KDyI  | $280 \pm 30$  |  |

В нашем модельном эксперименте конечный продукт находился в газообразном состоянии, что делало невозможным использование современных высокопроизводительных систем культивирования. Накопление изопрена измерялось методом газовой хроматографии. Все это накладывало жесткие ограничения на число анализируемых клонов. В общем случае, роботизация процесса с использованием биосенсоров на конечный продукт в сочетании с предложенным генно-инженерным подходом может стать высокоэффективным средством оптимизации экспрессии генов целевого биосинтетического пути.

### выводы

1. Клонированы охарактеризованы рекомбинантные И новые мевалонаткиназы из архей, не подверженные ретроингибированию. Показано, что кинетические параметры (K<sub>m</sub>) мевалонаткиназ из M. concilii и M. paludicola характеризуют новые ферменты как значительно более эффективные по известной, устойчивой ретроингибированию сравнению c ранее к мевалонаткиназой из *M. mazei*.

2. Продемонстрировано преимущество мевалонаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola* для обеспечения повышенной продукции изопрена.

3. Разработан новый метод сбалансированного усиления экспрессии генов целевого биосинтетического пути за счёт их случайной, но сайт-специфической интеграции в составе смеси CRIM-плазмид в подготовленные локусы бактериальной хромосомы с последующей селекцией лучших вариантов по продукции целевого соединения. С помощью этого подхода накопление изопрена штаммом-продуцентом увеличено на 30%.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

**1. Mihara Y., Rachi H., Nishio Y., Katashkina J, Kazieva ED, Andreeva IG.** Method of producing isoprene monomer. US2015275233(A1).

**2**. Kazieva E, Yamamoto Y, Tajima Y, Yokoyama K, Katashkina J, Nishio Y. Characterization of feedback-resistant mevalonate kinases from the methanogenic archaeons *Methanosaeta concilii* and *Methanocella paludicola*. Microbiology. 2017;163(9):1283-1291.

3. Каташкина Ж.И., Казиева Е.Д., Таджима E., C.B. Машко Сбалансированная амплификация генов мевалонатного пути повысила изопрена рекомбинантным штаммом Pantoea ananatis. продукцию Биотехнология. 2019; 35(2): 4-16