

Закрытое акционерное общество
«Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»

На правах рукописи

Гусятинер Михаил Маркович

**СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ АМИНОКИСЛОТ НА ОСНОВЕ
БАКТЕРИЙ *Corynebacterium glutamicum* И *Escherichia coli*;
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОДУКЦИИ**

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.02.07 – "Генетика"

Москва 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
1. Обзор литературы.....	13
1.1. Появление промышленного получения аминокислот методом ферментации...13	
1.2. Гипотеза И. Шийо о механизм продукции глутаминовой кислоты глутаматпродуцирующими коринебактериями (ГПКБ).....	17
1.3. Таксономическое положение ГПКБ.....	20
1.4. Природа недостаточности по биотину у ГПКБ.....	25
1.5. Дефицит биотина в первую очередь нарушает синтез жирных кислот.....	28
1.6. Роль белка DTSR1 в продукции глутамата.....	31
1.7. Биосинтез жирных кислот в клетках <i>C. glutamicum</i>	33
1.8. Использование антибиотика церуленина в изучении продукции глутамата...41	
1.9. Миколовые кислоты и их возможная роль в индукции продукции глутамата.47	
1.10. Слои клеточной стенки <i>C. glutamicum</i>	58
1.11. Внешний слой (S-слой) клеточной стенки <i>C. glutamicum</i>	61
1.12. Межмембранное пространство клеточной стенки <i>C. glutamicum</i>	65
1.13. Механизм действия некоторых антибиотиков, разрушающих барьер проницаемости клеточной стенки бактерий.....	76
1.14. Роль 2-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса в сверхпродукции глутамата у ГПКБ.....	79
1.15. Роль белка OdhI в продукции глутамата.....	82
1.16. Фосфорилирование пептида odhI протеинкиназами.....	83
1.17. Значение фосфорилирования белка OdhI для продукции глутамата.....	87
1.18. Возможная роль процесса ацетилирования белков в продукции глутамата <i>C. glutamicum</i>	91
1.19. Обнаружение и роль белка, транспортирующего глутаминовую кислоту из клеток ГПКБ.....	92
1.20. Механочувствительные каналы прокариот.....	96
1.21. Современное представление о механизме продукции глутамата ГПКБ.....	105
2. Материалы и методы.....	109
3. Результаты и обсуждение.....	121
3.1. Разработка метода пенициллинового обогащения биохимическими мутантами <i>Corynebacterium glutamicum</i>	121
3.2. Пермеабиллизация клеток <i>C. glutamicum</i> с помощью антибиотика граммицидина С.....	129
3.3. Пермеабиллизация клеток кишечной палочки на примере метода получения гамма-аминомасляной кислоты.....	132
3.4. Механизм продукции фенилаланина ауксотрофными по тирозину и аналогорезистентными мутантами <i>C. glutamicum</i>	137
3.4.1. Механизм продукции фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами <i>C. glutamicum</i>	140

3.4.2.	Механизм продукции фенилаланина мутантами <i>C. glutamicum</i> , устойчивыми к структурным аналогам фенилаланина.....	145
3.4.3.	Возможности дальнейшего повышения продукции фенилаланина.....	150
3.4.4.	Роль плазмидной амплификации гена <i>pheA</i> на продукцию фенилаланина	
3.4.5.	Мутация в гене <i>pheA</i> <i>C. glutamicum</i> , вызывающая десенсбилизацию префенадегидратазы к ингибированию фенилаланином.....	154
3.4.6.	Деградация фенилаланина клетками <i>C. glutamicum</i>	160
3.5.	Изучение путей дегградации треонина у <i>Escherichia coli</i>	164
3.5.1.	Транспозонное блокирование гена <i>tdh</i> , кодирующего треониндегидрогеназу, и использование полученной мутации в улучшении плазмидных продуцентов треонина.....	168
3.5.2.	Генетическое картирование индуцированной транспозоном <i>Tn5</i> мутации, блокирующей треониндегидрогеназу у <i>E. coli</i> K-12.....	172
3.5.3.	Поиск ферментов, участвующих в дегградации треонина в клетках <i>E. coli</i> K12.....	174
3.5.4.	Вклад трех путей метаболизации треонина в дегградацию треонина клетками <i>E. coli</i> K12.....	177
3.6.	Исследование пути биосинтеза цистеина у <i>Escherichia coli</i> с точки зрения создания продуцентов этой аминокислоты.....	182
3.6.1.	Регуляция активности 3-фосфоглицератдегидрогеназы <i>E. coli</i>	185
3.6.2.	Каталитические свойства 3-фосфоглицератдегидрогеназы <i>E. coli</i>	187
3.6.3.	Сходные механизмы катализа у других микроорганизмов.....	194
3.6.4.	Десенсбилизация O-серинацетилтрансферазы к ингибированию цистеином для создания продуцента цистеина на основе <i>E. coli</i>	196
3.6.5.	Ассимиляция тиосульфата в биосинтезе цистеина клетками <i>E. coli</i>	202
3.6.6.	Исследование роли гена <i>udjN</i> в усвоении S-сульфоцистеина.....	209
3.6.7.	Исследование роли гена <i>udgR</i> в усвоении O-ацетилсерина.....	215
	Заключение.....	222
	Список литературы.....	231

Список сокращений:

- АКБ – 2-амино-3-кетобутират
АС – О-ацетилсерин
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГГ (2-ГГ) – 2-гидроксиглутаровая кислота
ГДК – глутаматдекарбоксилаза
Глу – глутаминовая кислота, глутамат
ГПКБ – глутаматпродуцирующие коринебактерии
КГДК – 2-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс
ЖК – жирная(ые) кислота(ы)
2-КГ – 2-кетоглутаровая кислота
мФФ – мета-фторфенилаланин
МЧК – механочувствительный канал
ОАС – О-ацетилсеринсинтаза
пФФ – пара-фторфенилаланин
ПГ – пептидогликан
СТГМ – серинтрансгидроксиметилаза
СЦ – S-сульфоцистеин
ТА – треонинальдолаза
ТД – треониндезаминаза
ТДГ – треонидегидрогеназа
ФГД – 3-фосфоглицератдегидрогеназа
ФГП – 3-фосфогидроксипируват
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
С.g. – *Corynebacterium glutamicum*
РВР – пенициллин-связывающий белок

Введение

Актуальность исследования. Аминокислоты, строительные блоки белков, являются важнейшими компонентами питания животных и человека. Обладая широким разнообразием в питательной ценности, вкусе, воздействии на организмы, в химических свойствах, они находят применение в качестве добавок в корм сельскохозяйственных животных, добавок в пищу человека, при создании лекарственных препаратов и косметики, а также полимерных материалов. По мере появления новых сфер применения аминокислот потребность в них быстро нарастает, стимулируя развитие технологий их производства. Мировое производство аминокислот суммарно превышает сейчас 6 млн тонн в года, а глобальный рынок превышает 12 миллиардов долларов. Большинство экспертов оценивает ежегодный прирост производства в 5-10% и ожидают, что к 2020 году объем рынка аминокислот превысит 20 млрд. долларов США. Наибольшую долю (более половины) в производстве занимают так называемые кормовые аминокислоты (лизин, метионин, треонин, триптофан). Второй по объему сегмент рынка аминокислот – это рынок усилителей вкуса (глутамат) и аминокислоты, используемым для синтеза заменителя сахара – аспартама (аспаратат и фенилаланин).

В промышленных масштабах почти все аминокислоты (за исключением метионина) получают с помощью микробиологических процессов, методом ферментации, с использованием относительно дешевого углеводного сырья. Исторически первый промышленный процесс получения аминокислоты (60-е годы) был основан на способности найденного в природе микроорганизма (*Corynebacterium glutamicum*) продуцировать глутаминовую кислоту при использовании определенных сред. Для производства всех остальных аминокислот потребовалось получать всевозможные мутации, чтобы вызвать сверхпродукцию желаемой аминокислоты. Эти мутации вызывают нарушения

регуляции экспрессии генов, приводя к резко повышенному уровню синтеза ферментов пути биосинтеза, а также к утрате чувствительности важнейших ферментов к ингибированию конечными продуктами.

Новым этапом развития микробных продуцентов аминокислот явилось внедрение методов генной инженерии в конструирование продуцентов. Уже в 1978 году с участием автора данной работы был получен продуцент треонина на основе кишечной палочки *Escherichia coli*. Гены треонинового оперона, кодирующие мутантные ферменты, десенсибилизированные к ингибированию треонином, были амплифицированы путем их клонирования на мультикопийной пламиде. Успех данной работы предопределил использование кишечной палочки *Escherichia coli* в качестве продуцента аминокислот, а не только *S. glutamicum*, как это было ранее.

Конструирование современных продуцентов – это генетическая перестройка метаболизма, которая приводит к превращению бактерий в биохимическую машину, метаболизм которой подчинен одной цели – продукции желаемой аминокислоты с минимальными затратами на все остальные жизненно важные процессы к клетке. Оптимизируются следующие процессы: потребление из среды источников углерода и азота, центральный метаболизм (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса), собственно путь биосинтеза целевого продукта, экспорт целевой аминокислоты из клеток в культуральную жидкость. Кроме того, блокируются пути возможной деградации целевой аминокислоты, а также ее предшественников, устраняются транспортные белки, способные выделять в среду предшественники целевого продукта, и, наоборот, усиливается экспрессия белков, импортирующих из среды выделившиеся в нее молекулы предшественников. Для решения этих задач меняется экспрессия соответствующих генов от полной блокировки их активности до сверхэкспрессии, включая поиск промежуточного оптимального уровня экспрессии. Десенсибилизация ферментов собственно пути биосинтеза желаемой аминокислоты к ингибированию конечным продуктом достигается как отбором

мутантов, устойчивых к аналогам этой аминокислоты, так и методами белковой инженерии, основанными на сайт-специфическом мутагенезе. В настоящей работе продемонстрировано использование современных методов конструирования продуцентов аминокислот на ряде примеров получения актуальных в настоящее время штаммов-продуцентов, предназначенных для промышленного применения.

Цель исследования. Разработка и использование методов усовершенствования продуцентов аминокислот на основе *S. glutamicum* (фенилаланин, гамма-аминомасляная кислота) и *E.coli* (треонин, цистеин). Минимализация побочной продукции и биохимической деградации целевых аминокислот.

Задачи исследования:

- Разработать и применить методы пермеабилзации клеток *S.glutamicum* и *E.coli* для их использования при изучении свойств аллостерических ферментов и в целях биоконверсии глутаминовой кислоты в гамма-аминомасляную.
- Разработать и применить метод пенициллинового обогащения применительно к *S.glutamicum* для селекции негативных мутаций.
- Учитывая арогенатный путь биосинтеза тирозина у *S.glutamicum*, объяснить механизм продукции фенилаланина мутантами по гену *tyrA* и предложить пути усиления продукции фенилаланина.
- Исследовать деградацию фенилаланина *S.glutamicum* и генетический контроль этого процесса, найти подходы к ее устранению.
- Изучить генетический контроль деградации треонина клетками *E.coli* с целью предотвращения деградации продуцентами этой аминокислоты. Сконструировать продуценты треонина, не деградирующие треонин с участием треониндегидрогеназы. Оценить вклад 3-х путей метаболизации треонина в деградацию этой аминокислоты, присутствующей в культуральной жидкости.
- Основываясь на структуре активного центра ключевого фермента биосинтеза цистеина, O-серинацетилтрансферазы, чувствительного к

конкурентному (по отношению к серину) ингибированию цистеином, методом сайт-специфического мутагенеза получить мутанты, утратившие чувствительность к ретроингибированию, но полностью сохранившие каталитическую активность. Использовать полученные мутации при создании продуцентов цистеина.

- Исследовать природу накопления 2-гидроксиглутаровой кислоты, О-ацетилсерина, S-сульфоцистеина при продукции цистеина продуцентами этой аминокислоты, полученными на основе *E.coli*, и найти способы минимализации накопления указанных веществ.

Научная новизна

- Разработан и использован новый метод пенициллинового обогащения (комбинирование действия пенициллина и лизоцима) мутантами культуры *C.glutamicum*.

- Разработан и использован новый метод пермеабиллизации клеток *C.glutamicum* с помощью грамицидина С, позволяющий проводить измерения ферментативной активности ферментов, свойства которых нарушаются при применении обычных способах разрушения клеток

- Разработан и использован термический метод пермеабиллизации клеток *E.coli*, технологически приемлемый для биоконверсии глутаминовой кислоты в гамма-аминомасляную кислоту при высокой активности глутаматдекарбоксилазы. На данный метод получен патент РФ, научная статья с описанием метода имеет более 70 цитирований.

- Показано, что тирозиновые ауксотрофы *C.glutamicum* продуцируют не фенилаланин, как предполагалось ранее, а арогенат, который при подкислении среды неферментативно превращается в фенилаланин.

- Обнаружена деградация фенилаланина клетками *C.glutamicum*. Ауксотрофность по тирозину в результате блокирования гена *tyrA* предотвращает деградацию фенилаланина клетками *C.glutamicum*.

- Впервые блокирован ген, кодирующий треонидегидрогеназу *E.coli*, и определено его местоположение на генетической карте.
- Впервые сконструирован продуцент треонина на основе *E.coli*, у которого блокирована деградация треонина, инициируемая треониндегидрогеназой.
- Впервые показано, что серинтрансгидроксиметилаза (ген *glyA*) *E.coli*, участвует в деградации треонина.
- Предложен новый механизм продукции 2-гидроксиглутаровой кислоты клетками *E.coli* с участием 3-фосфоглицератдегидрогеназы, объясняющий накопление этого вещества продуцентами цистеина.
- Показано, что восстановление S-сульфоцистеина до цистеин клетками *E.coli* катализирует глутаредоксин С (ген *grxC*). Повышенная экспрессия гена *grxC* увеличивает продукцию цистеина продуцентами цистеина при использовании тиосульфата в качестве источника серы.
- Показано, что S-сульфоцистеин поглощается клетками *E.coli* с помощью трансмембранного белка YdjN.
- Показано, что известный экспортер дипептидов YdgR участвует в транспорте предшественника цистеина O-ацетилсерина.

Теоретическая значимость работы. Представляются теоретически значимыми следующие результаты работы:

- Продукция фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *S. glutamicum* происходит арогенатным путем: накапливается арогенат, а не фенилаланин.
- Установлено положение на генетической карте *E.coli* гена *tdh*, кодирующего треониндегидрогеназу
- Треонинальдолазная активность в *E.coli* обусловлена вторичной активностью серинтрансгидроксиметилазы (ген *glyA*) и участвует в деградации треонина.
- Предложен механизм первой реакции в пути биосинтеза серина в *E.coli*, катализируемой 3-фосфоглицератдегидрогеназой (ген *pegA*), объясняющий

неизбежность продукции этим ферментом 2-гидроксиглутарата. 3-фосфоглицерат окисляется за счет восстановления 2-кетоглутарата до 2-гидроксиглутарата.

- ген *udjN* кодирует трансмембранный белок-транспортер, импортирующий S-сульфоцистеин из среды.
- Фермент глутаредоксин C участвует в превращении предшественника цистеина, S-сульфоцистеина, в цистеин в клетках *E.coli*.

Практическая значимость работы.

- Предложены генетические и биохимические методы исследования глутаматпродуцирующих бактерий (*C.glutamicum*) для селекции негативных мутантов (метод обогащения), а также для определения чувствительности аллостерических ферментов к ингибированию конечными продуктами биосинтеза (пермеабиллизация клеток с помощью антибиотика грамицидина C).
- Разработан метод промышленного получения лекарственного препарата (гамма-аминомасляная кислота), основанный на рекомбинатном продуценте фермента, катализирующего декарбоксилирование глутамата с образованием гамма-аминомасляной кислот, предусматривающий получение биомассы продуцента с последующей технологичным методом активации клеток термической обработкой.
- Блокирование наиболее важного пути деградации треонина с участием треониндегидрогеназы привело к созданию эффективных продуцентов треонина, которые нашли применение в производстве треонина на всех предприятиях, производящих эту аминокислоту в качестве добавки в корм скота.
- Десенсibilизация серинацетилтрансферазы, ключевого фермента биосинтеза цистеина, привело к созданию продуцентов этой аминокислоты, которые используются для получения цистеина в производстве (Япония).
- Обнаружение участия глутаредоксина C в процессе превращения S-сульфоцистеин в цистеин и сверх-экспрессия этого белка позволило существенно улучшить промышленную продукцию цистеина при использовании тиосульфата в качестве источника серы.

Методология и методы исследования

Достоверность научных положений и выводов, сформулированных в работе, обеспечивается использованием комплекса современных методов генетики и селекции микроорганизмов, включающих методы генной инженерии и биоинформатики. Используются также современные методы физико-химического анализа продуктов метаболизма: тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC), автоматические хроматографы, методы радиоавтографии. Применялись современные методы ферментации в лабораторных ферментерах, оборудованные автоматической системой поддержания параметров ферментации. Достоверность результатов работы подтверждается также получением российских и зарубежных патентов на изобретения, которые проданы по лицензионным соглашениям ряду зарубежных биотехнологических компаний и используются ими в промышленности получения аминокислот.

Положения, выносимые на защиту:

- Метод обогащения негативными мутантами культуры *C.glutamicum*, предназначенный для научных исследований данного микроорганизма.
- Методы пермеабиллизации клеток *C.glutamicum* и *E.coli*, предназначенные для научных исследований и использования в биотехнологической промышленности.
- Механизм продукции фенилаланина у ауксотрофных по тирозину и аналогорезистентных мутантов *C.glutamicum*, учитывающий арогенатный путь биосинтеза. Феномен деградации фенилаланина клетками *C.glutamicum*.
- Обнаружение гена, кодирующего треониндегидрогеназу в *E.coli* (ген *tdh*), определение положения гена *tdh* на генетической карте, инактивация гена *tdh* инсерцией транспозона Tn5, использование данной инактивации для улучшения продукции треонина плазмидными продуцентами треонина и для снижения накопления продуктов деградации треонина.

- Обнаружение пути деградации треонина с участием сернитрансгидроксиметилазы (ген *glyA*) и оценка роли этого пути в деградации треонина.
- Гипотеза о механизме реакции ключевого фермента пути биосинтеза серина и цистеина, 3-фосфоглицератдегидрогеназы, *E.coli* (ген *serA*), предусматривающего обязательное образование 2-гидроксиглутаровой кислоты из 2-кетоглутаровой кислоты в ходе этой реакции.
- Получение мутантов в гене *cysE* кишечной палочки, кодирующем серин-О-ацетилтрансферазу, путем сайт-специфического мутагенеза в каталитическом центре с целью устранения ретроингибирования цистеином и создания продуцентов цистеина.
- Ферментативная природа восстановления S-сульфоцистеина до цистеина с участием ряда белков-глутаредоксинов и использование сверх-экспрессии генов, их кодирующих, для улучшения продукции цистеина продуцентами этой аминокислоты.
- Участие трансмембранных белков YdjN и YdgR в поглощении клетками *E.coli*, соответственно, S-сульфоцистеина и O-ацетилсерина, предшественников цистеина, и их использование для улучшения продукции цистеина.

1. Обзор литературы

1.1. Появление промышленного получения аминокислот методом ферментации

Первой аминокислотой, которую начали производить промышленными методами, была глутаминовая кислота в виде натриевой соли – глутамат натрия. Потребность в этом веществе появилась после исследований японского химика Кикунэе Икеда в начале 20 века [1]. Он обратил внимание, что бурые водоросли *Laminaria japonica*, которые японцы традиционно использовали в пищу (суп даши) и в качестве вкусовой добавки к рису, обладают характерным вкусом, который нельзя отнести к известным в то время 4 вкусам (кислый, горький, соленый, сладкий) или их комбинации. Он назвал этот пятый вкус «умами» (в переводе на русский – деликатесный), подразумевая под этим, что это вкус мяса или рыбы. Отвар этих водорослей сообщал относительно безвкусной еде мясной или рыбный вкус. Анализируя состав этих водорослей, он идентифицировал вещество, ответственное за вкус умами, - это была уже известная в то время глутаминовая кислота, открытая сорока годами ранее. Оказалось, что вкусом умами обладает только отрицательно заряженный ион глутаминовой кислоты (далее Глу), который присутствует в щелочных растворах и которого практически нет в нейтральной среде. В частности, добавление уксуса полностью устраняло вкус умами за счет образования неионизированных молекул Глу катионной формы, которая обладает соленым и кислым вкусом. Вкус умами довольно силен: он ощущается в разбавлении глутамата натрия водой в отношении 1 к 3000, тогда как вкус сахара или соли ощущается человеком только при разбавлении меньшим, чем 1 к 200 и к 400, соответственно. В 80-х годах XX-го века было обнаружено, что инозинмонофосфат (ИМФ) и гуанозинмонофосфат (ГМФ) усиливают вкус умами [2].

По мнению Икеды, тот факт, что человек распознает и считает привлекательным вкус иона Глу, указывает на то, что эта способность возникла в процессе эволюции как важный фактор в поисках белковой пищи и, прежде всего,

мяса и рыбы. Ведь Глу, одна из самых распространенных в белках, всегда присутствует в свободном виде в животных тканях. Если растительная пища привлекательна для человека за счет ее сладкого или кислого вкуса, то животная пища привлекает человека своим вкусом иона Глу, или умами.

Недавними исследованиями обнаружены вкусовые рецепторы, реагирующих на присутствие иона Глу, mGluR4 [3], T1R1 и T1R3 [4, 5]. Интересно, что у мышей найдены гомологичные белки, но они ощущают вкус многих аминокислот, тогда как человеческие гомологичные рецепторы специфичны только для Глу.

Человек потребляет высококалорийные продукты в виде жиров, полисахаридов и белков. Все они безвкусны, однако некоторые отщепляющиеся от них индивидуальные вещества обладают вкусом. Сладкий вкус – это вкус моно- и дисахаридов, отщепляющихся из крахмала, что придает вкус всему полисахариду, например, крахмалу муки или картофеля. Точно также вкус умами вызывает аппетит при употреблении мяса или рыбы, за счет вкуса наиболее распространенной в белках выщепленной из их состава свободной Глу. Добавка глутамата натрия дают желаемый вкусовой эффект в узком диапазоне концентраций – от 0,1 до 0,8% от веса продукта, что соответствует количеству Глу в большинстве продуктов. Вкус, придаваемый глутаматом натрия, самолимитируемый. Это означает, что выход за указанный диапазон концентраций приводит к исчезновению вкусового эффекта. Отметим, что оптимальная концентрация поваренной соли в супах около 1%, если концентрация ниже 0,8%, то такой суп оценивается как недосоленный, а в концентрации более 1,2% - пересоленный. В то же время, оптимальная концентрация глутамата натрия в супах – 0,2%-0,3%, т.е. настолько мала, что не может внести дисбаланс в солевой обмен человека.

Два нуклеотида, инозинмонофосфат и гуанинмонофосфат в виде их динатриевых солей в следовых количествах усиливают вкусовой эффект

глутамат натрия в 6 - 8 раз, что позволяет использовать еще более низкие концентрации глутамата для появления вкуса умами.

К.Икеда запатентовал метод получения Глу путем гидролиза животных и растительных белков и, в частности, глютена из зерна пшеницы, в составе которого массовая доля Глу достигает 25%. Она предназначалась для приготовления приправ, улучшающих вкус бедной белками растительной пищи. Этот метод немедленно стал использоваться для получения вкусовой добавки, получившей в 1909 году наименование Аджи-но-мото, которое была зарегистрировано как торговая марка.

В последствие разрабатывались и альтернативные методы получения Глу, не получившие широкого применения. В тридцатые годы небольшие количества Глу получали из отходов сахарного и спиртового производства на основе сахарной свеклы, которые содержали циклизованную форму глутамина, пироглутамовую кислоту. Отходы подвергали щелочному гидролизу, а затем подкисляли раствор до рН 3,2 (изоэлектрическая точка Глу), и Глу выпадала в осадок.

В 50-е годы был разработан химический метод синтеза Глу (смесь L- и D-форм) из акрилонитрила. В то время был уже внедрен метод получения акрилонитрила в Японии, и себестоимость акрилонитрила стала приемлемой для производства Глу [6]. В этом процессе акрилонитрил подвергался действию синтез-газа (смесь водорода и угарного газа) для синтеза 2-аминопентандинитрила, из которого в процессе щелочного гидролиза освобождалась DL-Глу. Извлечение из смеси L-формы оказалось сложным и дорогим процессом. Пионером в этой области стала фирма Аджиномото (Ajinomoto), разработавшая эффективный способ выделения [7], который был запущен в производство в 1963 году после 12 лет разработки. Объем производства Глу этим методом достигал 12 тыс. тонн в год, но был через 10 лет вытеснен методом микробиологической ферментации [8].

Явным преимуществом нового метода было то, что продуктом этого процесса являлась только L-форма Глу. Этот метода разработан японской компанией Kyowa Hakko Kogyo Co Ltd. Исследователи микробиологической лаборатории этой компании выделили целый ряд микроорганизмов, способных синтезировать Глу, из которых наиболее эффективным продуцентом оказался микроорганизм, названный *Micrococcus glutamicus* в сообщении Киношита с соавторами в 1957 году [9, 10]. Этот микроорганизм синтезировал 0,25 молей Глу из одного моля глюкозы.

Позднее микробиологи фирмы Ajinomoto выделили очень похожие микроорганизмы, дав им другие наименования *Brevibacterium flavum* и *Brevibacterium lactofermentum*. Эти глутамат-продуцирующие бактерии представляли собой неподвижные грамм-положительные неспорулирующие палочки. Их отнесли по морфологии клеток к коринебактериям, то есть узловатым (неодинаковым по толщине) палочкам (в переводе с греческого), известным представителем которых является *Corynebacterium diphtheriae*, возбудитель дифтерии. Важнейшей особенностью этих бактерий была потребность в биотине, так как продукция Глу наблюдалась лишь при лимитации по этому витамину при росте на глюкозе или сахарозе [11], тогда как при использовании сахарной мелассы, которая содержит биотин, продукция Глу подавлялась. Эту проблему удалось решить путем добавления в ферментационную среду с мелассой поверхностно активных веществ, представляющих собой эфиры жирных кислот [12]. Интересно также, что добавление в ферментационную среду пенициллина в субтоксических концентрациях [13], нарушающего синтез клеточной стенки бактерий, вызывала продукцию Глу. Значительно позднее обнаружилось противотуберкулезный препарата этамбутол, который ингибирует синтез клеточных стенок у возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, также способен вызвать продукцию Глу [14], однако этамбутол в отличие от пенициллина никогда не использовался при промышленном получении Глу. Использование мутантных штаммов, нуждающихся в глицерине [15] или в

олеиновой [16] кислоте также позволяло использовать мелассу в качестве источников углерода для синтеза Глу.

1.2. Гипотеза И. Шийо о механизме продукции глутаминовой кислоты глутаматпродуцирующими коринебактериями

Приведенные выше данные указывали на то, что продукция Глу ГПКБ-ми вызывалась каким-то повреждением клеточной стенки. Первоначально в 60-е годы была общепринятой гипотеза И. Шийо о том, что происходит «протечка» Глу через неполноценную мембрану при лимите по биотину [17]. Было показано также, что при выращивании *B. flavum* в ферментационной среде с глюкозой, содержащей биотин в концентрации (30 мкг), при которой синтез Глу не происходил, добавление пенициллина G (от 1 до 10 ед./мл), вызывало накопление Глу. Максимальный эффект наблюдался, когда антибиотик добавляли к уже накопившейся биомассе, а не в исходную среду, так как пенициллин сильно блокировал рост [13].

Приблизительно тот же уровень продукции, что и при голодании по биотину, наблюдался при добавлении в среду неионного детергента Tween 60 [14, 18], гидрофобная часть которого представляла собой остаток стеариновой кислоты, а гидрофильная состоит из полисорбитана (продукт дегидратации спирта сорбита), содержащего большое количество гидроксильных групп). Одновременно были испытаны другие детергенты из группы твинов: Tween 40 (эфир пальмитиновой кислоты), Tween 20 (эфир лауриновой кислоты), Tween 80 (эфир олеиновой кислоты), и оказалось, что только Tween 40 был также эффективен, как Tween 60. Ясного объяснения различного действия этих препаратов нет до сих пор, хотя они использовались при промышленном получении Глу на мелассных средах, содержащих биотин. Предполагали, что эти детергенты препятствуют действию ферментов, участвующих в сборке компонентов клеточной стенки, тем самым подобно пенициллину ослабляя ее структуру. Интересно, хотя и ожидаемо, что добавление в среду олеиновой

кислоты вместо биотина позволяло культуре расти и продуцировать Глу, если концентрации олеиновой кислоты была ниже оптимальной для роста, как это наблюдалось при добавлении биотина в среду. Выращенные и отмытые клетки не продуцировали Глу при действии на них указанных факторов, а имело значение только то, в каких условиях они были выращены: при дефиците биотина или при его избытке.

Полученные Шийо с соавторами результаты привели к созданию гипотезы о механизме продукции Глу при дефиците биотина в среде (так называемая «leak model», иногда “leakage model”) [11, 19]. Биотин служит простетической группой ацетил-КоА-карбоксилазы, катализирующей реакцию первого этапа синтеза всех жирных кислот, и поэтому его дефицит должен сокращать синтез фосфолипидов мембран клеток. Обнаруженный эффект олеиновой кислоты на рост клеток и продукцию Глу, а также действие поверхностно-активных веществ и пенициллина, вызывающих продукцию, указывают на то, что в результате неполноценности клеточной стенки или мембраны происходит протекание Глу из клеток в среду по механизму пассивной диффузии [20, 21]. При этом должно происходить снижение внутриклеточной концентрации Глу, что усиливает его синтез соответствующими ферментами, происходит перенаправление биосинтеза для пополнения ее пула, что и вызывает сверхсинтез. В годы создания этой гипотезы считалось, что ЦТК у ГПКБ разорван : активность 2-кетоглутаратдегидрогеназы (КГДГ) не обнаруживалась при измерениях. Отсюда следовало, что весь пул 2-кетоглутарата (2-КГ) аминируется с образованием Глу [22, 23], что, как полагали, и является причиной продукции Глу. Однако тем же исследователям позднее удалось обнаружить эту недостающую активность, стабилизировав этот белок добавлением глицерина, ионом магния и тиамином [24]. Тогда возник вопрос: почему 2-КГ не окисляется в ЦТК под действием КГДГ и последующих ферментов цикла, а аминируется и выделяется в среду в виде Глу. Ответ на этот вопрос был дан следующий (Рис. 1). За этот субстрат конкурируют КГДГ и глутаматдегидрогеназа (ГД), которая катализирует

восстановительное аминирование 2-КГ с образованием Глу. Константы Михаэлиса для 2-КГ равны соответственно 0,08 и 5,7 мМ, т.е. сродство КГДГ к субстрату гораздо выше. Однако, максимальные скорости реакций (при насыщении субстратом) равны 0,0150 мкмоль/мин/мг белка и 2,36, соответственно. Таким образом, преимущественное направление превращения 2-КГ зависит от его внутриклеточной концентрации. Расчеты показывают, что при

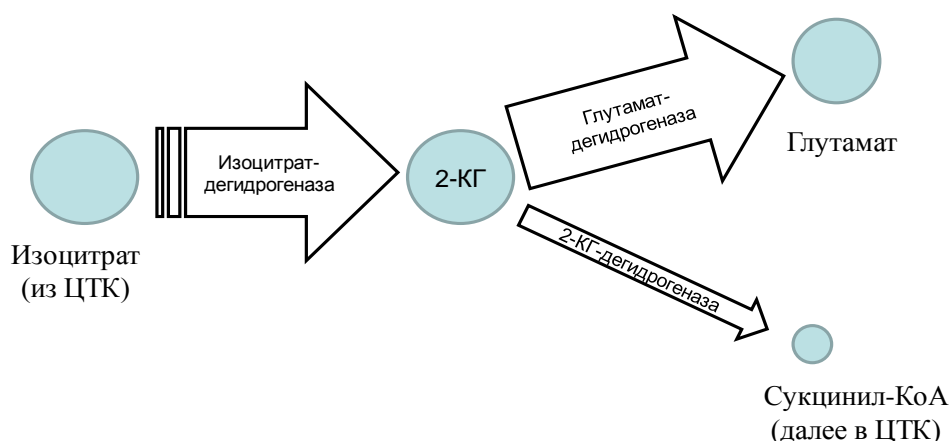


Рис.1. Преимущественное направление превращения 2-кетоглутарата в глутамат под действием глутаматдегидрогеназы при высокой концентрации 2-кетоглутарата во внутриклеточном пуле (в соответствии с «leak model»).

концентрации 2-КГ 10 мМ, 1 мМ и 0,1 мМ аминирование (ГД) будет превышать окисление (КГДГ) соответственно в 95, 24 и 4,6 раз. Эти рассуждения подкрепляли ранее высказанную гипотезу о протечке Глу через поврежденную (измененную) мембрану в результате дефицита жирных кислот, действия пенициллина и некоторых детергентов.

Итак, продукцию Глу ГПКБ можно вызвать тремя основными способами:

- 1) поддержанием низкой (субоптимальной) концентрации биотина в ферментационной среде;
- 2) при оптимальной или превышающей её концентрации биотина продукция вызывается внесением в ферментационную среду поверхностно активных

веществ, содержащих некоторые жирные кислоты (пальмитиновую или стеариновую), а также внесением самих жирных кислот (далее ЖК);

3) внесением в ферментационную среду антибиотиков, действующих на синтез клеточной стенки (пенициллин).

С точки зрения “leak model” относительно лимитации биотина учитывается следующее. Биотин является кофактором ацетил-КоА-карбоксилазы, катализирующей первый этап в синтезе ЖК, при этом некоторые ЖК, такие как олеиновая кислота, могут заменить биотин и компенсировать эту недостаточность для роста. Следовательно, доступность биотина влияет на качество мембран, тем самым регулируя проницаемость Глу через клеточную мембрану во внешнюю среду. Продукция Глу при добавлении в среду поверхностно-активных веществ или пенициллина объясняет увеличение проницаемости через клеточную мембрану тем, что происходят изменения клеточной стенки. Пенициллин, хотя и не подавляет синтез самих ЖК, действует на синтез клеточной стенки в целом, ингибируя синтез каркаса клеточной стенки – пептидогликана (см. ниже), что и приводит к нарушению цитоплазматической мембраны.

Эти общие соображения не были подтверждены прямыми измерениями проницаемости клеточных мембран в отношении Глу в указанных условиях. Кроме того, не было никакой информации на уровне генов, что было бы ключевым фактором, разъясняющим эту модель.

1.3. Таксономическое положение ГПКБ

В 50-е годы исследователи японской компании Kyowa Hakko выделили из природных субстратов первый микроорганизм, способный продуцировать Глу в условиях дефицита необходимого для роста биотина, и дали ему название *Micrococcus glutamicus* [25]. В 1967 году этот микроорганизм на основании современного тому времени таксономическому исследованию был перенесен в род *Corynebacterium* с наименованием вида “*glutamicum*” (Рис. 2) [26]. Несмотря на существования многих патогенных микроорганизмов, также отнесенных к

этому роду, включая возбудителя дифтерии, это наименование сохранилось до настоящего времени, поскольку более поздние таксономические изучения этого микроорганизма подтвердили правильность отнесения его к роду *Corynebacterium*.

Вслед за исследователями компании Kyowa Hakko фирма Ajinomoto также объявила об обнаружении микробов, природных продуцентов Глу, которые тоже были ауксотрофными по биотину. Все они были отнесены к роду *Brevibacterium* с различными видовыми названиями : “*divaricatum*” [27], “*lactofermentum*” и “*flavum*” [28]. Сейчас трудно объяснить причины, почему эти родственные микробы были отнесены не только к различным видам, но и родам. Возможно, вопреки научным соображениям были приняты во внимание конкурентные отношения между этими компаниями, а также нежелательность отнесения продуцентов вкусовой добавки к роду *Corynebacterium*, в который были ранее отнесены некоторые патогенные микроорганизмы.

В 80-е годы в результате хемотаксономических исследований продуцентов Глу стала очевидной ошибочность отнесения всех продуцентов Глу с родовым названием *Brevibacterium* к этому роду. В частности, в составе их клеточных стенок были обнаружены миколовые кислоты (продукты конденсации двух молекул ЖК), которые никогда не были обнаружены у видов рода *Brevibacterium* [29]. Кроме того, тейхоевые кислоты, всегда присутствующие в клеточных стенках бактерий рода *Brevibacterium* [30], отсутствуют у продуцентов Глу. При этом у последних в составе клеточной стенки присутствует полисахарид арабиногалактан, что присуще роду *Corynebacterium* и родственных ему родам, например, микобактериям [31]. Далее, ГЦ состав хромосомной ДНК у продуцентов Глу, определяемый по температуре плавления, составлял 52 – 56%, тогда как у истинных представителей рода *Brevibacterium* процент ГЦ пар был значительно выше (60 – 67 мольных %) [32]. С другой стороны, все эти особенности были характерны для представителей рода *Corynebacterium*, к которому ранее уже был отнесен *Micrococcus glutamicus*. Первые результаты по

секвенированию ДНК также свидетельствовали в пользу близости этих продуцентов к роду *Corynebacterium*. Так, в секвенированном фрагменте хромосомы *Brevibacterium flavum*, содержащем ген *thrB*, было найдено только одно различие, приводящее к аминокислотной замене, при сравнении с соответствующей последовательностью *C. glutamicum*. [33, 34].

Окончательно вопрос о родовой и видовой принадлежности продуцентов Глу с исходным родовым названием *Brevibacterium* был решен по результатам исследований группы немецких исследователей, которые применили ряд генетических тестов [32]. В частности, они использовали гибридизацию фрагментов ДНК, кодирующих консервативные гены 16S и 23S рибосомной РНК. В результате этих исследований установлено, что между *C. glutamicum* с одной стороны и тремя “видами” *Brevibacterium* (*flavum*, *lactofermentum*, *divaricatum*), нет не только родовых различий, но и видовых. Поэтому предложено отнести указанные микроорганизмы к одному виду *Corynebacterium glutamicum*. Таким образом, штаммы “*Brevibacterium*” являются природными изолятами бактерий вида *Corynebacterium glutamicum* (Рис. 2).

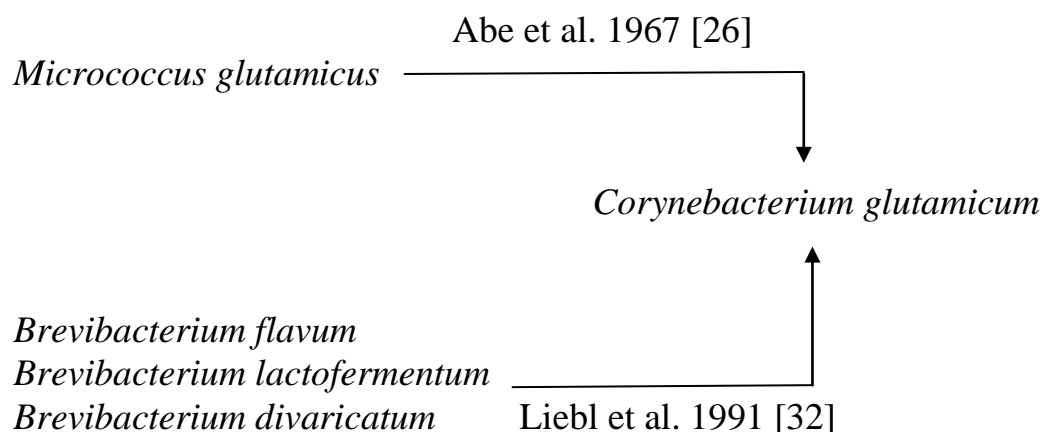


Рис. 2. Изменения названий глутаматпродуцирующих коринебактерий

Ранее аналогичные исследования двух других организмов, первоначально отнесенных к роду *Brevibacterium* (*B. vitarumen* и *B. ammoniagenes*), используемых в качестве продуцентов инозина, привели к их переносу в род *Corynebacterium* с сохранением их видовых наименований [35].

Более поздние исследования с использованием современных методов генной таксономии (построение филогенетических деревьев на основе сравнения последовательностей 16S рРНК и ряда консервативных генов) подтверждают правильность объединения выше указанных микроорганизмов в пределах одного вида *C. glutamicum* [36, 37]. Показано, что микроорганизмы, ранее отнесенные к группе CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*), по хемотаксономическим признакам (особенности структуры пептидогликана, присутствие в клеточной стенке арабинозы, галактозы, миколовых кислот) являются родственными филогенетически. Группа CMN включает в себя кроме трех упомянутых также роды *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella*, *Williamsia*, *Turicella*.

В таксономической работе, результаты которой основаны на иерархической структуре 16S РНК, предложен новый класс Actinobacteria, в который собраны микроорганизмы с более чем 80% идентичностью 16S РНК [37]. Далее идут подклассы, порядки, подпорядки, семейства, содержащие один или несколько

Таксономическое распределение микроорганизмов подпорядка Corynebacterineae в соответствии с уточнениями 2009 года [38]

Семейства	Роды	Некоторые виды
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 <i>Corynebacterium glutamicum</i> R <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
	<i>Turizella</i>	
<i>Dietziaceae</i>	<i>Dietzia</i>	
<i>Segniliparaceae</i>	<i>Signiliparus</i>	
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium leprae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia farcinica</i>
	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia bronchialis</i>
	<i>Millisia</i>	
	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
	<i>Skermania</i>	
	<i>Williamsia</i>	
<i>Tsukamurellaceae</i>	<i>Tsukumurella</i>	<i>Tsukamurella paurometabola</i>

родов. В этой системе к роду *Corynebacterium* ведет следующая последовательность: класс Actinobacteria – подкласс Actinobacteridae – порядок Actinomycetales – подпорядок Corynebacterineae – семейство Corynebacteriaceae.

В подпорядок Corynebacterineae по данной классификации попадают все бактерии, содержащие миколовые кислоты (Табл. 1), роль которой в таксономии была ясна и до этой классификации. Все они имеют уникальную клеточную стенку с дополнительной внешней миколатной мембраной. Их клеточная стенка содержит слой полисахарида арабиногалактана, частично этерифицированного миколовыми кислотами, образующими внешнюю мембрану, напоминающую внешнюю мембрану Грамм-отрицательных бактерий. Сам арабиногалактан ковалентно пришит к нижележащему слою пептидогликана. Такое необычное строение клеточной стенки эволюционно закреплено в подпорядке Corynebacterineae. Что касается самого рода *Corynebacterium*, то к нему в настоящее время относят 88 видов [39], 53 из которых либо патогенны для человека, либо условно патогенны, включая возбудителя дифтерии *Corynebacterium diphtheria*, который считают типовым видом рода. В биотехнологии для производства аминокислот и нуклеотидов используются *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium efficiens* и *Corynebacterium glutamicum*. Наиболее важный среди них - *C. glutamicum*, с помощью которого производится около 3 млн тонн Глу и 1,8 млн тонн лизина ежегодно [40].

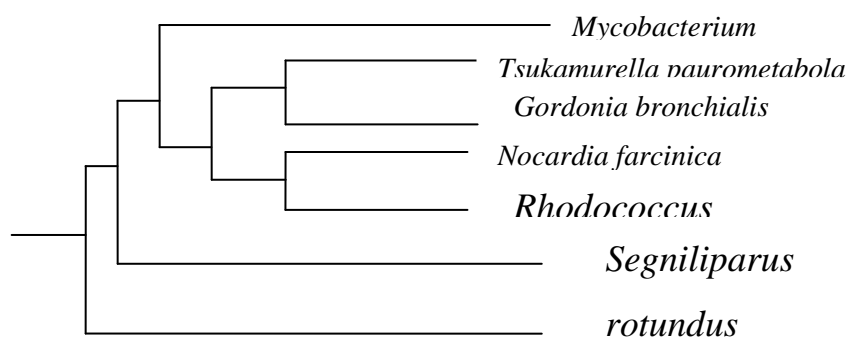


Рис. 3. Филогенетическое древо микроорганизмов подпорядка Corynebacterineae [42].

По мере увеличения числа секвенированных геномов актинобактерий, к которым относятся и бактерии подпорядка *Corynebacterineae*, происходит периодическое уточнение их таксономии, а также становится возможным построение филогенетических схем. На рис. 3 показан участок филогенетического древа родов и некоторых видов подпорядка *Corynebacterineae*, построенного на основании анализа 35-ти консервативных аминокислотных последовательностей некоторых белков [41]. По некоторым оценкам отделение рода *Corynebacterium* от рода *Mycobacterium*, имеющих общего эволюционного предшественника, произошло около 1 млрд лет назад [42], тогда как разделение видов *C. glutamicum* (далее *C.g.*) и *C. diphtertheriae*, относящихся к одному роду – значительно позже.

1.4. Природа недостаточности по биотину у ГПКБ

Как показано выше, продукция Глу у ГПКБ происходит в условиях дефицита по биотину. Основные факторы, вызывающие продукцию Глу, уже упоминалось, а некоторые другие будут показаны ниже. ГПКБ являются природными ауксотрофами по биотину, что связано с отсутствием ряда ферментов пути биосинтеза этого кофактора. Биотин представляет собой серусодержащее гетероциклическое соединение (производное триптофана), имеющее «ножку» - радикал валериановой кислоты (Рис. 4). Карбоксильная группа этой ножки способна образовывать амидную связь с свободной эpsilon-аминогруппой лизина, входящего в состав некоторых белков, карбоксилаз, декарбоксилаз, имеющих соответствующий мотив аминокислотной последовательности в

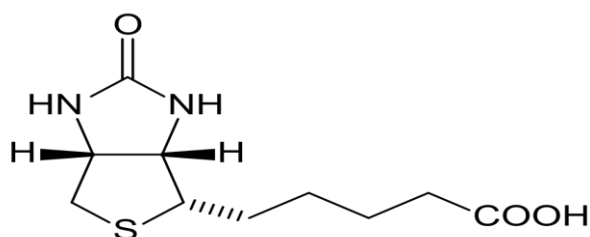


Рис. 4. Структурная формула биотина.

окружении данного высоко консервативного лизинового остатка (биотин-связывающий домен обычно расположен на С-конце) [43]. Для образования этой

связи между биотином и лизиновым остатком необходим фермент биотинлигаза, который у большинства бактерий обладает также и регуляторной функцией: он связывается с промоторной зоной биотинового оперона и регулирует его экспрессию в зависимости от потребности в биотине (транскрипционный репрессор). Эффектором, регулирующим связывание с ДНК, является биотин-аденилат – промежуточный продукт биотинлигазной реакции [44]. У биотинлигазы *S. glutamicum* ДНК-связывающий домен не обнаружен методами биоинформатики. Отсутствие этого домена, видимо, связано с тем что у ГПКБ нет полноценного пути биосинтеза биотина [45], и поэтому отпадает биологический смысл в регуляции этого пути биосинтеза. Тем не менее, биотин-аденилат образуется в ходе реакции биотинилирования и в клетках *S.g.* и, возможно, влияет на конформацию белка биотинлигазы, которая передает каким-то способом информацию о доступности биотина, вызывая продукцию Глу. Эта умозрительная гипотеза не нашла пока подтверждения.

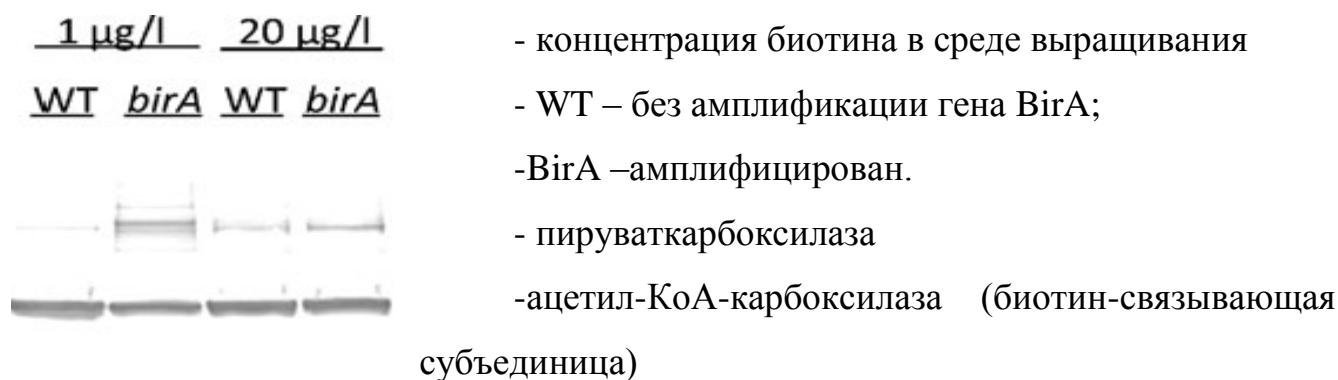


Рис.5. Влияние концентрации биотина в среде роста, а также плазмиды, экспрессирующей ген *birA*, на экспрессию пируваткиназы и биотинсвязывающей субъединицы ацетил-КоА-карбоксилазы *S. glutamicum* по данным Peters-Wendisch с соавт., 2012 [47]

В клетках *S. g.* обнаружено только два белка, связывающих биотин (Рис.5): ацетил-СоА-карбоксилаза (одна из субъединиц) и присутствующая в гораздо меньших количествах пируваткарбоксилаза [46]. Оба белка связывают биотин только под действием биотинлигазы (ген *BirA*), поскольку при делеции

гена *BirA* клетки *S. g.* теряют жизнеспособность [47]. В присутствии плазмиды, экспрессирующей ген *BirA*, усиливается минорная полоса на белковом электрофорезе (SDS-PAAG, окрашивание с помощью белка авидина, связывающегося с биотином, Рис. 5) соответствующая пируваткарбоксилазе (120 кДа). В то же время, ни концентрация биотина, ни амплификация гена *BirA* не сказываются на количестве биотинилированной формы субъединицы ацетил-CoA-карбоксилазы (64 кДа). Однако, при полном отсутствии биотина в среде рост невозможен.

Путь биосинтеза биотина был неизвестен до недавнего времени, и лишь в 2010 году была установлена полная последовательность реакций и соответствующие гены, ответственные за биосинтез биотина у *E.coli* и *Bac. subtilis* [48, 49].

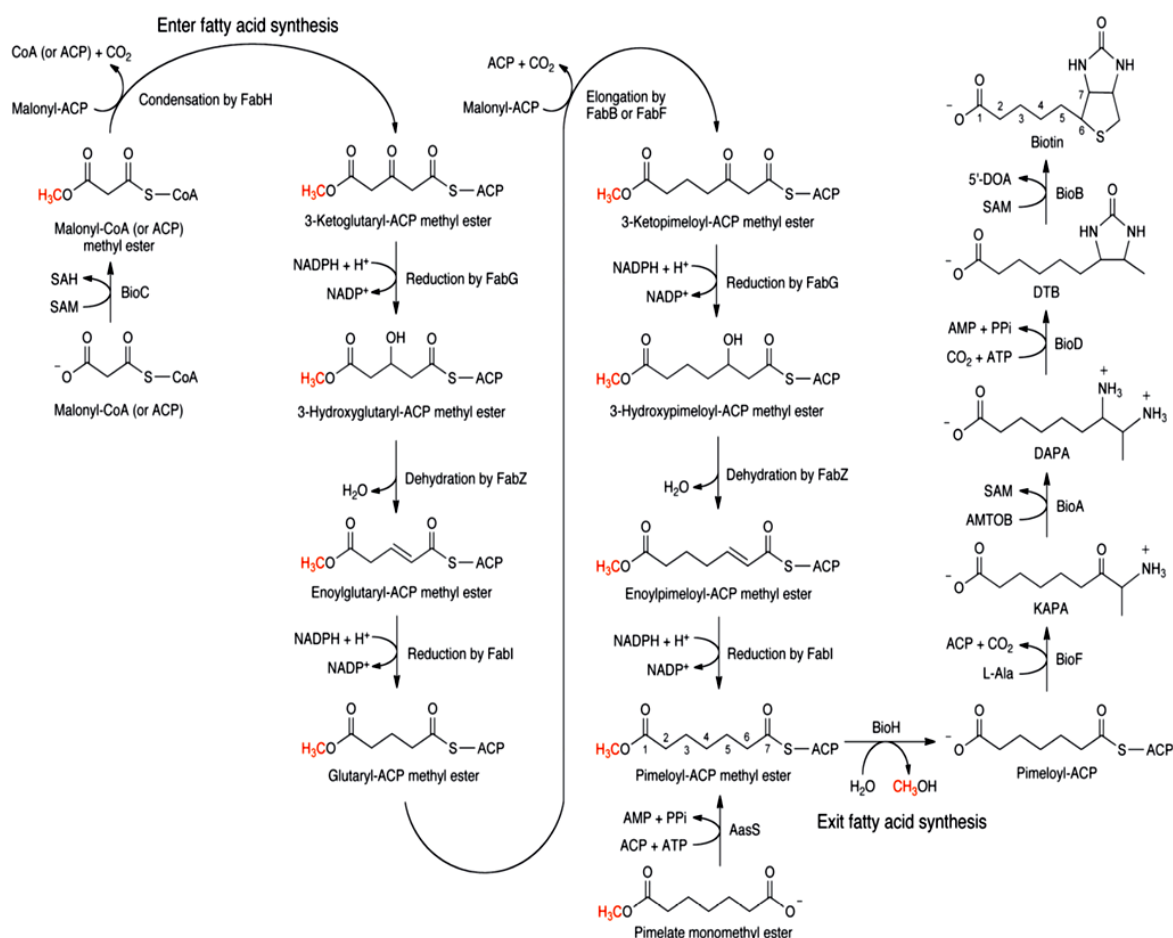


Рис.6. Путь биосинтеза биотина у кишечной палочки [48].

В биосинтезе биотина участвуют ферменты, как специализированные для данного биосинтеза (обозначенные на Рис. 6 как BioC, -H, -F, -A, -D, -B), так и ферменты биосинтеза ЖК (FabH и др.), участвующие в удлинении углеродной цепи. Некоторые ферменты участвуют в двух ферментативных стадиях (FabH, -G, -Z, -I.). Ферменты, соответствующие генам bioC, bioH и bioF, не обнаружены в клетках *S.g.*, с чем и связана недостаточность этого микроорганизма в биотине [50-53]. В то же время, ферменты трех последних стадий (гены bioA, -B, -D) присутствуют, что позволяет использовать дезтиобиотин в качестве недорогого источника биотина для роста этих бактерий в ферментационных средах, не содержащих биотин, например, на глюкозной среде [54]. Для биосинтеза биотина у микроорганизмов, не нуждающихся в биотине, как исходный субстрат используется малонил-КоА, который синтезируется с участием ацетил-КоА-карбоксилазы, которая использует биотин в качестве кофактора.

1.5. Дефицит биотина в первую очередь нарушает синтез жирных кислот.

Выше показано (Рис.5), что только два белка *S. g.* способны ковалентно под действием биотинлигазы (см. выше) присоединять биотин. Первый – это одна из субъединиц пируватдегидрогеназного комплекса, а второй – субъединица АссВС ацетил-КоА карбоксилазы, катализирующей карбоксилирование ацетил-КоА с образованием малонил-КоА. Именно со вторым белком связывают влияние биотина на продукцию Глу ГПКБ. Синтез ЖК у растений, животных и микроорганизмов происходит по общей схеме, отличаясь лишь деталями. Ацетил-КоА-карбоксилаза – ключевой фермент синтеза ЖК, он карбоксилирует ацетил-КоА с образованием малонил-КоА, который необходим для дальнейшего роста цепи.

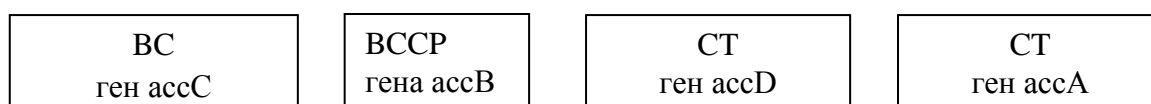


Рис. 7. Субъединицы ацетил-КоА-карбоксилазы из *Escherichia coli* K12.

В *E.coli* ацетил-КоА-карбоксилаза состоит из четырех отдельных белков (Рис. 7), которые образуют три субъединицы этого фермента: гомодимерную биотинкарбоксилазу (ВС, ген *accC*), небольшой белок-переносчик карбоксилированного биотина (ВССР, ген *accB*), а также гетеродимер карбоксилтрансферазы (СТ, гены *accA* и *accD*). Гены *accB* и *accC* котранскрибируются с оперона *accBC* (73,35 мин карты), тогда как гены для карбоксилтрансферазы находятся в противоположной части хромосомы: *accA* - на 4,5, а *accD* на 52,4 минутах.

Ацетил-КоА карбоксилазная реакция ($\text{ацетил-КоА} + \text{CO}_2 + \text{АТФ} = \text{малонил-КоА} + \text{АДФ}$) протекает в два этапа. Сначала биотин, связанный с субъединицей *AccB* (биотинилирование катализирует белок *BigA*, как описано выше), карбоксилируется с участием АТФ под действием фермента биотинкарбоксилазы (ВС, ген *AccC*):



Затем этот карбоксил переносится на ацетил-КоА, образуя малонил-КоА, а биотин возвращается обратно в исходное некарбоксилированное состояние. Этот процесс катализирует карбоксилтрансфераза (СТ, гены *AccA* и *AccD*):



В *S.g.* в отличие от *E.coli* происходит не только синтез ЖК с неразветвленной цепью, предназначенных для включения в цитоплазматические мембраны, но и синтезируются разветвленные ЖК, так называемые миколовые кислоты, из которых состоят внешние миколатные мембраны. Синтез миколовых кислот из ЖК с прямой цепью включает в себя реакцию карбоксилирования и соответственно дополнительно нуждается в специализированных карбоксилирующих ферментах.

В 1996 году было описано клонирование фрагмента хромосомы *S. g.* [55], кодирующего белок (591 аминокислотный остаток, ген *accBC*), имеющий характерный биотин-связывающий участок с N-конца, а также

последовательность, сходную с известными биотин-карбоксил переносящими белками (ВССР) на С-конце. Хотя комплементацию мутации в гене *E.coli* *accC*, продемонстрировать не удалось, так же как и продемонстрировать карбоксилирующую активность *ин витро*, все же авторы пришли к выводу, что ими клонирован ген, кодирующий один из компонентов ацетил-КоА-карбоксилазы, что подтвердилось позднее. Вскоре в ходе селекционной работы по поиску мутантов ГПКБ, способных продуцировать Глу в присутствии биотина, был обнаружен второй пептид ацетил-КоА-карбоксилазы. Предполагалось, что у мутантов, обладающих повышенной чувствительностью к ингибированию роста детергентами, повреждается тот или иной механизм синтеза компонентов клеточной стенки или мембраны, аналогичный изменениям, вызываемым дефицитом биотина или действием пенициллина или твинов. Так были получены мутанты, обладающие повышенной чувствительностью к детергенту твин 40 (поверхностно активное вещество, эфир, содержащий пальмитиновую кислоту), способные к продукции даже в присутствии биотина в мелассных средах, которые содержат биотин [56]. Далее из банка генов дикого штамма *V. lactofermentum* был клонирован фрагмент хромосомы, который устранял повышенную чувствительность к действию детергента [57]. Этот фрагмент содержал ген, названный *dtsR1*, продукт которого обладал значительной гомологией с рядом ацетил-КоА-карбоксилаз. Как оказалось, следом за геном *dtsR1* на хромосоме расположен гомолог этого гена (Рис. 8), отличающийся от гена *dtsR1* тем, что его инактивация не индуцировала продукцию.



Рис.8. Расположение генов *dtsR1* и *dtsR2* на хромосоме *S.g.* [57]

В пределах пептида dtsR1 четко выделяются два домена, сходные с субъединицами AccD и AccA кишечной палочки. Последовательность, соответствующая гену accD кишечной палочки, присутствует в хромосоме *S. g.* как минимум 4 раза, и только та из них, которая входит в ген dtsR1 (обозначаемая accD1), необходима для ацетил-КоА-карбоксилазной активности, т.е. для синтеза неразветвленных ЖК. Делеция гена dtsR1/accD1 вызывает потребность в олеиновой кислоте, а гены accD2 и accD3, как оказалось, предназначены только для синтеза миколевых кислот [58]. Принято обозначать субъединицу, состоящую из пептида AccBC, как α -субъединицу, а пептид dtsR1 (accD1) - как β -субъединицу. Эти субъединицы со-очищаются при попытке выделения одного из этих белков. При этом обнаруживается еще один короткий пептид (ϵ -субъединица), который кодируется открытой рамкой считывания NCgl0676 и примыкает к гену dtsR2. Весь трехкомпонентный комплекс ацетил-КоА-карбоксилазы *S.g.* массой около 800 Кд имеет наиболее вероятную структуру $\alpha\beta\beta\epsilon\beta$. Отметим, что субъединицы AccBC и accD1 входят также в состав ацил-карбоксилазы, участвующей в синтезе миколевых кислот [59].

1.6. Роль белка DTSR1 в продукции глутамата

Идея о том, что ограничение активности ацетил-КоА-карбоксилазы, а не пируваткарбоксилазы, которая также использует биотин в качестве кофермента, является тем фактором, который обуславливает продукцию Глу ГПКБ, нашла подтверждение в исследованиях, в которых изучались мутанты по гену dtsR1, продуцирующие Глу в присутствии биотина. Как уже упоминалось, ГПКБ не способны продуцировать Глу в присутствии биотина (без воздействия пенициллина или детергентов, указанных выше), что осложняет использование относительно дешевого источника углерода – мелассы, поскольку она содержит биотин. Были получены мутанты, которые могут продуцировать Глу даже в присутствии биотина (тотальный отбор с использованием мутагенов). Причины, по которым у них появилась это новое свойство, до сих пор не установлены, но

представляют интерес, поскольку их изучение может пролить дополнительный свет на механизм продукции Глу.

Иногда отбор таких мутантов имел определенный замысел. Было предположено, что у мутантов, обладающих повышенной чувствительностью к ингибированию роста детергентами, может быть поврежден тот или иной механизм синтеза компонентов клеточной стенки или мембраны, аналогичный изменениям, вызываемым дефицитом биотина и действием пенициллина или твинов. Были получены мутанты, обладающие повышенной чувствительностью к детергенту твин40 (поверхностно активное вещество, содержащее пальмитиновую кислоту), способные к продукции Глу на мелассных средах [56].

Кимура с соав. [57] изучали один из таких мутантов. Из банка генов дикого штамма *V. lactofermentum* они клонировали фрагмент хромосомы, который устранял повышенную чувствительность к действию детергента. Этот фрагмент содержал ген, названный *dtsR1*, кодирующий субъединицу ферментного комплекса – ацетил-КоА-карбоксилазу (см. выше), первого фермента биосинтеза ЖК. Амплификация гена *dtsR1* снижала продукцию Глу, когда она происходила при дефиците биотина, при действии пенициллина или при добавлении твина 40. Делеция этого гена, наоборот, вызывала продукцию Глу даже в присутствии биотина. Такой штамм нуждался в олеиновой кислоте или ее эфирах, но не в пальмитиновой (которая входит в состав твин 40) или стеариновой кислотах. Указанные особенности действия гена *dtsR1* нашли практическое применение [56]. Амплификация или усиление экспрессии этого гена позволило снизить побочную продукцию Глу у продуцентов лизина и тем самым улучшить выход целевого продукта. Делеция же гена *dtsR1* или снижение уровня его экспрессии улучшала продукцию Глу на дешевых мелассных средах, которые всегда содержат биотин.

Обнаружилось также, что у мутантов с делецией гена *dtsR1* снижена (на 30%) активность 2-КГДГ [60]. Эти данные указывают на связь голодания по биотину и действие твин 40 на синтез ЖК. Показано также, что внутриклеточный

уровень DtsR1 снижался при лимитации по биотину, а также при обработке твин 40, тогда как пенициллин не вызывал подобного действия [56, 61]. Таким образом, действует какой-то регуляторный механизм, включающийся при лимитации по биотину и вызывающий репрессию синтеза не только DtsR1, но и компонентов КГДК, что и обуславливает продукцию Глу. Этот механизм пока выявить не удалось, однако многое прояснилось в дальнейшем (см. ниже). В частности, транскриптомный анализ (DNA microarray) *S.g.* при лимитации по биотину, при добавлении твин-40 и воздействии пенициллина показал увеличение экспрессии четырех генов, но функции соответствующих белков не известна до сих пор [62]. Снижение уровня экспрессии гена *dtsR* в этих условиях не отмечено, что противоречит вышеупомянутым данным [56]. В то же время, отмечается снижение уровня экспрессии генов, имеющих отношение к гликолизу, пентозофосфатному пути и ЦТК, что должно негативно сказаться на уровне синтеза Глу. Это, однако, не относится к снижению уровня экспрессии генов, кодирующих субъединицы КГДК, что, наоборот, должно способствовать продукции глутамата.

1.7. Биосинтез жирных кислот в клетках *S. glutamicum*

Исходным субстратом для синтеза ЖК является ацетил-КоА как таковой и малоновая кислота, которая также происходит из ацетил-КоА в результате ее карбоксилирования под действием ацетил-КоА-карбоксилазы (см. выше). Малоновая кислота вступает в синтез ЖК, будучи связанной с ацил-переносящим белком (АСР) через атом серы цистеина в составе АСР.

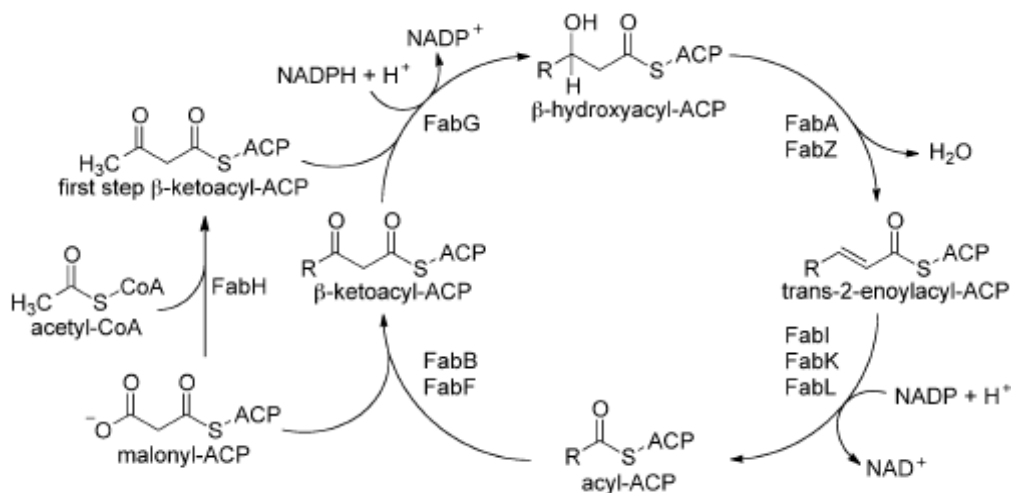


Рис. 9. Схема синтеза насыщенных ЖК клетками *E. coli* [63]

Схема удлинения цепи неразветвленных ЖК показана на Рис. 9, где приведены обозначения ферментов, как это принято для ферментов *E. coli*. На первой стадии радикал малоновой кислоты, связанный с АСР, конденсируется с ацетил-КоА с образованием 4-х углеродного радикала, содержащего кето-группу в бета-положении. При этом освобождается молекула CO₂, что делает эту стадию практически необратимой. В ходе первого цикла происходит устранение этой кетогруппы путем восстановления до гидроксигруппы, дегидратации с образованием двойной связи и, наконец, гидрирование двойной связи с образованием насыщенного радикала 4-х углеродной кислоты (масляной), связанного через атом серы с тем же АСР. Конечный продукт первого цикла вновь конденсируется с радикалом малоновой кислоты с выделением CO₂, и в результате второго цикла восстановления кето-группы происходит удлинение радикала до 6-ти углеродной кислоты и так далее до образования радикала протяженностью 16 или 18 углеродных атомов (всегда четное количество) с последующим гидролизом тиоэфирной связи с ацил-переносящим белком (фермент тиоэфир-эстераза). Более длинные цепи, как правило, не образуются, что связано со стерическими особенностями активных центров ферментов, куда не помещаются более длинные углеводородные цепочки ЖК.

Все же некоторое количество ЖК имеет нечетное число атомов углерода. Их синтез обусловлен тем, что иногда вместо ацетил-КоА в реакцию конденсации с малонил-АСР вступает пропионил-КоА в виду невысокой субстратной специфичности бета-кетоацилсинтетазы (первая стадия).

В принципе рассмотренная система предназначена для синтеза насыщенных ЖК, однако она обладает способностью синтезировать и ненасыщенные ЖК с одной или несколькими двойными связями в углеродной цепи. Наиболее распространенной из ненасыщенных ЖК является олеиновая $C_{8}H_{17}-CH=CH-C_{7}H_{14}-COOH$. При ее синтезе предшественник, содержащий двойную связь $C_{8}H_{17}-CH=CH-CO-S-ACR$, минует стадию восстановления двойной связи и вместо этого подвергается изомеризации (переход транс-изомера в цис-изомер под действием *FabA*). Цис-3-деcanoил-АСР, содержащий двойную связь поступает в систему удлинения углеводородной цепи до образования олеиновой кислоты: $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ (18:1, Δ^9).

Отметим, что в эукариотических организмов и у некоторых бактерий синтез ненасыщенных ЖК происходит иначе: сначала синтезируется насыщенная ЖК в полную длину, а затем под действием десатураз в присутствии кислорода в окислительном процессе происходит образования двойной связи.

ЖК не используются в качестве источников углерода (отсутствует бета-окисление) ГПКБ [64, 65]. В геноме *S.g.* не обнаружены три гена, необходимые для утилизации ЖК *fadA*, *fadB* и *fadC*. Эти же гены отсутствуют и в геноме *Corynebacterium diphtheriae*. Возможно, это связано с тем, что ЖК *S.g.* не только нужны для синтеза фосфолипидов цитоплазматической мембраны, но также предназначены для синтеза миколовых кислот, образующих специфическую внешнюю мембрану.

Состав ЖК фосфолипидов мембран показывает, что синтез олеиновой кислоты составляет более половины суммарного синтеза ЖК, которые представлены по сути тремя видами: пальмитиновой (16:0) – 42%, стеариновой (18:0) – 0,8% и олеиновой (18:1) – 55% [66]. Учитывая существенную долю синтеза именно

олеиновой кислоты, можно полагать, что большая часть транс-деcanoил-АСР подвергается действию изомеразы с образованием цис-изомера с последующим удлинением цепи. ЖК с нечетным числом атомов появляются в составе фосфолипидов клеток *S.g.*, выращенных на пропионовой кислоте (3 атома углерода) в качестве единственного источника углерода: 15:0 – 6,8%, 17:0 – 4,7%, 17:1 – 0,4% (остальные кислоты – олеиновая и пальмитиновая). При росте на глюкозе ЖК с нечетным числом атомов практически нет.

Ферменты, катализирующие синтез ЖК, могут быть отдельными (специфическими для каждой реакции) как, например, у эукариот и большинства бактерий и в том числе в клетках кишечной палочки (тип FAS-II) или же собранными на одной полипептидной цепи (FAS-I). Последний вид организации биосинтеза обнаружен у бактерий подпорядка *Corynebacterianeae* (см. выше).

Интересно, что представители *Micobacterium* обладают обеими системами FAS-I и FAS-II одновременно, тогда как *S.g.* обладает только системой FAS-I, причем в двух ее разновидностях: FAS-IA и FAS-IB. Ген *fasA* кодирует первый мультидоменный белок, а ген *fasB* – FAS-IB [53]. Аминокислотная последовательность этих белков идентична на 44% по полной длине.

Если делеция гена *fasB* не влияла на роста клеток *S.g.*, то делеция гена *fasA* приводила к полной зависимости от олеиновой кислоты, что говорит о том, что система FAS-IB не столь значима для данного микроорганизма [67]. Однако, анализ миколовых кислот клеток с мутацией по гену *fasB* обнаружил резкое снижение количества тех из них, которые синтезируются на основе пальмитиновой кислоты (16:0). Вероятно, FAS-IB предназначена для синтеза специфически пальмитиновой кислоты, и дефективность FAS-IB сказывается на росте клеток незначительно в присутствии активного комплекса FAS-IA, который способен также синтезировать и пальмитиновую кислоту, но в несколько меньших количествах. У близко родственного микроорганизма *Brevibacterium ammoniagenes* также обнаружены два гена для FAS [68]. Количество белка FAS-IA в клетках *Brevibacterium ammoniagenes* на порядок превышало количество белка

FAS-IB [69]. В опытах *ин витро* показано, что комплекс FAS-IB продуцировал пальмитиновую кислоту и некоторое количество стеариновой (18:0), но не синтезировал олеиновую кислоту, тогда как выделенный белок FAS-IA продуцировал олеиновую и стеариновую кислоты [70]. Известно, что полученные в 60-тых годах мутанты *S.g.*, нуждающиеся в олеиновой кислоте, продуцировали Глу в присутствии биотина. Мутанты по гену *fasA* также обладают этой способностью в отличие от мутантов по гену *fasB*. Вероятно, эти нуждающиеся в олеиновой кислоте продуценты Глу были дефектны по гену *fasA*.

Мультиферментные комплексы FAS *Corynebacterium* представляют собой гомомультимеры, построенные из 6-ти идентичных субъединиц, по крайней мере это касается FAS-IA[71] и, вероятно, это касается также и FAS-IB. FAS-IA содержит 7 функциональных доменов, как это показано ниже на Рис. 10).

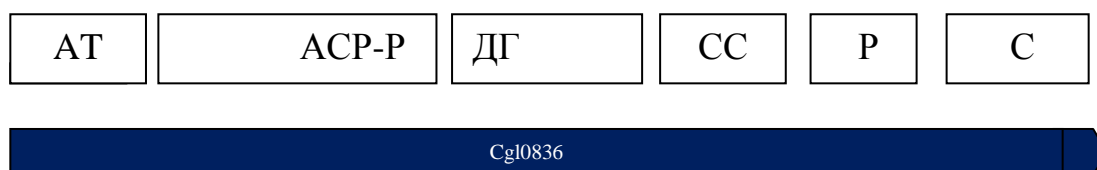


Рис. 10. Домены мультиферментного белка FAS-IA.

АТ – ацил(ацетил)трансфераза ; АСР-Р - эноилредуктаза; ДГ – дегидратаза ; ТФ - малонил/пальмитоилтрансфераза; СС – ацетил-переносящий белок (АСР); Р – редуктаза; С- кетоацил-АСР-синтаза.

Для полноценной работы FAS необходимы еще два фермента. Один из них - фосфопантотеилтрансфераза. Дело в том, что АСР нуждается в посттрансляционном прикреплении к гидроксилу одного из остатков серина простетической группы (4-фосфопантетеин), для чего и требуется данный фермент [72]. Соответствующий ген (*ppt*) тесно сцеплен с геном, кодирующим FAS-IB в хромосоме коринебактерий (показано на примере *Brevibacterium ammonigenes*). Этот фермент обслуживает не только FAS-А, но и FAS-В.

Вторая ферментативная активность, отсутствующая в FAS, но необходимая для синтеза ЖК – это тиоэфирэстераза, которая гидролизует тиоэфирную связь с

АСР уже достигшей необходимой длины ЖК. Попытка создания продуцентов ЖК на основе кишечной палочки показала, что несмотря на амплификацию генов биосинтеза ЖК и снятие регуляции их экспрессии, сверхпродукции ЖК не происходила, и только после генно-инженерной модификации гена *tesA* для соответствующей тиоэфирэстеразы накопление свободных ЖК было достигнуто [73, 74]. Сверхэкспрессия тиоэстераз была также необходима для продукции ЖК другими микроорганизмами [75] и клетками растений [76].

Интересной особенностью *S.g.* является чрезвычайно высокая активность тиоэстераз. Она в 16 раз выше, чем в клетках *E.coli*, и ее активность близка к уровню, достигаемому внутриклеточной (вместо нормальной периплазматической) локализации фермента за счет модификации гена *tesA*, при котором происходит сверхпродукция ЖК клетками кишечной палочки [77]. Эту сверхпродукцию можно объяснить тем, что при повышенной внутриклеточной активности тиоэстеразы происходит быстрый гидролиз ацил-АСР (длинноцепочечных), которые являются ингибиторами ацетил-КоА-карбоксилазы (первый этап синтеза ЖК, см. выше), а также реакций, катализируемых кетоацил-АСР-синтазой (конденсации малонил-КоА и ацетил-КоА с образованием бета-кетоацил-АСР) [78].

В геноме *S. g.* выявляются три гена предположительно для ацил-КоА-тиоэстераз: NCgl0091, NCgl1664, NCgl2451 [77].

В виду высокой активности тиоэстераз, гидролизующих любые формы ацил-АСР, в качестве субстрата для комплексов FAS-IA и FAS-IB *S. g.* использует как источники 2-х углеродных молекул ацетил-КоА, но не ацетил-АСР, а вместо малонил-АСР – малонил-КоА, как это показано при исследовании синтеза ЖК у близкородственного организма *Corynebacterium (Brevibacterium) ammoniagenes* [79].

Регуляция экспрессии генов в клетках *S. g.*, ответственных за синтез ЖК, осуществляется с помощью транскрипционного регулятора FasR [80]. Белок FasR представляет собой димер, построенный из идентичных полипептидов

размером 203 а.к., имеющий структурное сходство с известным белком-репрессором TetR. Кодирующий его ген *fasR* (NCgl2404) лежит близ генов, ответственных за синтез ЖК, в частности, следующий ген (NCgl2405) кодирует фермент переноса 4-фосфопантетина от ацетил-КоА на АСР, а рамка NCgl2409 аннотирована как *FasB*. Показано, что *FasR* *in vitro* связывается с промоторной зоной ключевых генов синтеза ЖК *accBC* (альфа-субъединица ацетил-КоА-карбоксилазы), *accD1* (бета-субъединица ацетил-КоА-карбоксилазы), *fasA*, *fasB*, в которой выявлена характерная связывающая этот репрессор последовательность, перекрывающаяся с сайтом инициации транскрипции (*accD1*, *fasA*) или находящаяся рядом с этим сайтом (*accBC*, *fasB*). Эта связывающая последовательность протяженностью 29 п.н., содержит в себе инвертированный повтор.

Делеция гена *fasR* приводит к повышению уровня транскрипции генов клеток, выращенных на глюкозе *accD1* (2,3 раза), *fasA* (в 1,1 раза), а при росте на ацетате разница в экспрессии больше: *accD1* -7,2; *fasA* - 3,3; *fasB* - 2, 7 раза. Интересно, что экспрессия гена *accBC*, практически не зависит от наличие или отсутствия белка-репрессора *fasR*. В ходе анализа регуляции этих генов выявлены характерные сайты связывания других белков-регуляторов экспрессии, которые, вероятно, наряду с геном *fasR* участвуют в регуляции синтеза ЖК. Очевидно, что основная негативная регуляция экспрессии генов данного метаболизма направлена на синтез фермента первой стадии – ацетил-КоА-карбоксилазы. Интересно, что на уровень экспрессии генов, необходимых для синтеза миколовых кислот (*accD2*, *accD3*, *accD4*, *pks*) делеция гена *fasR* не влияет, хотя синтез миколовых кислот (разветвленные ЖК) зависит от синтеза неразветвленных ЖК.

Что же является той молекулой-эффектором, связывание с которым должно переводить белок-репрессор *fasR* в активную форму, способную вызвать репрессию контролируемых генов? Это установлено лишь недавно [81], хотя первоначально был обнаружен факт связывания *FasR* (без каких-либо

микромолекул) с промоторными областями контролируемых им генов. Все же оказалось, что эта способность резко возрастала в присутствии конечных продуктов синтеза ЖК в виде ацетил-КоА производных олеиновой, стеариновой или пальмитиновой кислот. Эти данные подкреплены экспериментами *ин vivo* при выращивании *S. g.* на глюкозе, но в присутствии олеиновой или пальмитиновой кислоты. Оказалось, что количество мРНК генов *accD1* и *fasA* в клетках сократилось в 7 раз. Эта репрессия не затрагивает других субъединиц ацетил-КоА-карбоксилазы (*accBC*, *accE*, *accD2*, *accD3*), которые, вероятно, образуют еще один ферментный комплекс, который необходим для синтеза миколовых кислот.

При создании продуцентов ЖК на основе *S. g.* (олеиновой, 18:1) выявилось, что делеция гена или инактивирующая мутация в гене *fasR* обязательна для создания сверхпродукции ЖК, а мутация в сайте связывания *FasR* в районе гена *fasA* усиливает продукцию, но не может ее обусловить [82]. Видимо, это объясняется тем, что *FasR* репрессирует сильнее всего синтез первого фермента пути – ацетил-КоА-карбоксилазу, что указывает на то, что репрессии является важным и, возможно, единственным механизмом регуляции ацетил-КоА-карбоксилазы. До настоящего времени не описаны механизмы, которые регулируют активности ферментов пути биосинтеза ЖК у *S. g.* путем ретроингибирования.

Интересно, что у другого грамположительного микроорганизма *B. subtilis*, который в отличие от *S.g.* способен усваивать ЖК путем бета-окисления, малонил-КоА выступает в роли аллостерического эффектора [83]. Он связывается с белком-репрессором синтеза ЖК *FapR*, меняет его конформацию, и этот репрессор утрачивает способность связываться с операторами, тем самым дерепрессируя синтез ферментов, участвующих в синтезе ЖК. На основе *FapR* предложен сенсор, реагирующий на присутствие малонил-КоА в клетках млекопитающих [84].

1.8. Использование антибиотика церуленина в изучении продукции глутамата ГПКБ

Удобным инструментом изучения влияния синтеза ЖК на продукцию аминокислот является противогрибковый антибиотик церуленин, который подавляет синтез ЖК у микроорганизмов, а также у млекопитающих, у которых, как и у *S.g.*, синтез ЖК происходит с участием мультиферментных комплексов. Известно, что в клетках *E.coli* церуленин необратимо связывается и инактивирует активный центр двух бета-кетоацил-АСР-синтаз, которые участвуют в реакциях элонгации цепи, добавляя два атома углерода, используя для этой цели малонил-КоА (гены *fabV* и *fabF*) с выделением CO₂. В то же время церуленин практически не ингибирует активность *FabH*, который катализирует иницирующую реакцию конденсации малонил-КоА и ацетил-КоА (см. рис. 9). Устойчивость *FabH* к церуленину объясняют особенностями структуры активного центра этого фермента. Если *FabV* и *FabF* (ингибируются церуленином) имеют каталитическую триаду His-His-Cys, то в соответствующих позиция каталитического центра *FasH* присутствует His-Asn-His [85, 86].

Церуленин подавляет рост клеток *S. g.*, блокируя синтез ЖК, а также вызывает сверхпродукцию Глу, что будет обсуждаться ниже. По-видимому, в клетках *S. g.* церуленин инактивирует каталитический домен бета-кетоацил-АСР-синтазы, входящий в ферментный комплекс FAS-IA. Возможно, он блокирует соответствующую активность и в комплексе FAS-IB, но это не должно сказываться на ингибировании роста клеток, поскольку даже делеция гена *fasB* не влияет на рост клеток, как это указано выше. Действительно, в каталитическом домене комплекса FAS-IA, имеющем сходство по аминокислотной последовательности с белком *FasB* кишечной палочки, обнаруживается та же каталитическая триада Cys2643, His2796 и His2842, соответствующая Cys163, His 298 и His333 в активном центре *fasB* кишечной палочки. Это видно при наложении последовательности белка *FasB* на соответствующий фрагмент

полипептида FAS-IA (рис. 11). Триада Cys-His-His обнаруживается также и во втором белке Fas-IB (данные не приведены), что свидетельствует о чувствительности к церуленину обоих синтезирующих ЖК комплексов в клетках *C. g.*

```

FabB : 161 SACATSANHCIGNAVEQIQLGKQDIVFAGGGEEELCWEMACEFDAMGALSTKYNDTPEKA--
          +ACAT+A + A+++I++GK D V AGG + L E F M A + D+ E

FasI-A 2641 AACATAAVSVEEALDKIRIGKSDFVAGGFDALSVEGITGFGDMAATA----DSAEMEGK

FabB 219 -----SRTYDAHRDXXXXXXXXXXXXXXXXXEELEHALARGAHIYAEIVGYGATSDGADMVA
          SR D R A G + I + +DGA

FasI-A 2697 GIEHRFFSRANDRRRGGFIESEGGGTVLLARGSLAADLGLPVLGVIGFAESFADGAHTSI

FabB 272 PS-GEGAVRC-----MKMAMHGVDTPID---YLNSHGTSTPVGDVKE-----LAA
          P+ G GA+ + +A+ V D ++ H TST D E +A

FasI-A 2757 PAPGLGALGAARDGVESRLAVALRSVGSADAISIISKHDTSTNANDPNESDLHERIASA 2

FabB 313 IREVFGDKSPAISATKAMTGHSLGAAGVQEAIYSLLMLEHGFIAPSINIEELD 365
          I G+ IS K++TGH+ G A + I +L G + + ++ +D

FasI-A 2817 IGRADGNPMYVIS-QKSLTGHAKGGAAAFQMIGLTQVLRSGLVPANRALDCVD 2868
  
```

Рис. 11. Сходство аминокислотных последовательностей участков белков *FabB* (*E. coli*) и *FasI-A* (*C. g.*). Выделена каталитическая триада С-Н-Н

С помощью церуленина в качестве фактора селекции удалось отобрать мутанты *C. g.*, устойчивые к этому антибиотику, продуцирующие ЖК [87]. Вначале были отобраны мутанты, устойчивые к поверхностно активному веществу Tween 40, представляющему собой эфир пальмитиновой кислоты, которые продуцировали олеиновую кислоту (выделяли в агар). В наиболее продуктивном штамме обнаружена точечная мутация в гене, кодирующим транскрипционный регулятор биосинтеза ЖК *FasR*. Мутация вызывала значительную (в 3,5 раза) дерепрессию лишь одного гена – *accD1*, кодирующую субъединицу ацетил-КоА-карбоксилазы

(иное наименование этого гена *dtsR1*). Для последующей селекции использовался церуленин, ингибирование роста которым снималось добавлением в среду олеиновой кислоты. На первом этапе селекции с помощью церуленина от штамма устойчивого к Tween40 с мутацией в гене *fasR* были отобраны мутанты, резистентные к минимальной ингибирующей концентрации этого антибиотика (7,5 мг/мл). В лучшем продуценте олеиновой кислоты обнаружена мутация в районе оператора гена *fasA* (FAS-IA), в результате которой повысился в 3 раза уровень экспрессии гена *fasA*. Еще один этап селекции на повышенную устойчивость к церуленину (15 мг/мл) позволил улучшить продукцию до суммарного количества ЖК на среде с 1% глюкозы 280 мг/л, состоящего в основном из олеиновой (208 мг/мл) и пальмитиновой (47 мг/л). На этом этапе селекции продуцент приобрел мутацию близ активного центра бета-кетоацил-АСР-синтазы, входящий в ферментный комплекс FAS-IA. Мутация вызывала замену Ala-2647 на Val и находилась близ Cys-2643, входящего в характерную каталитическую триаду Cys-His-His, в которой цистеин и связывает церуленин (Рис. 11). Такого рода замена может повлиять на чувствительность фермента к церуленину, так как более длинный радикал валина может служить стерическим препятствием для проникновения антибиотика в активный центр. Возникает вопрос: как такая мутация могла улучшить продукцию ЖК? Возможно, что этот каталитический домен подобно изофункциональному ферменту FasH из кишечной палочки ингибируется длинноцепочечными (12-20 атомом углерода) ЖК в виде ацил-АСР, как это обнаружено в *E.coli* [88], или же ацил-КоА или даже свободными кислотами, что более характерно для *S.g.*, обладающим на порядок выше уровнем активности тиоэстераз. Если это предположение верно, то такая аминокислотная замена должна способствовать продукции ЖК.

Гипотеза о «протечке» Глу через неполноценную клеточную мембрану в условиях голодания по биотину была опровергнута в экспериментах с «короткими» культурами клеток *S. g.* с использованием церуленина в качестве ингибитора синтеза ЖК [89]. Выращенную в условиях дефицита биотина

культуру, которая продуцировала в этих условиях Глу, переносили в новые сред, полностью лишенную биотина и содержащую биотин. В течение короткого периода (2-3 часа) определяли скорость накопления Глу.

Во-первых, было показано, что в присутствии биотина скорость накопления Глу снижалась в 5 раз, но при этом концентрация Глу в клеточном пуле не менялась. Этот факт противоречит гипотезе «протечки», по которой предполагалось, что в условиях голодания по биотину клетки не способны поддерживать внутриклеточный пул Глу, его концентрация снижается, вызывая усиление его синтеза ферментами, освобожденными от ингибирования конечным продуктом – Глу.

Во-вторых, в отсутствие биотина наблюдался лишь незначительный синтез ЖК, оцениваемый по скорости включения меченого ацетата в фосфолипиды мембран, который резко возрастал при добавлении биотина. Отношение содержания липидов к суммарному белку приходило в норму через два часа, если считать нормой отношение, рассчитанное для клеток, выросших в присутствии биотина. Поскольку синтез Глу резко падал в течение нескольких минут после добавления биотина, то, естественно, это не связано с количеством фосфолипидов в мембране. Показано, что фосфолипиды мембран в клетках, выросших при голодании по биотину, содержат меньшую долю ненасыщенных ЖК по отношению к насыщенным. В частности, отмечалось увеличение доли насыщенной пальмитиновой кислоты и сокращение – мононенасыщенной олеиновой в мембранных липидах клеток, голодающих по биотину. Однако и это не является причиной немедленного снижения продукции Глу при добавлении биотина, так как восстановление нормального состава фосфолипидов занимает около двух часов. По результатам опытов очевидно, что продукция Глу так или иначе связана со свойствами мембран клеток, сформированных при сниженном синтезе ЖК. Очевидно также, что добавление биотина немедленно посылает неустановленный химический сигнал, вызывающий прекращение секреции Глу, если этим сигналом не служит сама молекула биотина как таковая.

Этим сигналом могла бы быть малоновая кислота в форме малонил-КоА – непосредственный продукт реакции, катализируемой ацетил-КоА-карбоксилазой, кофактором которой является биотин. Отсутствие малонил-КоА могло бы служить таким сигналом, вызывающим секрецию Глу, через неполноценную мембрану в условиях недостаточного уровня синтеза мембранных фосфолипидов. Но и это предположение опровергнуто в опытах с применением церуленина. Как упомянуто выше, церуленин ингибирует стадии синтеза ЖК, в которых используется малонил-КоА для удлинения цепи ЖК, а также для иницирующей реакции конденсации с ацетил-КоА с образованием 4-х углеродной молекулы, которая вступает в цикл синтеза ЖК. Оказалось, что при одновременном добавлении биотина и церуленина к культуре, растущей без биотина и продуцирующей Глу, продукция Глу сохраняется на прежнем уровне (Рис.12). То есть, церуленин устраняет негативное действие биотина на продукцию Глу, ингибируя синтез ЖК. Если церуленин вносили в среду через 6 мин после добавления биотина, то продукция Глу через 15 минут восстанавливалась. Таким образом, ни сам биотин, ни малонил-КоА не являются теми сигнальными молекулами, непосредственно контролирующими секрецию Глу. Остается, однако, возможность того, что сигналом служат какие-то полупродукты синтеза ЖК, например, короткие свободные ЖК или в форме ацетил-КоА производных. Эти вещества действительно могут накапливаться в клетке как при низком уровне синтеза малонил-КоА в результате дефицита биотина, так и при нормальном уровне синтеза этого вещества, но при блокировании церуленином реакций использования малонил-КоА для удлинения цепей ЖК. Факт накопления коротких форм ЖК, которые затем образуют короткие миколовые кислоты, обнаружен при выращивании клеток *S. g.* в условиях продукции Глу, которые создавались голоданием по биотину или добавлением в среду церуленина [90]. При добавлении в среду биотина такие полупродукты должны немедленно вовлекаться в синтез полноразмерных ЖК и

их воздействие на другие ключевые процессы в продукции Глу (например, на транспортную систему глутамата) быстро прекращается.

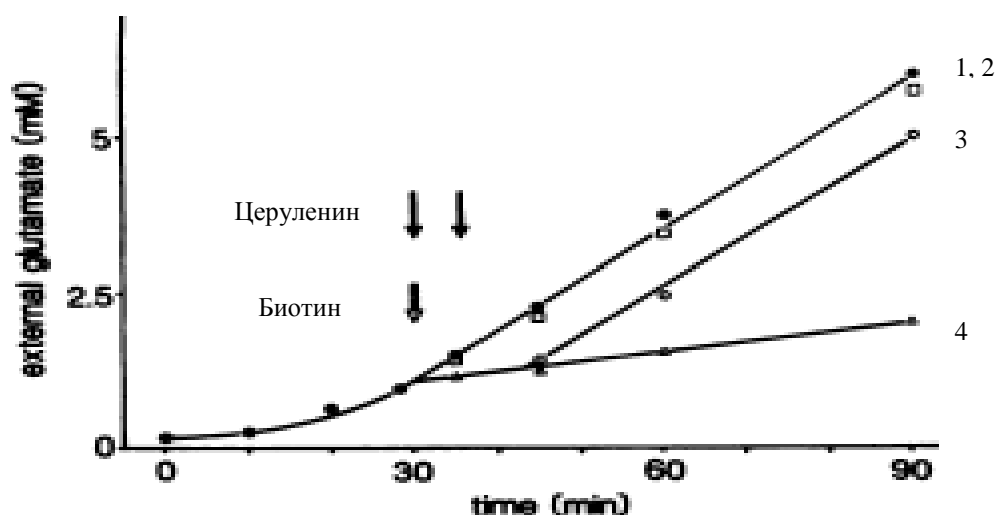


Рис.12. Динамика накопления глутамата культурой *S. g.* в безбиотиновой среде [29].

Стрелками указаны моменты внесения в среду биотина и церуленина.

1 и 2 – без добавления биотина и при одновременном добавлении биотина и церуленина; 3 – при добавлении биотина с последующим через 6 мин добавлением церуленина; 4- добавлен только биотин.

На наш взгляд наиболее важным открытием рассматриваемой работы является обнаруженный авторами мгновенный, триггерный механизм действия биотина, мгновенно прекращающего продукцию глутамата. Ясно, что процессы экспрессии генов, синтеза белков и даже их модификации путем фосфорилирования являются слишком медленными, чтобы быть элементами этого механизма. Не исключена также возможность того, что мишенью действия как биотина, так церуленина является не только синтез ЖК (медленный процесс), а какой-то другой процесс, например, транспорт глутамата из клеток, в котором могут участвовать оба эти вещества, первое – запирая транспорт, второе – противодействуя первому, восстанавливая транспорт.

1.9. Миколовые кислоты и их возможная роль в индукции продукции глутамата.

В клетках *S. g.* ЖК, синтезированные с помощью ацетил-КоА-синтазы и ферментных комплексов Fas-IA и FasIB, используются как для формирования цитоплазматической мембраны, как у всех остальных бактерий, так и для синтеза второй внешней мембраны в виде миколовых кислот (МК). В русской медицинской литературе используется также термин «миколовые» и, соответственно, миколаты.

МК обнаружены еще в 1938 году при исследовании возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* [91], в связи с чем и получили это название. Оно происходит от древнегреческого слова «микос», означающего воск. Действительно, для колоний бактерий, обладающих миколатной мембраной, характерен некоторый блеск, подобный блеску воска. Назначение миколатной мембраны связывают с повышенной устойчивости к факторам внешней среды: высыханию на воздухе, действию растворителей, кислот, щелочей, антибактериальных препаратов [92]. Для патогенных бактерий, имеющих внешнюю миколатную мембрану, по-видимому, важна изоляция белков-антигенов клеточной стенки от действия антител макроорганизма.

S.g. относят к порядку актиномицетов, куда входят коринебактерии, микобактерии, нокардии, родококки и некоторые другие родственные бактерии [93]. Эти бактерии характерны наличием у них миколатной мембраны, и среди них немало возбудителей тяжелых болезней человека: туберкулеза, проказы, дифтерии и ряда других.

МК представляют собой ковалентное соединение двух ЖК. Длина цепей (суммарное число атомов углерода в обеих цепях) варьирует от самых коротких у *S. g.* (16 – 32) до самых длинных у представителей рода *Segniliparus* (около 100) [94]. Наиболее сложную структуру имеют МК у рода *Mycobacterium* (60 – 89

атомов углерода), которые содержат различные функциональные группы: циклопропаны, двойные связи, атомы кислорода, тогда как у представителей подпорядка *Corynebacterineae*, в который входят роды *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Rodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, в углеводородных нитях встречаются лишь двойные связи [95]. В целом штамм *C. g.* ATCC 13032 рассматривают как архетип при изучении биохимии и генетики синтеза МК и формировании миколатной мембраны. Обнаруженные на этом объекте находки используются для их подтверждения на патогенных видах и, в особенности, на возбудителях туберкулеза. Интерес к этому вопросу вызван также тем, что противотуберкулезный антибиотик этамбутол, нарушающий структуру миколатной мембраны и в целом клеточной стенки, вызывал продукцию глутамата у культуры *C.g.*, растущей в присутствии биотина [14]. Этот факт указывал на важность МК и состоящей из них мембраны в продукции глутамата. Этот вопрос обсуждается ниже.

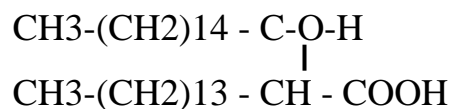


Рис. 13. Структурная формула миколовой кислоты на основе двух молекул пальмитиновой кислоты

Структура часто встречающейся в миколатной мембране *C.g.* МК, построенной из двух молекул пальмитиновой кислоты (C16), изображена на рис. 13. МК образуют двуслойную внешнюю мембрану, причем МК нижнего слоя ковалентно сшиты с арабиногалактановым слоем, образуя сложноэфирную связь с терминальным арабинозным остатком, а весь арабиногалактановый слой в свою очередь ковалентно связан с ниже лежащим слоем пептидогликана (далее ПГ). В результате образуется единая гиганская трехслойная молекула, окружающая цитоплазматическую мембрану со всех сторон [96].

В наружный слой миколатной мембраны погружены гидрофобные концы свободных (несвязанных ковалентно с какими-либо слоями клеточной стенки) МК. МК внешней части миколатной мембраны могут быть как в свободном виде, так и в виде моно-, ди- и триэфиров трегалозы (дисахарид, образованный альфа-1,1-гликозидной связью между двумя молекулами альфа-глюкозы). Таким образом, двухслойная миколатная мембрана ассимметрична в отличие от цитоплазматической мембраны, в которой оба слоя равноценны по составу (свободные фосфолипиды находятся в обоих слоях). Особенно интенсивно изучались МК у возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, поскольку миколатная мембрана определяет степень устойчивости к антибиотикам этого микроорганизма. Подобная внешняя мембрана обнаружена и у *S. g.* [97].

На электронной микрофотографии среза замороженных клеточной стенки *S.g.* ATCC 13032 визуализированы два мембранных слоя – внутренний (внизу) и внешний (Рис. 14, А) [98]. У мутанта *S.g.*, у которого делетирован один из генов, ответственных за синтез МК (*pks13*), внешняя мембрана отсутствует (Рис. 14, В).

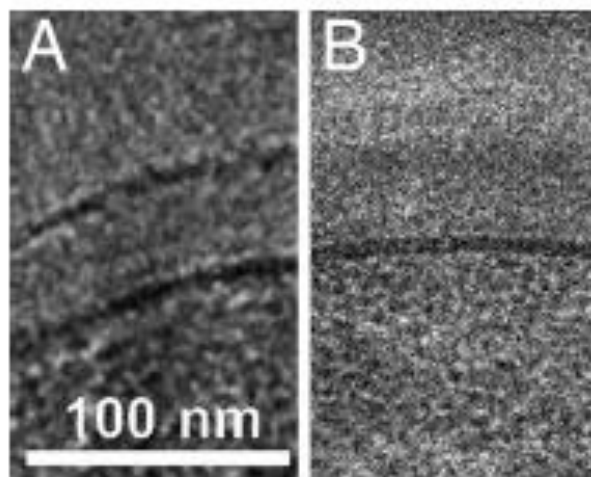


Рис. 14. Электронная микрофотография срезов клеточной стенки *S.glutamicum* ATCC 13032 [98].

Этапы биосинтеза характерной для *S.g.* МК, происходящей из двух молекул пальмитиновой кислоты представлены ниже на основе работ [99-103]. Одна из молекул пальмитиновой кислоты активируется под действием АТФ с

образованием пальмитоил-АМФ (лигаза FadD, NCgl2774), а вторая молекула пальмитиновой кислоты в виде ацетил-КоА производной карбоксилируется. Реакция карбоксилирования подобна первой реакции синтеза ЖК, в которой происходит карбоксилирование ацетил-КоА с образованием малонил-КоА, но в данной реакции вместо ацетил-КоА используется длинная молекула пальмитоил-КоА. Если ферментный комплекс ацетил-КоА-карбоксилазы состоит из пептидов AccBC, AccD1 (другое наименование DtsR1) и AccE, то ацил-КоА-карбоксилаза, необходимая для синтеза МК, также содержит биотинилированную субъединицу AccBC и AccE, но вместо AccD1 в состав этого комплекса входят AccD2 и AccD3. То есть, две субъединицы (AccBC и AccE) входят в состав обоих комплексов. В геноме *S. g.* обнаружены 4 ортолога гена AccD, и теперь известна функция 3-х первых из них. Структура всего комплекса ацил-КоА-карбоксилазы в отличие от ацетил-КоА-карбоксилазы ($\alpha_6\beta_6\epsilon_6$), пока не установлена в виду крайней нестабильности этого комплекса в ходе выделения и очистки.

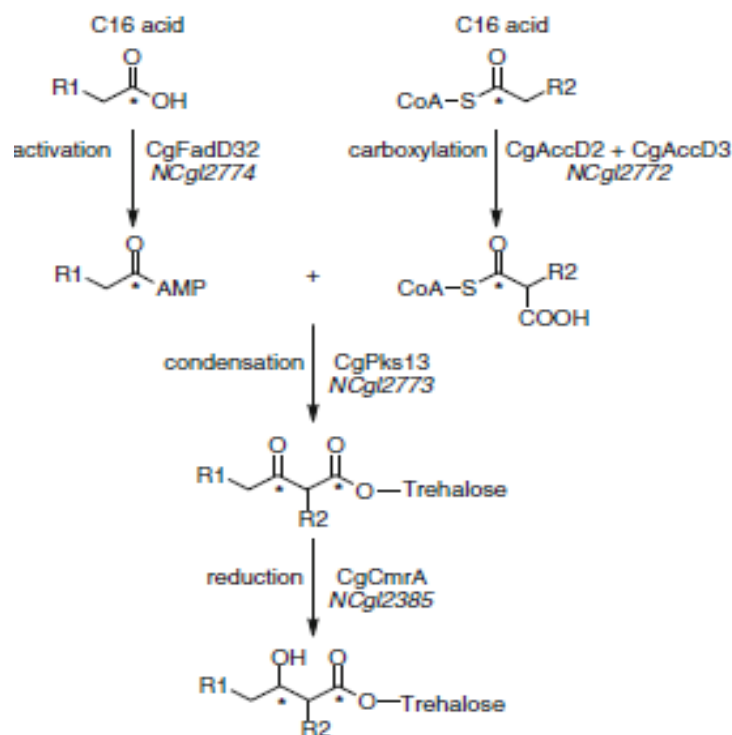


Рис. 15. Этапы синтеза мономалата трегалозы на основе пальмитиновой кислоты [104].

На втором этапе продукты первых реакций конденсируются, при этом участвует дисахарид трегалоза, образуя эфирную связь с карбоксильным. Реакция катализируется поликетидсинтазой (ген *pks13*, который был делетирован в экспериментах, показанных на Рис. 11). Соответствующий этому гены полипептид обладает 4-мя каталитическими доменами для реакции конденсации: ацилтрансферазным (АТ), кетосинтазным (КС), ацил-переносящим (АСР) и тиоэстеразным (ТЕ). *S. g.* имеет только один ген (*NCg12773*), кодирующий поликетидсинтазу. Делеция этого гена, летальная для патогенных микобактерий, не является таковой в случае *S.g.*, но вызывает существенные морфологические изменения клеточной стенки и, в частности, отсутствие миколатной мембраны [98 – 100]. Гены, кодирующие ферменты биосинтеза МК, собраны в один кластер. Делеции соседних генов *NCg2774* и *NCg12772*, необходимых для активации ЖК перед конденсацией, также не летальны в случае *S.g.*, но приводят к аналогичным изменениям клеточной стенки. Далее происходит восстановление кето-группы до гидроксила, катализируемого соответствующей редуктазой *SmrA* (*NCg12385*). Делеция этого гена приводит к нарушениям морфологии и медленному росту клеток, у которых повышен уровень липидов, содержащих предшественники миколовых кислот с невосстановленной кето-группой, однако уже ковалентно связанных с дисахаридом трегалозой. Это указывает на важность

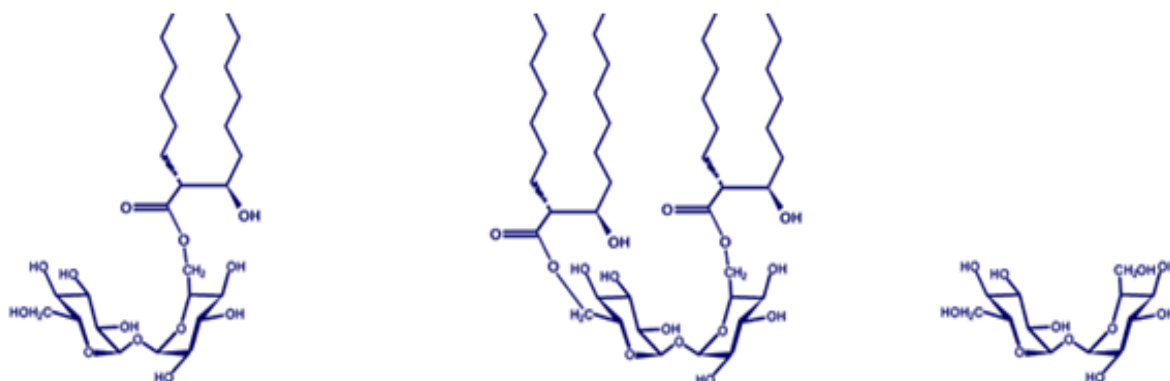


Рис.16. Структура моно-, димиколата трегалозы и молекулы трегалозы (слева направо).

эфиров миколовых кислот эфиров с трегалозой, которые образуются еще до завершения синтеза миколовой кислоты [104]. Мутанты по синтезу трегалозы также обладали медленным ростом и нарушением морфологии, однако были жизнеспособны [105].

Вместо трегалозы они могли использовать мальтозу и мальтотриозу, имеющих свободный альфа-D-глюкозный атом. Эти дисахариды переносятся в клеточную стенку и ковалентно прикрепляются к арабиногалактанному слою. В клеточной стенке обнаружены не только мономиколяты, но и димиколяты трегалозы, как это было показано вначале на *S. diphtheriae* [106], а затем и на *S. g.* [107] (Рис.16). Часть миколовых кислот ковалентно связана со слоем арабиногалактана, а большая часть в виде моно- и диэфиров трегалозы находится в свободном состоянии, образуя внешний слой миколатной мембраны. В образовании связей МК как с трегалозой, так и арабинозой арабиногалактана участвуют микоилтрансферазы (Myt) [108]. В геноме *S. g.* выявлено 5 генов, имеющих сходство с ранее изученными генами Myt микобактерий. Соответствующие им ферменты обладали частично перекрывающимися активностями в плане образования эфиров с трегалозой или арабинозой арабиногликана.

В транспорте МК, синтезируемых в цитоплазме на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны, через цитоплазматическую мембрану в периплазматическое пространство участвуют два транспортера NCgl0228 и NCgl2769. Они выполняют сходную функцию, так как делеция каждого из них не приводит к отсутствию МК в клеточной стенке; только делеция обоих приводит к отсутствию внешней мембраны [109]. Предполагается, основываясь на аналогии с микобактериями, что транспортируются через цитоплазматическую мембрану мономиколяты трегалозы, одна часть которых ковалентно связывается с арабиногликаном, а вторая – образует димиколяты трегалозы, которые идут на построение внешнего слоя микомембраны (Рис.17).

жизнеспособности, как это происходит в случае патогенных микобактерий. Инактивация этого гена приводит к полному отсутствию ди- и тримиколатов и одновременному накоплению мономиколатов в цитоплазме. Все это указывают на то, что образование последних происходит в периплазме после транспорта ацетилированных мономиколатов трегалозы через цитоплазматическую мембрану. Без этого фермента также не происходит прикрепления мономиколатов трегалозы к арабиногалактановому слою, т.е. миколаттрансферазы, присутствующие в периплазме, опознают только ацетилированную форму мономиколатов трегалозы.

Учитывая важную роль миколатной мембраны в качестве дополнительного барьера для проницаемости, возникло предположение, что изменения строения этой мембраны, а не периплазматической являются причиной продукции глутамата ГПКБ. Действительно, все факторы (голодание по биотину, действие церуленина, Твинов и др.), снижающие уровень синтеза ЖК и обуславливающие продукцию глутамата, влияют в равной степени как на создание цитоплазматической мембраны, так и миколатной мембраны. Внимание исследователей переключилось на изучение роли миколатной мембраны в продукции глутамата. Вначале воспользовались противотуберкулезным антибиотиком этамбутолом, который, как было известно, ингибирует фермент арабинозилтрансферазу, препятствуя тем самым прикреплению (сложноэфирная связь) внутреннего слоя миколатной мембраны к арабинозному остатку (5'-гидроксил) арабиногалактана [112]. Естественно, внешний слой мембраны также не может быть сформирован, так как нуждается в гидрофобном взаимодействии с внутренним слоем миколатной мембраны. При этом синтез самих миколовых кислот не нарушается.

Культура *S.g.* действительно продуцировала Глу в присутствии биотина при добавлении в среду субтоксических количеств этамбутола [14]. При клонировании гена *emb*, кодирующего арабинозилтрансферазу, продукция Глу не происходила и одновременно появлялась устойчивость клеток к этому

антибиотику. Полученные данные все же не позволяли сделать однозначный вывод о том, что продукция Глу вызвана исключительно отсутствием миколатной мембраны, как это факт подтверждали электронные микрофотографии клеток, выращенных в присутствии этамбутола. На этих фотографиях видны и другие изменения морфологии: клетки, выращенные в присутствии антибиотика, приобретают более округлые формы, что свидетельствует о снижении ригидности, зависящей от клеточной стенки, и, что существенно, о растягивании в результате нижележащей цитоплазматической мембраны. Главный вопрос, поставленный исследователями, что же является причиной продукции Глу, остался без ответа. С другой стороны, авторы наблюдали повышение проницаемости клеточной стенки для экзогенного глицерина и для внутриклеточного лизина (при выходе из клеток наружу). То есть, МК мембрана является определенным барьером для проницаемости через клеточную стенку и аминокислот и нейтральных молекул, но лишь косвенно обуславливает продукцию Глу.

Поскольку дисахарид трегалоза, как показано выше, является необходимым компонентом миколатной мембраны, было интересно получить штамм *S.g.* с заблокированным синтезом трегалозы и поэтому лишенным миколатной мембраны. Этот микроорганизм имеет три различных пути синтеза трегалозы [113], поэтому все три пути были заблокированы делециями соответствующих генов. Оказалось, что миколатная мембрана может быть частично образована при добавлении в среду ряда сахаров вместо трегалозы, в частности, глюкозы, мальтозы и мальтотриозы, но не сахарозы. При этом наблюдалось изменение клеточной морфологии.

При введении трех упомянутых делеций в хромосому одного из продуцентов лизина наблюдалось следующее [114]. Если слой арабиногалактана не был поврежден при росте на сахарозе в отсутствие трегалозы, то миколатная мембрана либо полностью отсутствовала, либо была повреждена. Проницаемость клеточной стенки повысилась в отношении лизина (эндогенного) и глицерина (экзогенного).

Этот продуцент лизина увеличил продукцию лизина на единицу сухого веса при росте на сахарозе, скорость роста при этом была замедленной по сравнению со штаммом с нормальным синтезом трегалозы. Дефектный по трегалозе штамм продуцировал не только лизин, но и значительные количества Глу не только на среде с сахарозой, но также и при добавлении трегалозы. Таким образом, даже незначительное нарушение синтеза миколатной мембраны обуславливало продукцию Глу. Однако, как и в случае с нарушением синтеза миколатной мембраны действием этамбутола, так и в случае недостаточности по трегалозе нельзя однозначно считать, что отсутствие миколатной мембраны необходимо и достаточно для продукции Глу, поскольку остаются и иные причины возникновения продукции.

Дополнительную информацию о связи продукции Глу с составом и размером миколатной мембраны дает исследование японских ученых компании Ajinomoto [115]. Они пытались ответить на вопрос: почему различные способы индукции (голодание по биотину, действие детергента Твин 40, ингибитора синтеза ЖК церуленина, а также пенициллина) приводят к одному и тому же результату – продукции Глу? Если действие трех первых факторов должно приводить к снижению уровня синтеза ЖК, то, как известно, пенициллин препятствует формированию внутренней части клеточной стенки – ПГ и не влияет на синтез ЖК. Тщательный анализ состава миколатной мембраны (газовая хроматография с соответствующей дериватизацией и последующий анализ масс-спектра) показал, что в отсутствие индукции продукция глутамата МК представлены на 70% одной формой: продуктом конденсации двух молекул пальмитиновой кислоты (C32, или C16+C16). Присутствуют еще четыре вида: C34(C18+C16), 8%; C30 (C14 + C16), 13%; C28 (C12+C16), 2,7%; C26 (C10+C16), 1,5%. Таким образом, в норме МК на 90% созданы на основе пальмитиновой кислоты, практически не встречается мононенасыщенная олеиновая к-та (C16), хотя именно она является основным продуктом синтеза комплексом FAS-IA (см. выше). При действии всех перечисленных факторов индукции происходит сокращение общего количества

МК – на 40%, однако голодание по биотину снижает только на 10%. Изменяется и качественный состав МК: появляются и присутствуют в значительных количествах МК, построенные из более коротких ЖК, в случае голодания по биотину и в особенности в присутствии церуленина. Пенициллин, не меняя качественный состав, вызывает только сокращение количества МК в мембране, что, как полагают авторы, вызвано неполноценностью слоя ПГ и, как следствие, арабиногалактанового слоя, к поверхности которого ковалентно прикрепляется внутренний слой миколатной мембраны. Авторы полагают, что изменения миколатной мембраны в условиях индукции, возможно, является причиной продукции Глу.

Учитывая более поздние данные о транспортёре (экспортёре) Глу (см. ниже), встроенного в цитоплазматическую, а не в миколатную мембрану, мы полагаем, что все использованные авторами способы индукции приводят к снижению ригидности клеток, их округлению и, как следствие, растягиванию цитоплазматической мембраны в которой находится экспортёр Глу, реагирующий на механическое воздействие открыванием канала для экспорта Глу.

Кроме того, появление коротких ЖК в условиях голодания по биотину или действие церуленина, наводит на мысль, что именно эти полупродукты синтеза ЖК и является сигналом к продукции Глу (открывания канала экспортёра), как это уже высказывалось ранее при анализе причин мгновенного подавляющего действия биотина на продукцию и снятия этого ингибирования церулецином.

Недавно удалось отделить клеточную стенку *S.g.* от цитоплазматической мембраны методом центрифугирования в градиентном сахарозном растворе после разрушения замороженных клеток с помощью френч-пресса, так как с помощью лизоцима клеточную стенку разрушить не удалось. В результате комплекс, связанный ковалентно, состоящий из ПГ, арабиногалактана и миколевой мембраны, был выделен и охарактеризован [116]. Если липиды цитоплазматической мембраны представлены в основном фосфолипидами и

некоторыми гликолипидами (маннозидами), то во внешней мембране обнаружались димиколяты трегалозы и немного мономиколятов. Фосфолипидов не обнаружено, хотя ранее были такие данные [117]

Клеточная стенка *S.g.* содержит один вид образующего пору комплекса, состоящий из двух коротких пептидов: PorH и PorA [118, 119]. Этот порин проходит посттрансляционную модификация, заключающуюся в образовании эфирных связей между сериновыми остатками обоих белков и миколевой кислотой под действием миколят трансферазы MytC [120 - 123]. Действительно, порин PorH-PorA обнаружен (с помощью соответствующего антитела) во внешней мембране и является основным, если не единственным порином *S.g.*

Всего обнаружено 19 белков, 6 из которых с известными функциями (5 трегалозомуколооилтрансферазы и порин PorB), функции остальных белков не установлены. В частности, белок PorB возможно является альтернативным по отношению к PorH-PorA каналом для анионов [124]. Все белки были кислыми, обладали сигнальными последовательностями, что следует из их первичной структуры, должны принимать структуру бета-бочонка (beta-barrel), что характерно для белков внешней мембраны Грамм-отрицательных бактерий

1.10. Слой клеточной стенки *C. glutamicum*.

Клеточная стенка группы микроорганизмов (подпорядок *Corynebacteriacea*), к которой принадлежит *C. g.*, уникальна среди всех микроорганизмов. Цитоплазматическая мембрана покрыта оболочкой из слоев ПГ, полисахарида арабиногалактана и внешней миколатной мембраны. Все эти три слоя ковалентно связаны один с другим, образуя гигантскую трехмерную молекулу, обхватывающую цитоплазматическую мембрану, что создает мощную защиту цитоплазмы от внешних воздействий и прежде всего от изменений осмотического давления среды. Считается, что клеточная стенка этих бактерий способна

выдержать осмотическое давление в 20 атм, направленное из цитоплазмы наружу, во внешнюю среду.



Рис. 18. Схема строения клеточной стенки *C. glutamicum*

Продукция Глу культурой *C.g.*, вызывается не только голоданием по биотину, которое замедляет синтез ЖК, из которых состоит цитоплазматическая мембрана, но и в результате воздействий, нарушающих структуру клеточной стенки (действие пенициллина и лизоцима). Таким образом, нарушения в структуре клеточной стенки являются либо главной причиной этой продукции, либо эти нарушения обнаруживаются специальными сенсорными молекулами, и этот сигнал вызывает другие биохимические изменения, индуцирующие продукцию Глу. Схема строения клеточной стенки *C.g.* представлена на Рис. 18. Толщина слоев клеточной стенки дана на основе электронно-микроскопических

исследований [125]. Над цитоплазматической мембраной расположен слой ПГ, представляющий собой трехмерную сетчатую структуру, состоящую из цепей модифицированных углеводов (N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота), соединенных между собой короткими пептидными перемичками, связывающими остатки N-ацетилмурамовой кислоты разных цепей. Слой ПГ создают форму клеток и является главной опорой цитоплазмы.

Нити ПГ ковалентно связаны со следующим слоем арабиногалактана за счет образования фосфодиэфирной связи между N-ацетилмурамовой кислотой [126] ПГ и остатком галактозы арабиногалактана, к которой прикреплен остаток рамнозы (специальный линкер). Арабиногалактан представляет гетерополисахарид, составленный из арабинозы и галактозы (оба углевода находятся в фуранозной форме). Соединенные между собой остатки галактозы чередующимися 1-5 и 1-6 связями протяженностью до 30 сахаров имеют на конце линкер, связывающие эту цепь с ПГ [127]. К этой галактановой цепи ковалентно прикреплены ветви другого полисахарида, состоящего из арабинозы. Считается, что к одной галактановой нити прикреплены по 3 арабинозных нити (арабинана). Арабинан имеет несколько боковых ответвлений [128].

МК своей карбоксильной группой образуют сложноэфирные связи с концевыми остатками арабинана (внутренний слой миколатной мембраны на Рис. 18), а своими углеводородными цепочками направлены наружу. Внешний слой миколатной мембраны состоит из трегалозных эфиров миколовых кислот (см. выше). Углеводородные цепи этих МК направлены противоположно, в сторону внутреннего слоя миколатной мембраны и погружены в него. Эти два слоя не связаны ковалентно, их взаимодействие вызвано гидрофобными силами, подобными тем, которые удерживают двухслойную цитоплазматическую мембрану. Толщина двухслойной миколатной мембраны приблизительно равна толщине также двухслойной цитоплазматической мембраны (Рис. 18), что свидетельствует о полном взаимном погружении двух слоев МК. К внешней

стороне миколатной мембраны примыкает так называемый S-слой, описание которого приведено ниже.

1.11. Внешний слой (S-слой) клеточной стенки *C. glutamicum*

В ходе эволюционного процесса адаптации к окружающим условиям прокариоты приобрели защитную двумерную паракристаллическую белковую структуру, покрывающую снаружи клеточную стенку. Она выполняет роль сита, физически препятствуя проникновению через него макромолекул белка, полисахаридов и т.п. К настоящему времени S-слой (surface layer) обнаружен у сотен бактерий различных таксономических групп, включая архей, у которых он иногда служит единственным защитным слоем, окружающим цитоплазматическую мембрану [129]. Масса S-слоя обычно составляет 10 – 15% общей массы белка микроорганизмов [130]. При высокой скорости деления клеток должно синтезироваться клеткой около 500 молекул такого белка в секунду, чтобы покрыть всю поверхность клетки. Обычно S-слой построен из одного вида белка, молекулы которого, не связанные между собой ковалентными связями, образуют сетчатую структуру. Белковые молекулы соединяются между собой, образуя упорядоченную поверхность клетки, несколькими способами, образуя скошенные, квадратные или, что наиболее часто, гексагональные структуры. У Грам-положительных бактерий этот белок нековалентно прикрепляется к слою ПГ, а в случае Грам-отрицательных бактерий происходит прикрепление к липополисахаридам внешней мембраны.

C.g. не является исключением в этом отношении: клетки многих штаммов этого микроорганизма покрыты паракристаллическим S-слоем, протомеры которого заякорены в ниже лежащем слое миколатной мембраны [131]. S-слой построен из одного вида белка, SP2, который был выявлен первоначально в культуральной жидкости наряду с белком SP1 [132]. Соответствующий ген, *cspB* кодирует белок массой 52496 Да (в зрелой форме) [133]. Белок SP2, подобно аналогичным белкам

других микроорганизмов, характеризуется большим содержанием гидрофобных аминокислотных остатков и полным отсутствием серосодержащих аминокислот. S-слой обладает гексагональной симметрией. Шесть мономеров образуют ядро, которое соединено с шестью другими ядрами. Эти соединения состоят из мономеров, каждый из которых соединяет два соседних ядра [134].

S-слой чрезвычайно устойчив к действию протеаз и детергентов. Их действие при комнатной температуре приводит к переходу в раствор фрагментов S-слоя, но не белковых субъединиц. Распад слоя на субъединицы наблюдается лишь при действии детергента (SDS) при 80°C. Это свидетельствует о необычайно большой силе взаимодействия между субъединицами, что выглядит перспективно с точки зрения использования данной структуры для применения в нанобиотехнологии [135]. S-слой плотно прикреплен к ниже лежащему слою миколатной мембраны, что обусловлено наличием гидрофобного домена С-конца белка, погруженного в миколатный слой. Действительно, делеция С-концевого домена (27 аминокислотных остатков) приводит к тому, что слой не формируется, а молекулы белка переходят в культуральную жидкость [131, 135]. Предполагается, что вначале с помощью С-концевого домена происходит закоривание субъединиц в миколатной матрице, а затем происходит сборка кристаллической структуры за счет необычайно сильных водородных связей.

Интенсивность синтеза белка SP2 сильно варьирует от штамма к штамму, а также зависит от состава среды и источника углерода [136]. В частности, замена глюкозы на лактат существенно увеличивает продукцию этого белка: при выращивании в жидкой глюкозной среде поверхность клеток покрыта S-слоем лишь частично, а в лактозной среде – полностью. Промотор гена *cspB*, кодирующего белок SP2, связывает белок массой 30 кДа, который был идентифицирован как продукт гена *Cg2831*. Этот белок относится к семье регуляторных белков типа LuxR. Делеция гена *Cg2831* приводит к практически полному прекращению синтеза белка SP2 [137].

Белок SP2 и, соответственно, S-слой не удалось обнаружить у известного штамма *S.g.* ATCC 13032. У других штаммов этого вида, которые прежде были известны как штаммы рода *Brevibacterium*, включая известный штамм *S.g.* ATCC 14067, S-слой выявлен. Как оказалось, фрагмент хромосомы размером 5,97 тпн, в котором находится ген *cspB*, отсутствует в хромосоме штамма ATCC 13032, с чем и связано отсутствие S-слоя у этого штамма [138]. Район хромосомы, в котором находится ген *cspB*, фланкирован прямыми повторами, что указывает на возможную рекомбинацию, в результате которой этот фрагмент выпал из состава хромосомы, что и было обнаружено у штамма ATCC 13032. Ген *cspB* был клонирован на плазмиде, которую ввели в штамм ATCC 13032, и в результате клетки полученного трансформанта приобрели S-слой, который обнаруживался при микроскопии и белок PS2 был обнаружен при анализе белков клеточной стенки.

S-слой обычно рассматривают, как часть внешнего слоя (*outer layer*, или OL), выявляемого при электронной микроскопии, что вызывает определенную терминологическую путаницу. При биохимическом анализе состава внешнего слоя обнаружено, что он состоит в основном из нейтральных макромолекул углеводов (до 90%) [10] и его толщина достигает 30-35 нм [135], тогда как толщина белкового S-слоя по расчетам не превышает 10 нм. Исследования с помощью атомной силовой микроскопии незамороженных живых клеток внесли ясность в этот вопрос [139]. Было показано, что клетки, выращенные в обычной среде, покрыты гладкой полисахаридной оболочкой и поэтому упорядоченная белковая структура S-слоя не обнаруживается (Рис. 19 А). С другой стороны, клетки, выращенные на чрезвычайно богатой белковой среде, выглядят иначе: выявляется упорядоченная структура S-слоя, непокрытого полисахаридными нитями (Рис. 19 В).

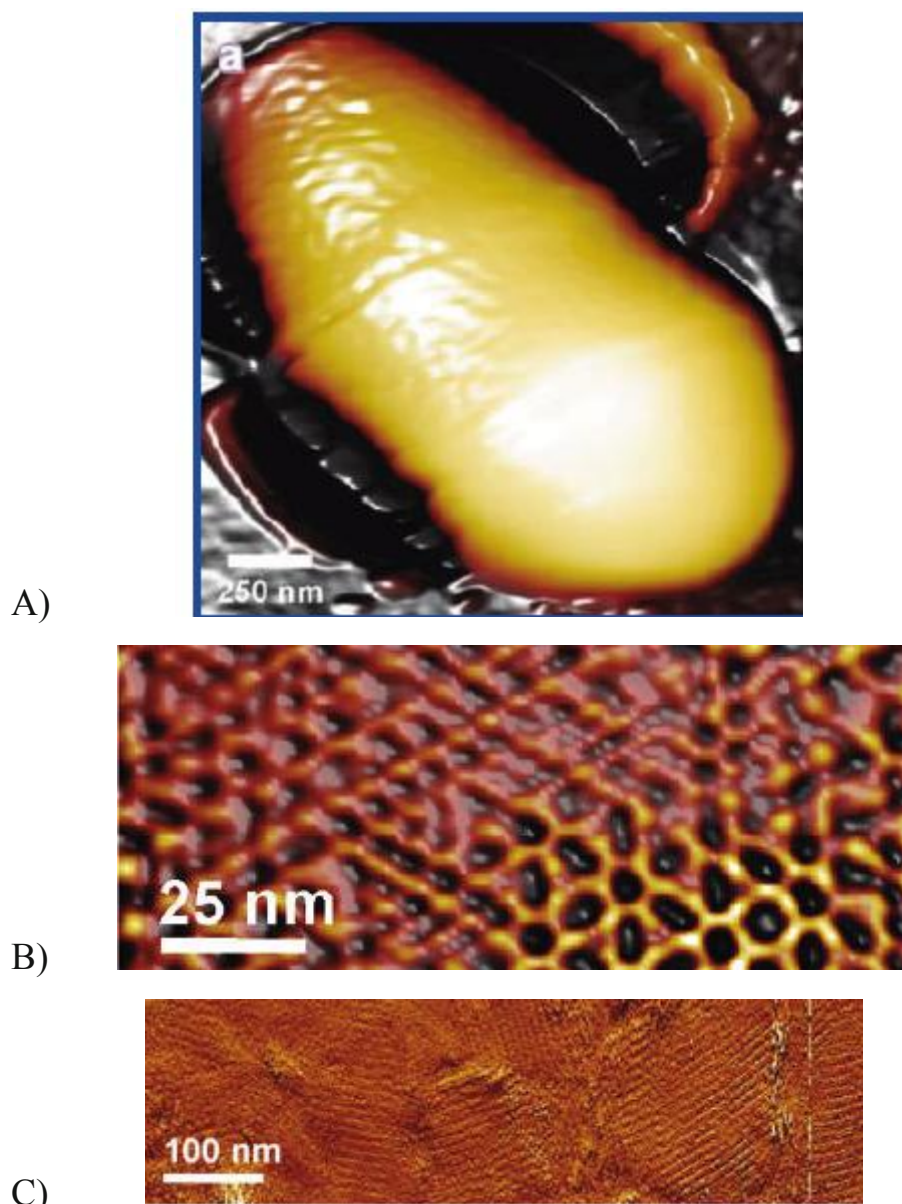


Рис. 19. Изображения поверхности клеточной стенки живых клеток *C.g.*, полученные с помощью атомной силовой микроскопии [139].

A) Клетки, выращенные на обычной среде; B) S-слой; C) упорядоченная структура наружной части миколатной мембраны.

Видна регулярная гексагональная структура с периодичностью 16 нм и толщиной около 6 нм. Очевидно, белок SP-2 представляет собой гликопротеин, который гликозилируется в зависимости от способа культивирования клеток. В участках клеточной стенки, не покрытой S-слоем (Рис. 19), также видна упорядоченная структура с периодичностью 11 нм, которая, очевидно, является внешней

стороной внешнего слоя миколатной мембраны, которая служит матрицей для сборки S-слоя (см. выше).

По-видимому, наличие или отсутствие S-слоя не имеет значения для продукции низкомолекулярных веществ: аминокислот, нуклеиновых оснований, ЖК и т.д. Однако, этот слой служит препятствием для секреции белков в культуральную жидкость. В связи с этим для продукции фрагмента антитела Fab (применяется при лечении рака молочной железы) клетками *S.g.* используют штаммы с делецией гена *cspB*, который не синтезирует белок S-слоя [140]. Для гетерологической продукции альфа-амилазы был использован мутант штамма *S.g.* ATCC13032, продуцирующий лизин, который содержит делецию района хромосомы, в которой находится этот ген (см. выше). Полученный рекомбинатный штамм приобрел способность усваивать крахмал в качестве источника углерода для продукции лизина [141]. В обоих вышеописанных примерах использовался сильный промотор гена *cspB*, а также N-концевая сигнальная последовательность белка SP2, необходимая для секреции белков через цитоплазматическую мембрану, к которой подшивали целевой пептид.

1.12. Межмембранное пространство клеточной стенки *S. g.*

Роль слоя ПГ вполне очевидна. Он имеется у всех бактерий за исключением некоторых архей, у которых он либо полностью отсутствует, либо видоизменен. Масса ПГ составляет около половины сухого веса грамм-положительных бактериях, тогда как у грамм-отрицательных бактерий слой ПГ тоньше и находится непосредственно под липополисахаридами второй внешней мембраны. ПГ выполняет две главные функции – обладая жесткостью (ригидностью), он поддерживает форму клеток и противодействует высокому осмотическому давлению цитоплазмы: без ПГ или когда его целостность нарушена происходит немедленный лизис клеток. В связи с этим ПГ является мишенью действия почти всех клинически используемых антибиотиков,

ингибирующих синтез клеточной стенки. ПГ пронизывает для микромолекул и большинства белков, обеспечивая их диффузию в направлении цитоплазматической мембраны. На нем закориваются другие структуры клеточной стенки (белки, тейхоевые кислоты) и, в случае коринебактерий, полисахарид арабиногалактан, который в свою очередь ковалентно связан с миколоевыми кислотами, образующими внешнюю мембрану.

ПГ, охватывающий поверхность всей клеточной мембраной, является трехмерной структурой, которая не выяснена до конца. По одной модели предполагается параллельное расположение гликановых нитей по отношению к поверхности клетки, тогда как вторая модель предполагает перпендикулярное направление этих нитей по отношению к поверхности, а поперечные шивки пептидными нитями образуют подобную пчелиным сотам структуру, параллельную поверхности [142 - 144]. Вторая модель находит подтверждение при электронно-микроскопических исследованиях, выявляя поры ожидаемых размеров (5x50 нм).

Нити ПГ представляют собой полимер, построенный из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, связанных 1-4-бета-гликозидными связями. Длина ПГ варьирует от вида к виду, а также от условий культивирования и обычно составляет несколько десятков сахаров [145].

Синтез ПГ можно разделить на три этапа: синтез предшественника ПГ в цитоплазме; транслокация предшественника из цитоплазмы через цитоплазматическую мембрану в клеточную стенку; встраивание предшественника в существующую трехмерную сеть ПГ.

Предшественник представляет собой цепь из пяти аминокислот, соединенных с N-ацетилмутамоновой кислотой, которая в свою очередь связана с N-ацетилглюкоамином, а также через пирофосфат - с очень длинной углеводородной цепочкой, содержащей двойные связи (бактопренол, C₅₅-P). Эта большая и сложная молекула получила название в литературе липид II (Рис. 20).

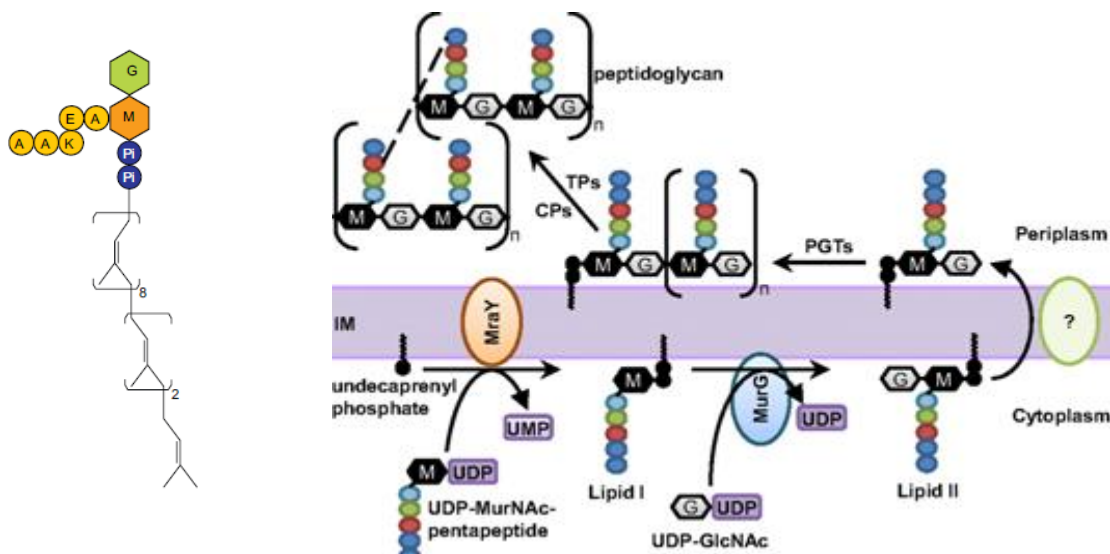


Рис. 20. Структура липида II (слева) и его участие в транслокации предшественников ПГ в периплазму *E. coli* из обзора Руиза (Ruiz N. Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. P.N.A.S. 2008. V.105. No.40. pp. 15553- 7)

Полусинтетический метод синтеза липида II предложен лишь относительно недавно [146]. Содержание липида II в составе цитоплазматической мембраны в грамм-положительных бактериях достигает 1% [147]. Гидрофобная часть молекулы постоянно погружена в цитоплазматическую мембрану в ходе сборки полной молекулы, выполняя роль якоря. Длина гидрофобной части превышает толщину мембраны, поэтому полагают, что она, подобно пружине, постоянно напряжена, и в ходе транслокации гидрофильной части молекулы не нуждается в энергии АТФ [148]. Недавно (2014 год) был установлен мембранный белок в клетках *E. coli*, названный флиппазой (ген *murJ*), который пропускает через себя гидрофильную часть молекулы липида II, обеспечивая перенос ее в периплазму [149] с последующим гидролизом связи с бактопренолом (C_{55} -PP), который, не покидая мембрану, может использоваться для повторного синтеза липида II. Подобный белок (MurJ) вскоре обнаружили и в клетках *Bac. subtilis* [150].

В *S.g.* также удалось обнаружить белок RodA, который получил наименование флиппаза, имея в виду, что осуществляет транслокацию липида II через цитоплазматическую мембрану в цитоплазму [151]. Отметим, что характер роста и деления клеток *S.g.* существенно отличаются от *E.coli* и *Bac. subtilis* [152]. В частности, у последних транслокация липида II и синтез ПГ происходит равномерно по всей поверхности клеток и, достигнув определенного размера, их клетки переходят к образованию перегородки (септы) в середине клетки, и после деления две дочерние клетки сохраняют палочкообразную форму. Клетки *S.g.*, как и их родственных микроорганизмов, характеризуются апикальным ростом: транслокация липида II и соответственно синтез ПГ происходит только на полюсах клетки, а не по всей поверхности. Затем следует формирование септы и окончательное разделение двух дочерних клеток. Делеция же гена *rodA* не приводила к полной неспособности клеток *S.g.* к делению и к образованию нитей, как можно было ожидать. Наоборот, деление происходило, хотя и замедленное, с образованием укороченных в два раза клеток палочкообразной формы. Таким образом, RodA, по всей видимости, не является флиппазой, подобной той, что обнаружена у *E.coli* и *Bac.subtilis*, хотя и RodA принимает участие в росте клеток или в его регуляции. Было продемонстрировано, что при действии модифицированного ванкомицина (флюоресцирующего), который связывается с липидом II в периплазме и блокирует синтез ПГ (точнее – связывается с пептидной частью липида II), комплекс ванкомицин-липид II находился только на полюсах клеток дикого типа (флюоресценция, оптическая микроскопия), тогда как делеция гена *rodA* приводила к равномерной флюоресценции по всей длине клетки.

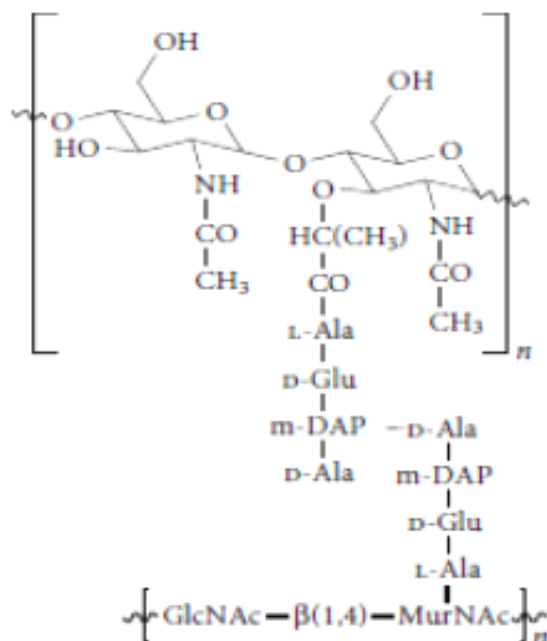


Рис. 21. Структура ПГ, содержащего диаминопимелиновую кислоту в поперечных сшивках двух гликановых нитей.

N-ацетилмурамовая кислота служит местом прикрепления пептидных сшивок между нитями (Рис. 21). Структура полисахаридной нити высоко консервативна у всех бактерий, различаясь только степенью O-ацетилирования, что сообщает некоторую утойчивость к лизоциму, ферменту, гидролизующему эту нить. Точнее, лизоцим гидролизует бета-1,4 гликозидную связь между соседними молекулами N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Клетки *S.g.* очень устойчивы к действию этого фермента, очевидно, благодаря слою миколовых кислот и белковому S-слою, служащими преградами для проникновения лизоцима к внутреннему слою ПГ.

Структура поперечных сшивок менее консервативна: грамм-отрицательные бактерии и грамм-положительные бациллы содержат мезо-диаминопимелиновую кислоту в качестве третьей аминокислоты (ДАП-тип пептидогликан), тогда как большинство других грам-положительных бактерий содержат лизин в третьей позиции. Пептиды ДАП-типа сшивают короткой цепочкой, а в случае лизина необходима дополнительная цепочка, которая различна в различных бактериях.

Что касается *S.g.*, то их пептидный мостик относится к ДАП-типу [153] и в результате голодания их клеток по ДАП вызывает соответствующее изменение морфологии [154].

Каждая цепь до образования поперечных сшивок имеет присоединенные к N-ацетилмурамовой кислоте пептиды L-Ala-D-Glu-meso-ДАП-D-Ala-D-Ala. Последний D-ala удаляется после образования сшивки, которая образуется между карбоксильной группой D-ala в четвертой позиции и аминогруппой ДАП в соседней цепи (4-ая позиция). Таким образом, поперечная пептидная сшивка содержит непротеиногенные аминокислоты, используется гамма-карбоксильная группа глутаминовой кислоты, а также пептидные связи между D- и L- и даже D- и D- аминокислотами. Естественно, такие связи недоступны для обычных протеолитических ферментов. Для их образования используются специальные лигазы. Первая аминокислота L-ala присоединяется с помощью лигазы MurC, затем действует лигаза MurD, присоединяя D-glu. Лигаза MurE присоединяет мезо-ДАП к концевой карбоксильной группе D-glu. Аминокислоты в положении 4 и 5 присоединяются с помощью лигазы MurF в виде заранее синтезированного дипептида D-Ala-D-Ala. Синтез этого дипептида осуществляется с участием фермента Ddl.

Другой особенностью поперечных сшивок *S. g.* является то, что остаток диаминопимелиновой кислоты (ДАП) амидирован в 80% сшивок в ПГ [155], хотя амидирование ДАП ранее было показано и у некоторых других бактерий [156]. Амидирование катализирует фермент амидотрансфераза, переносящий амидную группу с глутамин на ДАП, он может использовать также ион аммония. Реакция протекает внутриклеточно, а ее субстратом служит молекула липида I или II. Этот фермент кодируется геном *ItsA*, мутации по которому вызывали нарушения морфологии клеток и одновременно приводили к повышенной чувствительности как к пенициллину, так и к лизоциму [157, 158]. Мутанты *S.g.* с повышенной чувствительностью к лизоциму были отобраны под действием мутагена нитрозогуанидина для получения протопластов клеток для

генетических манипуляций, так как клетки штаммов дикого типа чрезвычайно устойчивы к действию лизоцима. Лизоцим ингибировал рост при концентрации 0,4 мг/мл, но не вызывал лизиса, тогда как полученные мутанты были чувствительны к концентрации 0,0125 мг/мл, что сопровождалось лизисом. Лизоцим-чувствительный мутант не был способен к росту при повышенной температуре (37С), и ген, в котором произошла эта мутация, был назван *ltsA*. В связи с нарушением морфологии клеток в результате изменения клеточной стенки по аналогии с действием пенициллина было предположено, что чувствительные к лизоциму мутанты должны продуцировать глутамат, что и подтвердилось в дальнейших исследованиях. Продукция глутамата происходила при повышении температуры инкубации до 35 -37С.

Интересно, что гетерологическая экспрессия гена *ltsA* в клетках *E.coli* приводила к амидированию аминокислотных остатков ДАП в ПГ и в конечном счете вызывала лизис клеток [155].

Сшивка двух пептидов от двух нитей происходит с помощью так называемых пенициллин-связывающих белков (РВР), обладающих необходимой пептидазной и транспептидазной активностью. РВР опознает и связывается с хвостовыми последовательностями двух нитей D-Ala-D-Ala, расщепляет амидную связь, освобождая от каждой по молекуле D-ala. Затем фермент, связанный с укороченными нитями, освобождается от них, образуя новую пептидную связь между С-концевым D-ala и свободной аминогруппой мезо-диаминопимелиновой (ДАП) кислоты соседней цепи (Рис. 22).

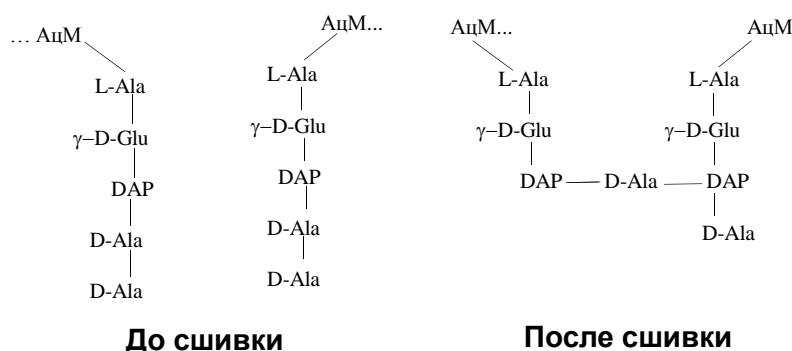


Рис. 22. Образование сшивки между пентапептидами двух гликановых нитей, катализируемой пенициллинсвязывающими белками у большинства грамположительных бактерий (АцМ – остаток N-ацетилмурамовой кислоты).

Именно эта ферментативная активность является мишенью действия бета-лактаманых антибиотиков, что объясняется структурным сходством между C-концевой последовательностью D-Ala-D-Ala пентапептидов и пенициллином, точнее его циклической части [159]. Бета-лактаманый антибиотик ковалентно связывается с активным центром и блокирует его способность образовывать сшивки между нитями ПГ [160]. Сериновый остаток в активном центре ацилируется молекулой антибиотика. Этот же серин важен для каталитической активности, он также ацилируется в ходе ферментативной реакции, но затем деацилируется и в результате готов для следующей реакции. В случае ацилирования бета-лактаманым кольцом деацилирование не происходит, и фермент утрачивает каталитическую активность [161].

Как оказалось, что некоторые РВР обладают не только способностью сшивать нити ПГ, но и способны к элонгации самой полисахаридной (гликановой) нити, то есть обладают трансгликозидазной активностью и соответствующим каталитическим доменом. Кроме того, они содержат трансмембранные структуры и рассматриваются как мембранные белки. Бактерии и особенно грамположительные имеют одновременно более десятка различных РВР, различных

типов. В хромосоме *E.coli* находят 12 генов, кодирующих РВР разных групп, а грамм-положительная бацилла имеет 16 подобных генов. *Mycobacterium tuberculosis* (родственная *S.g.*) обладает 10-ю генами [162] и несмотря на это не чувствительна к действию бета-лактамным антибиотиков, что объясняется присутствием формы РВР, который делает особый тип сшивок (3-3), и его субстартом не является последовательность D-ala-D-ala.

Типы РВР классифицируют в зависимости от молекулярной массы, наличия определенных ферментативных и трансмембранных доменов [163, 164]. *S.g.* в своей хромосоме также содержит около 10 подобных генов, часть из которых изучалась [165, 166]. Гены для РВР находятся на хромосоме близ других генов, необходимых для синтеза ПГ, как и в кишечной палочки.

Но наибольший интерес, с точки зрения возможного участия РВР в продукции Глу, представляют собой те из них, которые содержат в своем составе домен серин/треониновой протеинкиназы [STPK] на N-конце, а на C-конце один или несколько коротких (70 – 80 аминокислотных остатков) пенициллин-связывающих доменов “PASTA” [167]. STPK находятся в цитоплазме и регулируют клеточную активность, а домены PASTA находится вне цитоплазмы, отделенные от домена STPK трансмембранными доменами. Белки подобного строения обнаружены у многих бактерий и особенно у грамм-положительных, включая *M. tuberculosis* и *S.g.* (ортолог гена *rknB* для протеинкиназы из *M. tuberculosis*) [168, 169]

Идентичность в последовательности аминокислот внутри домена PASTA между разными микроорганизмами небольшая (менее 25%), тогда как способ укладки пептида домена очень консервативен [170]. Если STPK содержит несколько доменов PASTA, то структурного сходства между ними мало, гораздо больше сходства между соответствующими белками других микроорганизмов. Полагают, что такая разнородность доменов в одном и том же пептиде эволюционно закрепились для того, чтобы опознавать как можно большее число

различных разрывов между нитями ПГ и иметь возможность репарировать разнообразные повреждения сшивок [168].

Изучение структуры PknB из *M. tuberculosis* привело к предположению о механизме действия этого белка. Экстраплазматические домены PASTA связываются со своими субстратами (свободными несшитыми пентапептидами ПГ или подобными им субстратами), меняют конформацию и передают этот сигнал цитоплазматической части – протеинкиназному домену STPK, который становится способным к фосфорилированию определенных внутриклеточных белков [169]. STPK может действовать не прямо, а опосредованно: активировать путем фосфорилирования другие протеинкиназы, которые доводят этот химический сигнал до конечной точки.

Механизм фосфорилирования-дефосфорилирования белков у *M. tuberculosis* широко распространен: помимо тирозиновых протеинкиназ геном содержит 11 генов для STPK, из которых две формы являются растворимыми (немембранными): PknG и PknK, а остальные 9 – трансмембранные, имеющие рецепторы во периплазме (гены *rknA* до *rknL*, исключая G и K). В опытах *in vivo* обнаружено, что PknG [171] фосфорилирует свой субстрат – белок GarA, имеющий домен FHA (fork head associated) [172], способный связываться с фосфорилированным треониновым остатком белков. В общей сложности обнаружено 5 протеинкиназ, способных фосфорилировать белок GarA. Отметим, что гомолог белка GarA (OdhI) присутствует в геноме *S.g* (белковая идентичность превышает 70%).

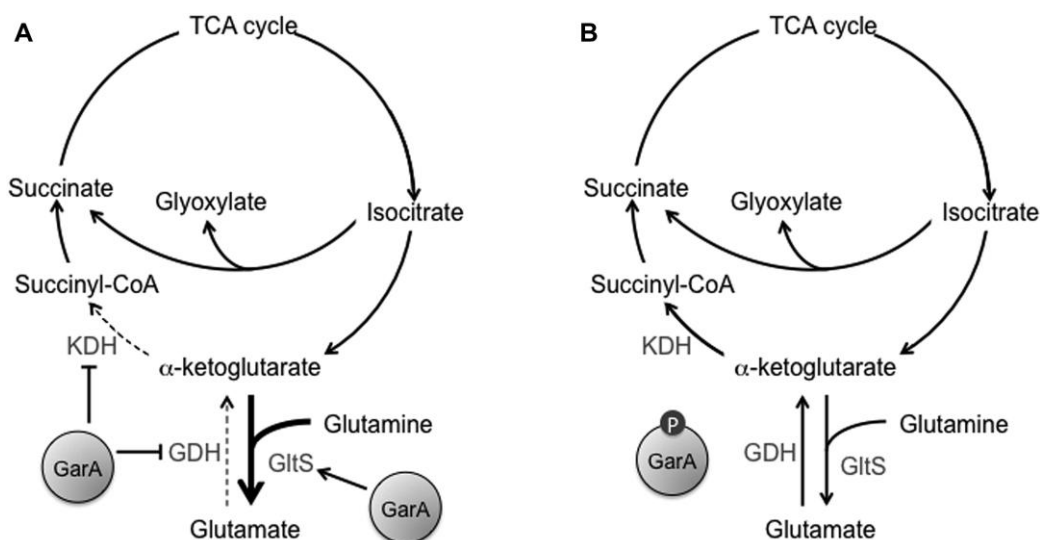


Рис. 23. Регуляция ЦТК и синтеза глутамата у *M. tuberculosis*.

А. Нефосфорилированный белок GarA ингибирует активность кетоглутаратдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы, а также активирует глутаматсинтазу (GOGAT); В. Если GarA фосфорилирован протеинкиназой PknG, то утрачивает способность связываться с своими белками-мишенями [173]

Нефосфорилированный белок GarA, связываясь с одной из субъединиц КГДК, снижает его активность, что должно повышать внутриклеточный пул 2-кетоглутарата, но это не приводит к продукции Глу [173, 174]. Дело в том, что одновременно он связывается и ингибирует глутаматдегидрогеназу, что препятствует сверхпродукции. У данного микроба синтез Глу происходит с участием глутаминсинтетазы + GOGAT, а не с помощью глутаматдегидрогеназы, как это происходит у ГПКБ. Фосфолированный GarA (или, если ген *garA* делетирован) не способен связываться с этими белками. В этом случае синтез Глу снижается (нет активации глутаминсинтетазы, низкий пул 2-кетоглутарата) и к тому же Глу поступает в ЦТК (через глутаматдегидрогеназу). Рост возможен лишь при добавлении экзогенного Глу или глутаминина. Иная картина наблюдается у ГПКБ, объясняющаяся особенностями их регуляции (см. ниже).

1.13. Механизм действия некоторых антибиотиков, разрушающих барьер проницаемости клеточной стенки бактерий

Существует целый класс антибиотиков, продуцируемых некоторыми бациллами, с общим названием лантибиотики, представляющие собой короткие пептиды, синтезируемые рибосомами с последующей посттрансляционной модификацией аминокислотных остатков. Их действие направлено на связывание с молекулой липида II. Все они содержат аминокислоту лантионин, представляющую собой молекулу цистина, лишенную одного из двух атомов серы, в результате чего образуются внутримолекулярные кольца (Рис. 24). Некоторые лантибиотики, как, например, широко использующийся в пищевой промышленности в качестве антибактериального средства низин, а также другой лантибиотик бацитрацин, связываясь с липидом II, образуют пору в цитоплазматической мембране, в результате она становится проницаемой и полностью утрачивает мембранный потенциал. Наиболее изученный лантибиотик низин в микромолярных концентрациях вызывает диссипацию мембранного потенциала и немедленный выход внутриклеточных малых метаболитов наружу.

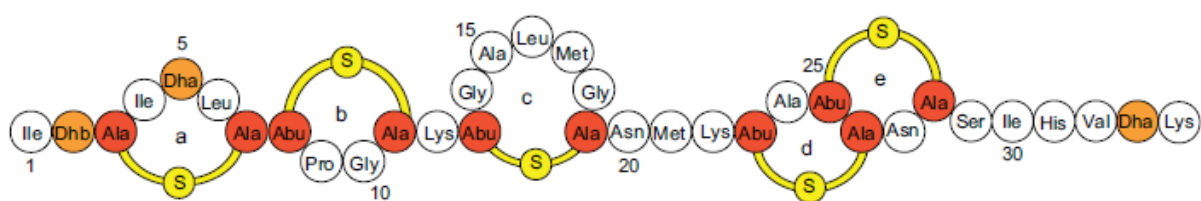


Рис. 24. Структура низина, одного из лантибиотиков

Действие некоторых других антибиотиков также направлено на цитоплазматическую мембрану бактерий, вызывая гибель клеток. Известен ряд полипептидных антибиотиков, продуцируемых почвенным микробом *Bacillus brevis* (новое название *Aneurinibacillus migilanus*). Они получили название грамицидин А, В и С, а также грамицидин S (от слова советский). Три первых грамицидина представляют собой линейные полипептиды, содержащие чередующиеся L- и D-формы обычных канонических аминокислот (всего 15

аминокислотных остатков). Они создают канал в мембране, состоящий из двух молекул полипептидов, пронизывающих мембрану, по которому внутрь клетки поступают одновалентные катионы, что приводит к падению мембранного потенциала [175]. При этом полной пермебиализации клеток не происходит.

С целью быстрой пермебиализации клеток в отношении субстратов и продуктов ферментативных реакций мы в своей работе использовали грамицидин S. Этот антибиотик успешно применялся как антибактериальный препарат для обработки ран во время Великой отечественной войны. Однако он разрушает также мембраны эритроцитов, что ограничивает его использование в медицине только наружным применением [176, 177].

В 1946 году был передан английским ученым с целью определения его химической структуры. Как оказалось, он представляет собой циклический декапептид (Рис. 25), содержащий в своем составе две неканонические

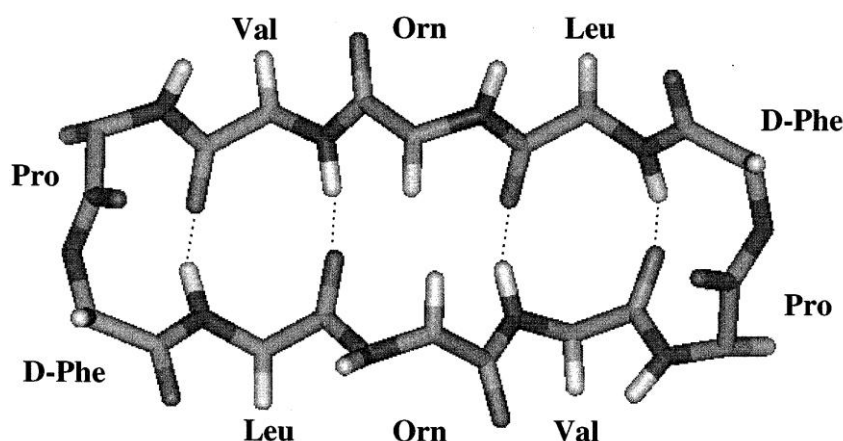


Рис. 25. Структура грамицидина S [178].

аминокислоты: D-фенилаланин и L-орнитин (биосинтетический предшественник аргинина). Две половины кольца связаны между собой четырьмя устойчивыми водородными связями между амидными и карбоксильными группами, находящихся напротив друг друга участков пептида. Последовательность Val-Orn-Leu образуют антипараллельный бета-лист, ограниченный с двух сторон последовательностями D-Phe-L-Pro, которые обуславливают разворот пептидной цепи [178]. Грамицидин S, как и другие грамицидины, является

мембранотропным агентом, однако в отличие от других грамицидинов механизм его действия на мембраны не вполне ясен и продолжает изучаться [179, 180]. Предполагается, что своей гидрофобной частью антибиотик погружается внутрь мембраны, а положительно заряженный Orn связывается с фосфатными группам фосфолипидов внешних границ мембраны [181]. Результатом действия грамицидина S на мембраны бактерий и многих патогенных грибов [182], а также вирусов [183] является разрушение структуры мембраны в качестве барьера для проницаемости ионов и микромолекул. При этом образуются всевозможные поры различного размера [184, 185]. С помощью методов ЯМР показано, что при низкой концентрации грамицидина S этот пептид плоско связывается с поверхностью мембраны, а при высоких концентрациях он обнаруживается внутри мембран, при этом плоскость кольца пептида перпендикулярна к поверхности мембраны [186]. Постулируется образование трансмембранных каналов либо за счет изгибов мембраны [187], либо за счет сборки канала из нескольких молекул пептида [188].

Повреждения клеточной стенки под действием грамицидина S удалось визуализировать у грамположительных (*Staph. aureus*) и у грамотрицательных бактерий (*E. coli*) [189]. При сканирующей электронной микроскопии живых клеток обнаружено образование множественных выпячиваний и пузырьков на поверхности клеток *E. coli*, а клетки *S. aureus* лопались, и видны были отверстия и кратеры в клеточной стенке (Рис. 26).

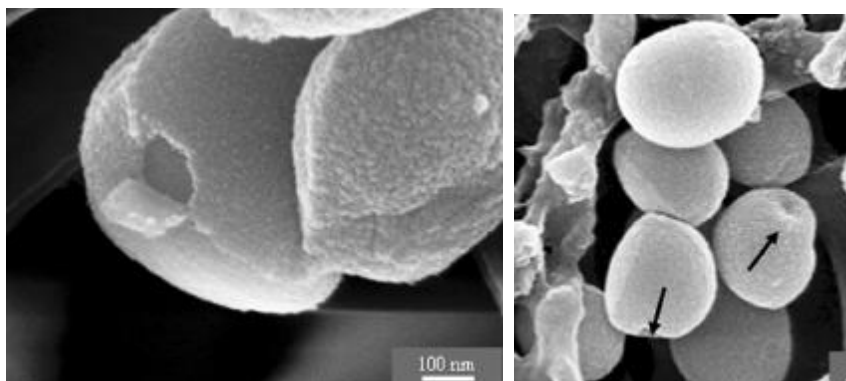


Рис. 26. Фотографии клеток *S. Aureus*, обработанных грамицидином, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа [189].

1.14. Роль 2-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса (КГДК) в сверхпродукции глутамата у ГПКБ.

КГДК катализирует одну из реакций в ЦТК – окислительное декарбоксилирование 2-кетоглутаровой кислоты (2-КГ) с образованием сукцинил-КоА по реакции:



2-КГ может быть также аминирован с образованием Глу под действием глутаматсинтазы (*E.coli*) или глутаматдегидрогеназы (*S.g.*). Естественно, что снижение ферментативной активности КГДК должно приводит к повышению внутриклеточного пула 2-КГ и к перенаправлению углеродного потока в сторону синтеза Глу (Рис. 1). Очевидно, что уровень активности КГДК, чрезвычайно важен для продукции Глу.

КГДК бактерий обычно состоит из различного числа копий каждого из трех пептидов, обладающих присущими им ферментативными активностями:

E1o – тиаминфосфатзависимая 2-кетоглутаратдекарбоксилаза (ген *sucA E.coli*),

E2o - дигидролипоилсукцинилтрансфераза (ген *sucB E.coli*),

E3 - липоамиддегидрогеназа (ген *lpd E.coli*)

В клетках *E.coli* этот ферментный комплекс состоит из ядра (24 копии E2o), к которому примыкают 6 димеров E1o и один димер E3 [190], что соответствует формуле [(SucA)₁₂][(SucB)₂₄][(Lpd)₂]. КГДК очень похож на пируватдегидрогеназный комплекс, отвечающий формуле [(AceE)₂]₁₂[AceF]₂₄[(Lpd)₂]₆, как видно из которой, что оба комплекса содержат одну и ту же субъединицу E3, кодируемую геном *lpd*, но в разных количествах.

У *S.g.* также имеется подобный ферментный комплекс, имеющий два существенных отличия. В частности, ген *odhA* (аналог E1o, *cg1280*) кодирует полипептид с двумя доменами [191]. Один из них 2-КГ-декарбоксилазный подобный E1o, а второй (N-концевой) ацилтрансферазный подобный E2o, но у него нет домена, связывающего липоевую кислоту.

Еще один ген, вначале обозначенный *sucB* (аналог E2, *cg2421*), кодирует пептид, который состоит из трех доменов, связывающих липоевую кислоту, разделенных линкерными последовательностями, и С-концевого ацилтрансферазного домена. Этот пептид обладает ацетилтрансферазной активностью, но не сукцинилтрансферазной, и поэтому его функция подобна функции гена *aceF*, кодирующего соответствующую субъединицу пируватдегидрогеназы (см. выше). В связи с этим он переименован в *aceF*. С другой стороны, ацилтрансферазный домен субъединицы *OdhA*, напротив, обладает только сукцинилтрансферазной активностью.

Ген *lpd* (*Cg0790*) кодирует субъединицу, подобную субъединице E3 кишечной палочки, которая входит в состав комплекса пируватдегидрогеназы и КГД.

Любые делеция внутри гена *odhA* в клетках *S.g.* приводят к практически полной потере способности к росту на глюкозе и к накоплению в среде 2-КГ кислоты, а также уксусной, что свидетельствует об отсутствии окисления ацетата в ЦТК [192]. Делеция гена *odhA* приводила не только к утрате активности КГДК, но неожиданно наблюдалось и снижение активности пируватдегидрогеназы, что подтверждает гипотезу о существовании ферментного суперкомплекса в клетках *S.g.*, включающего в себя пируватдегидрогеназный комплекс и КГДК. Первые данные, указывающие на существование такого суперкомплекса, появились из экспериментов по выделению КГДК, когда оказалось, что при выделении субъединицы *OdhA* соочищалась также субъединица E1p (ген *aceE*), один из компонентов пируватдегидрогеназного комплекса. Подобное наблюдалось и при попытке выделить E1p, тогда соочищались компоненты КГДК *OdhA*, *SucB* и *Lpd* [193].

Поскольку было известно, что в условиях индукции продукции Глу происходит снижение активности КГДК и перенаправление 2-КГ на синтез Глу [194], то выглядело заманчивым делетировать ген *odhA* (*cg1280*), который присутствует только в этом комплексе. Впервые это удалось японским исследователям компании Аджиномото (2007 год [195]). Вначале клонировали на

плазмиде фрагмент хромосомы *S. g.*, содержащий этот ген [191]. Затем делетировали центральную часть гена, и такая конструкция была введена в хромосому путем гомологичной рекомбинации с нативным геном *odhA*, который в результате был замещен его делеционным вариантом. Клетки такого мутанта утратили активностью КГДК, способность к росту на глюкозе ухудшилась, однако произошел отбор быстро растущих на глюкозе клонов, но при этом отсутствовала активность фермента. Такие штаммы эффективно продуцировали Глу без индуцирующих продукцию воздействий. Состав липидов мембран был таким же, как у штамма дикого типа. Авторы пришли, как позже выяснилось, к ошибочному выводу, что продукция Глу возникла только за счет перенаправления накапливающегося 2-КГ на синтез Глу, и поэтому никакого внешнего воздействия на цитоплазматическую мембрану не требуется. Позднее было показано [196], что продукция Глу наблюдалась лишь у мутантов по мембранному белку, транспортирующему Глу наружу (см. ниже).

Действие факторов, которые вызывают продукцию Глу у штамма дикого типа (биотиновое голодание и т.д) усиливали также и продукцию Глу штаммами с делецией гена *odhA*. То есть, действие делеции и индуцирующих продукцию факторов было аддитивным. Учитывая тот факт, что при действии всех известных индуцирующих факторов отмечалось снижение активности КГДК [194], положительное их действие на продукцию при полном отсутствии активности этого фермента в результате делеции *odhA*, является указанием на то, что эти индуцирующие факторы включают какие-то дополнительные механизмы, вероятнее всего - увеличение транспорт Глу наружу.

С другой стороны, при амплификации гена *odhA197* штаммы с высокой активностью КГДК не продуцировали Глу даже при индукции (Твин 40) [197], что еще раз подтверждает мысль о множественности условий необходимых для продукции Глу.

1.15. Роль белка OdhI в продукции глутамата

Важным для понимания механизма продукции Глу и проливающим свет на ранее известный факт снижения активности КГДК при индукции (голодание по биотину, присутствие пенициллина или детергента Твин 40) является обнаружение взаимодействия белка OdhA с небольшим пептидом OdhI (143 аминокислотных остатка), который со-очищался при выделении белка OdhA [193]. Белок OdhI (нефосфорилированный) связывается с белком OdhA и инактивирует его ($K_i=2,4$ нМ), что фенотипически (при амплификации) проявляется в неспособности клеток усваивать экзогенный глутамин в качестве источника азота и углерода, поскольку для этого необходима активность КГДК.

OdhI является явным гомологом белка GarA *M. tuberculosis* (см. выше) по структуре и механизму действия в отношении субъединицы КГДК (фосфорилирование треониновых остатков на N-конце, инактивация OdhA), однако он в отличие от GarA не взаимодействует с другими ферментами центрального метаболизма. Структура OdhI из *S.g.* изучена с помощью техники ЯМР [198]. Он состоит из короткого N-фрагмента (40 остатков аминокислот), в котором находятся два смежных треонина (Thr14 и Thr15), далее следует известный домен FHA (fork-head associated). Фосфорилирование указанных треониновых остатков вызывает изменение конформации, и фосфорилированный OdhI утрачивает способность связываться с белком OdhA и ингибировать КГДК. Подобные пептиды с доменом FHA обычно участвуют в различных биологических процессах: транскрипция, репарация ДНА, деградация белков у эукариот [199].

Делеция гена *odhI* [200], как и ожидалась, приводила к резкому снижению продукции Глу во всех условиях культивирования, которые индуцируют продукцию у штамма дикого типа. Ее уровень составлял (в % от уровня продукции штамма дикого типа в тех же условиях):

при лимитации по биотину - 5%;

в присутствии Твин 40 – 13%;

в присутствии пенициллина G – 7%

в присутствии этамбутола - 1%.

Возникает вопрос : чем объясняется остаточная продукция у штаммов с делецией гена *odhI*, если у них сохраняется высокая активность КГДК? Очевидно, это результат действия данных индукционных факторов на клеточную проницаемость для Глу. С другой стороны эти данные указывают на необходимость снижения активности КГДК для продукции Глу и на то, что механизм действия всех этих факторов предусматривает использование белка *OdhI* для снижения этой активности.

При действии пенициллина на растущую культуру обнаружилось, что возрастает экспрессия только 13 белков, и среди них оказался *OdhI*, количество которого возросло в 10 раз [201]. Этот факт объясняет от части возникающую под действием пенициллина продукцию, так как при сверхэкспрессии гена *odhI* также происходит сверхпродукция Глу. Если пенициллин вносился одновременно с добавлением хлорамфеникола, ингибитора синтеза белка, то сверхпродукции Глу не наблюдалось, как и синтеза *OdhI*. Но если хлорамфеникол вносили через 4 часа после добавления пенициллина, то уже начавшийся синтез Глу не прекращался, что означает, что за 4 часа успевает синтезироваться достаточное количество белка *OdhI*. Все это указывает на необходимость синтеза *de novo* белка *OdhI*, который инактивирует субъединицу *OdhA* ОГКД, что и вызывает сверхпродукцию.

1.16. Фосфорилирование пептида *odhI* протеинкиназами.

Белок *OdhI* в свою очередь является субстратом для протеинкиназ [193]. Вначале обнаружили, что протеинкиназа, кодируемая геном *pknG*, фосфорилирует остаток треонина в 14 позиции пептида *OdhI*. В экспериментах *in vitro* белок *PknG* обнаруживал способность к автофосфорилированию и к

переносу фосфатной группы на белок OdhI. Фосфорилированная форма белка OdhI уже была неспособна инактивировать субъединицу OdhA КГДК.

Вскоре было обнаружено, что соседний треонин в 15 позиции белка OdhI также может быть фосфорилирован, но другими протеинкиназами (PknA и PknB) [202]. Интересно, что если белок уже фосфорилирован в позиции 14, то треонин в позиции 15 не может быть фосфорилирован и наоборот. Оба типа фосфорилирования приводят к конформационным изменениям белка OdhI, которые препятствуют его связыванию с OdhA и, соответственно, ингибированию активности КГДК. Если же белок не фосфорилирован, то происходит взаимодействие между FНА доменом OdhI и С-концевым дегидрогеназным доменом белка OdhA, приводящее к потере активности КГДК [203]. В клетках, в которых нарушено дефосфорилирование (ген для дефосфорилазы *ppr* делетирован), обнаружены формы OdhI с фосфорилированием не только треониновых остатков в 14-ом и 15-ом положении, но и еще в двух пока неустановленных положениях [204].

Получены мутанты по гену *odhI*, способные к росту на глутамине на фоне делеции гена для протеинкиназы *pknG*, которые утратили способность инактивировать субъединицу OdhA [205]. Мутации произошли в гене *odhI*, как показал проведенный сиквенс ДНК. На основании изменений в аминокислотных последовательностях мутантных OdhI разработана структурная модель взаимодействия белков OdhA и OdhI, вызывающего ингибирование активности КГДК.

В хромосоме *S. g.* есть 4 гена, кодирующие протеинкиназы типа серин/треониновых (СТПК): *pknA* (cg0059), *pknB* (cg0057), *pknG* (cg3046), *pknL* (cg2388) [18]. PknA, PknB и PknL - трансмембранные белки, обладающие

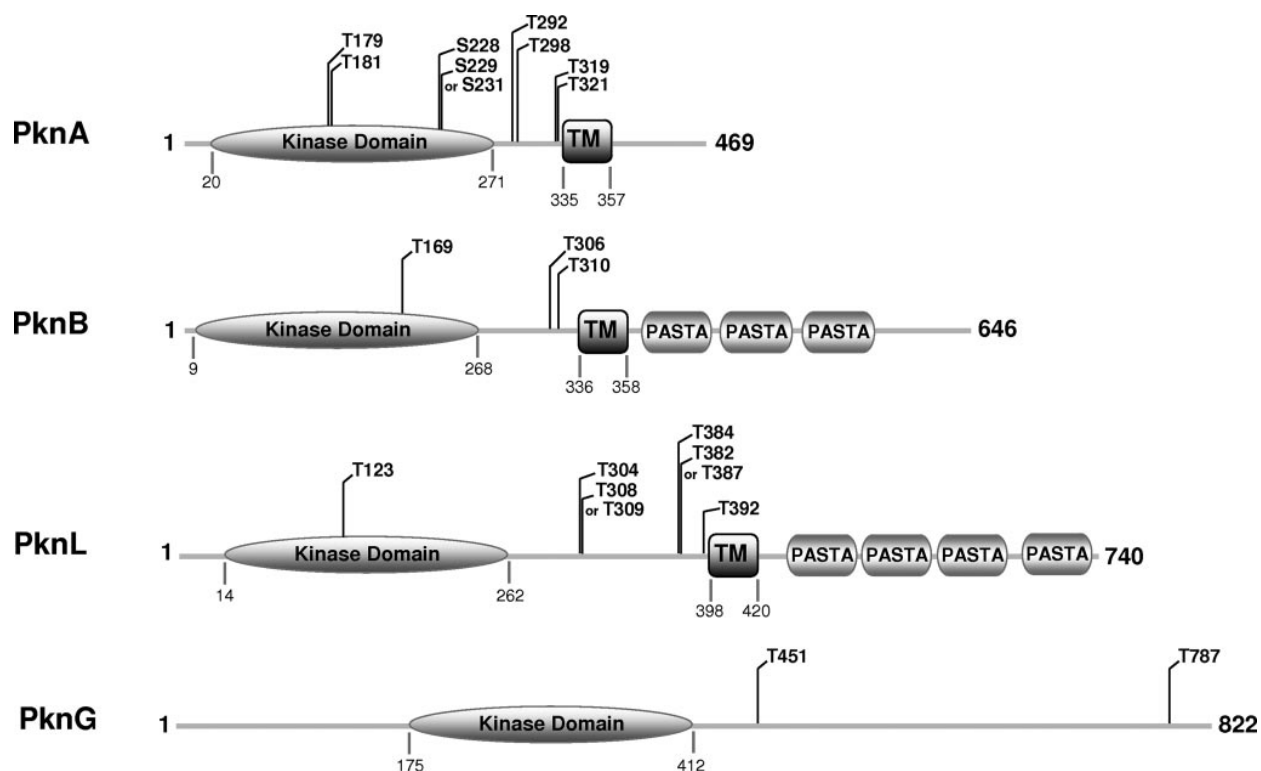


Рис. 27. Схема строения протеинкиназ *C. g.* по Fiuza et al., 2008 [202]

одним трансмембранным доменом, тогда как PknG – растворимый цитоплазматический белок (Рис. 27). Если инактивация генов *rknG* и *rknL* не влияла на жизнеспособность и морфологию, то клетки с делецией генов *rknA* или *rknB* мало жизнеспособны [202]. Все четыре белка способны фосфорилировать белок OdhI, и наибольшую активность в этом процессе показал белок PknG. PknA, PknB, PknL способны к самофосфорилированию в присутствии АТФ, т.е. обладают автопротеинкиназной активностью. Для фосфорилирования PknG и перевода этого фермента в активное состояние благоприятно присутствие PknA, хотя PknG способен к самофосфорилированию и без PknA. Так как PknA имеет С-концевой домен в периплазме, то, вероятно, он и передает сигнал из периплазмы на цитоплазматическую протеинкиназу PknG, которая в свою очередь фосфорилирует OdhI, который теряет способность ингибировать КГДК.

Фенотип штамма с делецией гена *rknG* - неспособность усваивать глутамин в качестве единственного источника углерода и азота, то есть, нарушен катаболизм

глутамин. В отсутствие PknG белок OdhI не фосфорилирован и инактивирует OdhA. В результате КГДК теряет необходимую для роста на глутамине 2-кетоглутаратдгидрогеназную активность [193]. Вопреки ожиданиям делеция гена *rknG* не приводила к продукции Глу в не индуцирующих продукцию условиях, а при индукции уровень продукции был сравним с уровнем штамма дикого типа, хотя и в некоторых условиях превышал его по скорости накопления продукта [200, 206]. Полученные результаты означали, что в фосфорилировании OdhI участвуют и какие-то другие протеинкиназы из оставшихся трех, что вскоре и подтвердилось. Но важнее то, что для продукции Глу нужна мутация в гене, кодирующем экспортер глутамата, что во время данного исследования не было известно.

Глу является промежуточным продуктом в биосинтезе аминокислот семейства Глу (глутамин, пролин, аргинин), а также их производных и предшественников, которые представляют интерес для биотехнологической промышленности. В связи с этим для улучшения продукции этих веществ целесообразно усилить синтез самой Глу, что может быть достигнуто снижением активности КГДК, который перенаправляет 2-КГ на синтез Глу, а не на окисление в ЦТК.

Активность КГДК у продуцента путресцина на основе *S. g.* удалось снизить путем введения мутаций в ген *odhI*. В частности треониновый остаток (в 14 или в 15 позиции), который фосфорилируется протеинкиназой PknG, был заменен на аланиновый [207]. В результате нефосфорилирующийся белок OdhI эффективно ингибировал КГДК, что увеличивало продукцию путресцина (диамин, производный аргинина) на 28%.

Была также использована делеция гена *rknG* с той же целью – для ингибирования активности КГДК [208]. В результате нефосфорилированный белок OdhI эффективно ингибировал КГДК в штамме *S. g.*, продуцирующим гамма-аминомасляную кислоту (продукт декарбоксилирования Глу), что в 2,29 раза увеличило выход конечного продукта, который достиг 0,89 молей на моль израсходованной глюкозы.

Что касается протеинкиназы PknA, то было показано участие этого белка в регуляции синтеза ПГ. В частности, пептидаза MurC, катализирующая реакцию прикрепления D-ala, первой аминокислоты, к гликановому полимеру, фосфорилируется под действием PknA и в результате утрачивает активность, что было показано как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* [209]. Способность к дефосфорилированию белка OdhI обнаружилась у фосфосерин/фосфотреонинфосфатазы (ген *ppp*, Cg0062) [204]. Делеция гена *ppp* могла бы повысить долю фосфорилированных молекул белка OdhI и тем самым повысить активность ОГДК, снижая продукцию Глу. Показано, оказалась, что делеция *ppp* приводит к серьезным нарушениям морфологии клеток и низкой скорости деления, что исключает оценку продуктивности. По-видимому, этот мембранный белок (Ppp) участвует и в каких-то других существенных для клетки процессах.

1.17. Значение фосфорилирования белка OdhI для продукции глутамата.

Как показано выше, только нефосфорилированная форма OdhI связывается и активирует субъединицу OdhA КГДК, тогда как после фосфорилирования с участием протеинкиназ эта способность утрачивается. Напрашивался вывод о том, что индукция продукции Глу является результатом передачи какого-то внешнего сигнала (появление пенициллина и т.п.), который снижает активность 4-х известных протеинкиназ или наоборот усиливает активность фосфатазы Ppp. В результате этого сигнала увеличивается доля наличных нефосфорилированных форм OdhI, снижается активность КГДК, увеличивается внутренний пул 2-КГ, усиливается синтез Глу.

Ранние эксперименты по изучению фосфорилирования OdhI, проведенные при индукции продукции Глу голоданием по биотину или температурным шоком (с 33 до 39°C) в общем подтверждали эту идею [206]. Доля нефосфорилированной формы при обоих способах индукции продукции возрастала. В работе не определялось общее количество белка OdhI, и было неясно, продолжается ли

синтез этого белка после индукции продукции или речь идет о ранее синтезированном пуле белка. В то же время, по данным Kim с соав. 2010 [210], сообщалось о сильной индукции синтеза белка OdhI в условиях продукции Глу, но не при голодании по биотину, а при действии пенициллина и Твина 40. В более поздних исследованиях тех же авторов [211] они индуцировали продукцию добавлением в ферментационную среду либо пенициллина, либо Твина 40 через 6,75 час после начала инкубации, что через 3-4 часа вызывало накопление Глу. В ходе культивирования определялся уровень OdhA, а также фосфорилированных и нефосфорилированных форм. Для визуализации белков использовались приготовленные антитела против OdhI и OdhA. Доля белка OdhA практически не менялась в ходе выращивания как в условиях без индукции, так и при индукции продукции Глу, но в условиях индукции возрастало количество OdhI (дерепрессия) и особенно нефосфорилированной формы. Их вывод: в условиях индукции активность КГДК снижается в результате увеличения количества нефосфорилированной формы OdhI. Таким образом, данные Kim с соав., 2011 [211] согласуются с данными Boulaya с соав., 2010 [206]: доля нефосфорилированной формы OdhI увеличивается после индукции продукции Глу, но это увеличение доли есть результат увеличения синтеза *de novo* этого белка, а не результат снижения активности протеинкиназ. Повышается количество обеих форм OdhI и, в особенности, вновь синтезируемой нефосфорилированной формы, ее количество становится в 3 – 4 раза больше, чем фосфорилированной. По-видимому, скорость фосфорилирования белка OdhI протеинкиназами не меняется в результате индукции, а суммарной активности протеинкиназ просто не достаточно, чтобы фосфорилировать возросшее количество белка OdhI. В результате и доля, и общее количество активной формы OdhI резко увеличивается.

В более позднем исследовании (2016 год) с использованием современных методов протеомики не обнаружено снижения уровня синтеза ингибиторного белка OdhI при индукции продукции Твином 40 [212], что может быть

обусловлено применением другого способа индукции продукции глутамата. В этом же новом исследовании обнаружено резкое снижение (в 34 раза) уровня белка *dtsR1* (субъединица ацетил-КоА карбоксилазы). Этот факт указывает на сходство механизмов индукции путем голодания по биотину и действия Твинов – оба эти воздействия снижают синтез жирных кислот.

Результатам исследования Kim с соав., 2010 противоречат также более ранние данные Kataoki с соав., 2006 [213], в которой оценивалась экспрессия генов (мРНК) при голодании по биотину, в присутствии Твина 40, пенициллина. Контролем служила культура, растущая в присутствии Твина 80, который не вызывает продукции Глу. Наблюдалось снижение синтеза мРНК, соответствующих генам пути биосинтеза Глу, ЦТК, гликолиза. Из генов, кодирующих субъединицы КГДК, *odhA* и *aceF* (*sucB*, субъединица E2 α) были сильно репрессированы по сравнению с контролем (в 6 – 12 раз). Именно с этой репрессией гена *odhA* они связывают сверхпродукцию Глу.

С другой стороны, в работе китайских исследователей 2014 года [214], которые также изучали экспрессию генов центрального метаболизма при индукции продукции Глу при голодании по биотину и Твином 40, не было обнаружено значительного изменения экспрессии гена *odhA* при голодании по биотину. Неожиданный результат, который они описывают – это резкое (в 17 раз) повышение уровня экспрессии этого гена при индукции добавлением Твина 40 при избыточной концентрации биотина. Они обнаружили также чрезвычайно высокий уровень экспрессии гена, кодирующего экспортер Глу (*Cgl1221*), когда биотин был в избытке и особенно, когда добавлялся ещё и Твин 40.

Рассмотренные выше результаты во многом противоречат друг другу, что затрудняет сделать вывод о механизме, который вызывает снижение активности КГДК при индукции продукции глутамата.

Можно предположить, что, несмотря на возможное снижение или увеличение экспрессии генов *odhA* и *odhI*, в клетках некоторое время сохраняется прежнее количество соответствующих белков, время жизни которых неизвестно и,

вероятно, достаточно продолжительное. При этом общее количество биомассы увеличивается незначительно после начала продукции Глу. Учитывая эти соображения, можно считать, что количественный фактор не имеет большого значения, и более существенным можно считать инактивацию субъединицы OdhA нефосфорилированной формой OdhI.

Важным фактором, обуславливающим продукцию Глу, является увеличение уровня синтеза регуляторного белка OdhI, возможно, за счет дерепрессии гена *odhI*. Конкретный механизм регуляции экспрессии этого гена пока остается неизвестным. Можно предполагать, что сигнал о появлении в среде пенициллина или о тех или иных дефектах слоя ПГ происходит от взаимодействия пенициллинсвязывающих доменов PASTA, которыми обладают все протеинкиназы кроме PknG. Этот сигнал далее передается цитоплазматическим протеинкиназным доменам, которые приобретают способность регулировать экспрессию гена *odhI*, фосфорилируя соответствующие регуляторные белки (Рис.28)

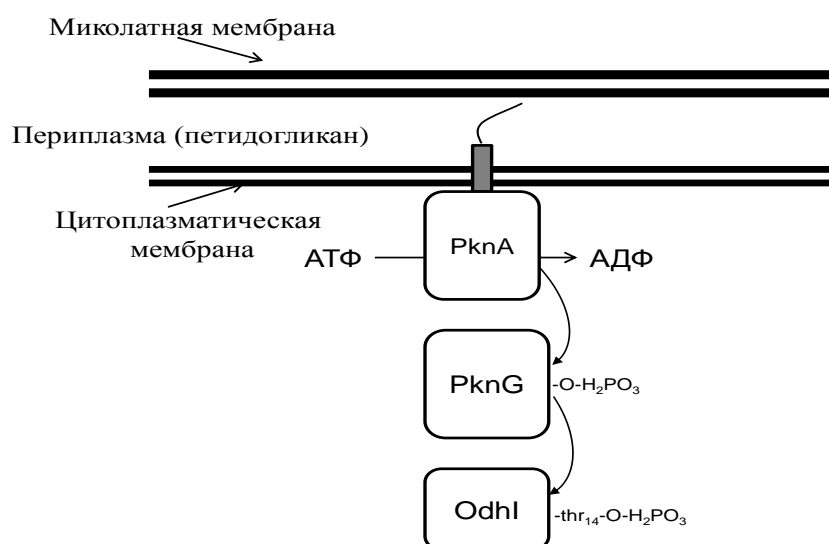


Рис. 28. Путь переноса фосфатных групп от трансмембранного белка PknA на треониновый остаток белка OdhI, в результате чего OdhI теряет способность ингибировать активность КГДК.

Как уже отмечалось, даже полная инактивация КГДК за счет делеции гена *odhA* не вызывает продукции Глу [196], но продукция возникает без индукции, если присутствует определенная мутация в гене для транспортера Глу *Cgl1221*. Это означает, что при действии любых индуцирующих продукцию внешних факторах, необходима активация этого транспортера. В работах Кима с соав. [210, 211] и в их обзоре литературы 2012 года [215] среди прочего показано, что при плазмидной амплификации гена *odhI* происходит накопление Глу в среде даже в присутствии избытка биотина. Это сопровождается увеличением количества нефосфорилированной формы *OdhI* и снижением активности КГДК. Авторы предполагают, что существует взаимодействие между нефосфорилированной формой белка *OdhI* и цитоплазматической частью трансмембранного белка, транспортирующего глутамат из клеток, продуктом гена *Cgl1221*. В результате этого взаимодействия транспортер претерпевает конформационные изменения, активирующее его транспортную активность. Это - только предположение, которое согласуется с современными представлениями о механизме продукции Глу ГПКБ.

1.18. Возможная роль процесса ацетилирования белков в продукции глутамата *C. glutamicum*

С помощью современного протеомного анализа клеток *C.g.*, выращенных в условиях продукции Глу (индукция Гвином 40), обнаружилось, что при этом резко снижается ацетилирование ферментов (ацетируется свободная аминогруппа лизина), существенных для продукции (гликолиз, ЦТК) и в том числе белка *OdhA*. Наблюдает, однако, усиление сукцинирования этих белков [212]. Можно предположить, что обнаруженное изменение модификации ферментов вызывает усиление потока в сторону синтеза 2-КГ и далее Глу. Однако данные по изменению ферментативных активностей модифицированных ферментов пока не опубликованы. Остается неясным, является ли обнаруженное

изменение модификации ферментов причиной продукции Глу или же, наоборот, - следствием этой продукции, вызванной другим механизмом. В пользу второй альтернативы свидетельствуют следующее. В условиях продукции снижен внутриклеточный пул ацетилфосфата, основного агента неферментативного ацетилирования. В то же время уровень концентрации сукцинил-КоА в клетках достаточен для эффективного сукцинирования (вместо ацетилирования). Будущие исследования позволят сделать выбор между указанными альтернативами.

1.19. Обнаружение и роль белка, транспортирующего глутаминовую кислоту из клеток ГПКБ

Факторы, приводящие к продукции Глу *S. g.*, можно разделить на две группы:

1. влияющие на синтез ЖК, необходимых для создания фосфолипидов цитоплазматических мембран и миколовых кислот;
2. нарушающих целостность клеточной стенки.

К первой группе можно отнести, лимитирование биотина и действие поверхностно активных веществ, подобных Твинам, подавляющих синтез жирных кислот. Нарушение состава липидов мембран также приводит к выделению Глу. Амплификация гена *cls* (синтез кардиолипина, одного из фосфолипидов мембраны) приводила к продукции Глу, что связывают с изменением состава липидов мембраны, происходящего из-за усиления одного из направлений синтеза фосфолипидов за счет ослабления других [216].

Вторая группа факторов включает практически любые воздействия на клеточную стенку, представляющую собой единую полимерную молекулу, сшитую ковалентными связями (ПГ-арабиногалактан-МК). К ним относится пенициллин, нарушающий синтез ПГ, лизоцим, катализирующий гидролиз бета-1,4 гликозидных связей между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой при синтезе нитей ПГ. Хотя клетки *S. g.* необычайно устойчивы к действию лизоцимов, все же найдена мутация в гене *ItsA*, кодирующую одну из

амидотрасфераз, участвующую в создании ригидного ПГ-ового каркаса, и при наличии этой мутации действие лизоцима уже приводит к продукции Глу [157, 158]. Ингибитор синтеза миколатных мембран, противотуберкулезный антибиотик этамбутол, также вызывает продукцию Глу. Этамбутол ингибирует фермент арабинозилтрансферазу [217], в результате арабиногалактановый слой лишается арабинозных остатков, к которым прикрепляются миколовые кислоты. Делеция генов биосинтеза трегалозы, миколовые эфиры которой образуют внешний слой внешней части миколитической мембраны, также приводила к продукции Глу в присутствии биотина [218].

Таким образом, неполноценность любого компонента клеточной стенки, нарушающая ее целостность, включая цитоплазматическую и миколатную мембрану, приводит к продукции Глу. Изучение транспорта Глу через клеточную стенку *S. g.*, проведенное немецкими исследователями показало [219], что в условиях голодания по биотину секреция Глу протекает против градиента её концентраций, и поэтому нуждается в специальном переносчике. При этом вероятность использования системы транспорта внутрь клеток для секреции наружу (обращенный транспорт), которая предполагалась ранее [220, 221], была исключена. Транспорт Глу не сопровождался переносом каких-либо ионов ни в одном из направлений и не зависел от мембранного потенциала. Наблюдалась корреляция между скоростью транспорта и пулом АТФ, вызвало предположение, что транспорт осуществляется за счет расщепления АТФ, как это обычно происходит при транспорте аминокислот внутрь клеток (ABC – транспортеры). Все же участие АТФ в этом процессе экспериментально подтвердить не удалось.

Эти данные противоречили старой “leaky” теории [11, 17, 19, 20], по которой предполагалось, что Глу “вытекает” из клеток, и снижается его внутриклеточная концентрация, а в результате ферменты его синтеза освобождаются от ингибирования конечным продуктом.

Переносчик Глу и детерминирующие его гены удалось идентифицировать только в 2007 [196]. Ранее были получен штамм с делецией гена *odhA*, который

сразу превратился в мощный продуцент Глу в присутствии биотина. Авторы пришли к ошибочному выводу, что не требуется никаких изменений транспорта Глу, а достаточно только этой делеции, приводящей к утрате активности КГДК. Этот вывод был вынесен в заголовок статьи [195]. В том же году эти данные были заново проанализированы, и оказалось, что большинство клонов с делецией гена *odhA* продуцировали 2-КГ, а не глутамат. Продукция же Глу возникла лишь у одного клона, который, вероятно, приобрел неизвестную спонтанную мутацию, улучшающую роста на глюкозных средах. Действительно, накопление 2-КГ ухудшало рост, а превращение его в более нейтральную Глу улучшало его. Чтобы понять сущность этой спонтанной мутации, важной для продукции, были заново получены штамма с инактивацией гена *odhA*. С помощью ПЦР был синтезирован внутренний участок гена *odhA* и вставлен в плазмиду, не способную к репликации в коринебактериях. Плаزمида, несущая маркер устойчивости к антибиотику, была интегрирована в хромосому за счет гомологичной рекомбинации с хромосомным геном *odhA*, и в результате в хромосоме образовались две неполноценные копии гена *OdhA* (одна - без терминальной части гена, другая - без начала гена), разделенные последовательностью плазмиды с маркером. Полученные клоны (плохой рост на агаре, нестабильная морфология) выращивали в жидкой минимальной среде с глюкозой, в которой они накапливали 2-КГ, однако один из клонов продуцировал Глу вместо 2-КГ.

Чтобы убедиться, что этот клон получил спонтанную мутацию, дикий тип гена *OdhA* был восстановлен, путем гомологичной рекомбинации с той же плазмидой, и были проанализированы клоны, утратившие плазмидную последовательность из хромосомы вместе с антибиотическим маркером и тем самым улучшившие свой рост (размер колоний на минимальном агаре). У полученных крупных колоний восстановилась активность КГДК, но при этом сохранилась способность к продукции Глу в присутствии биотина, хотя и несколько сниженная по сравнению с родительским штаммом, дефектным по гену *odhA*. Эта продукция была обусловлена искомой спонтанной мутацией. После

исчерпания сахара в среде такие штаммы потребляли выделившуюся Глу (Рис. 29), что происходит с участием активного КГДК.

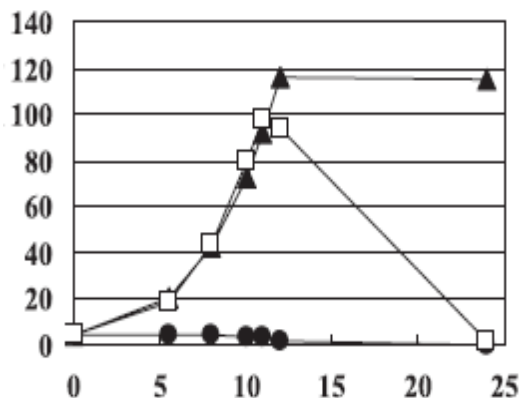


Рис. 29. Накопление глутаминовой кислоты (г/л) на среде с биотином [196].

- Штамм дикого типа - нижняя кривая.
- Мутант с восстановленным геном *odhA* и способным к продукции за счет неизвестной спонтанной мутации - средняя кривая.
- ▲ Штамм с инактивированным геном *odhA* и способным к продукции за счет неизвестной спонтанной мутации – верхняя кривая.

Для идентификации спонтанной мутации, которая не только обуславливала продукцию, но и замедляла рост, штамм был трансформирован плазмидным банком хромосомы дикого типа. В результате найдена плазида, которая улучшала рост на минимальном агаре и одновременно устраняла продукцию Глу в присутствии биотина. Определение последовательности ДНК вставки в плазмиде показало, что она содержит рамку *Sgl1221*, ранее аннотированную как экспортер бетаина [222], а в хромосомном гене *Sgl1221* была выявлена вставка IS-последовательности, которая должна прерывать транскрипцию гена так, что должен синтезироваться укороченный до 423 а.к. полипептид (вместо 553 а.к.). Этот мутантный ген со вставкой IS-элемента был клонирован и затем интегрирован в хромосому дикого типа, заместив соответствующий ген дикого типа. Это привело к способности к продукции Глу в присутствии биотина, подтвердив роль искомой мутации в сверхпродукции Глу [196].

1.20. Механочувствительные каналы прокариот

Бактерии отделены от внешней среды клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной, в которой находятся механочувствительные каналы (МЧК) различных типов, которые позволяют клетке противостоять изменениям осмотического давления внешней среды. Так, разность в осмомолярности порядка нескольких мМ между внутренней и внешней стороной мембраны обычно достаточна для полной активации МЧК, в результате в них возникает ток ионов, малых молекул или воды для выравнивания этой разности. При усложнении форм жизни при переходе к многоклеточным организмам МЧК претерпели эволюционные изменения, направленные на специализацию в качестве сенсоров всевозможных сигналов. В растениях, например, они определяют положение растений в гравитационном поле Земли, у животных они нужны для регуляции ритма сердца, а также для слуха и осязания [223]. Действуя во временном диапазоне миллисекунд и пропуская через себя миллионы молекул в секунду, они являются преобладающим типом сигнальных макромолекул, которые превращают механические сигналы в химические и электрические.

МЧК необходимы в условиях и гипоосмотического, и гиперосмотического стресса. Бактерии поглощают ионы из внешней среды за счет активного транспорта, чтобы повысить осмотическое давление внутри клетки. При снижении осмотического давления среды открываются МЧК, и ионы проходят через них наружу без затрат энергии при пассивной диффузии (механизм “pump and leak”) [224].

У прокариот обнаружено два типа МЧК: с большой проводимостью (MscL) и с малой проводимостью (MscS). Они различаются на порядки по проводимости и, соответственно, по структуре. Если MscL практически не обладают специфичностью в отношении веществ, которые они пропускают, то MscS, как правило, высокоспецифичны [225]. *E. coli* обладает двумя главными МЧК:

MscL и MscS, и пятью минорными МЧК (типа MscS), MscK (KefA), YbdG, YbiO, YjeP, YnaI [226 - 229]. Их функция проявляется в гипоосмотических условиях. Уровень экспрессии гена для наиболее изученного канала MscS повышен, как ни странно, при высоком осмотическом давлении среды. Видимо, этот высокий уровень может оказаться важным при резком падении внешнего осмотического давления [230]. Этот канал располагается на полюсах клетки, где присутствует фосфолипид кардиолипид [231]. Предполагается участие канала в поддержании гомеостаза иона кальция [232]. Функция канала MscK – в поддержании концентрации калия [233].

Строение каналов типа MscL и MscS различно. Так, мономер MscL из *Mycobacterium tuberculosis*, который является модельным для каналов этого типа, содержит два трансмембранных домена, а N- и C- концы находятся в цитоплазме, тогда как перемычка между трансмембранными доменами находится с внешней стороны мембраны. Сам канал состоит из пяти таких мономеров (возможно, только 4-х) [234], а пора «облицована» пятью (или 4-мя) идентичными трансмембранными доменами [235]. Механические и химические стимулы влияют на изменения конформации всей структуры, что приводит к закрытию или открытию канала. К ним относятся: температура, механическое натяжение мембраны, статическое магнитное поле, рН, некоторые органические вещества (например, парабены) и ионы тяжелых металлов [223]. Структура канала малой проводимости MscS из кишечной палочки сейчас считается модельной [236]. Мономер MscS содержит три трансмембранных домена, N-конец находится вне цитоплазма, C-конец – в цитоплазме. На основе рентгеноструктурного анализа полагают, что канал состоит из 7-ми мономеров. Оба типа каналов открываются при растягивании мембраны [237, 238].

У *Bac. subtilis* обнаружен один канал типа MscL и три MscS (YkuT, YhdY, YfkC) [239]. В геноме *S. g.* обнаружены только два гена, кодирующие МЧК – это гомолог MscL (NCgl0834) и гомолог MscS (NCgl1221), но они не способствуют выживанию этого микроорганизма в условиях гипоосмотического стресса [196,

222]. Канал большой проводимости NCg10834 не участвует в освобождению из клеток бетаина (естественный осмопротектор) при резком снижении внешнего осмотического давления, тогда как канал с малой проводимостью, NCg11221, по-видимому, участвует в этом процессе. При делеции генов для обоих каналов уровень экскреции (сниженный) сохраняется. Отметим, что в то время не было известно о способности канала NCg11221 транспортировать Глу во внешнюю среду.

Как уже упоминалось, MscL, кодируемый геном NCg11221, является тем самым транспортером Глу, который и обуславливает продукцию этой аминокислоты в ответ на механическое напряжение цитоплазматической мембраны, возникающее при сниженном синтезе ЖК при дефиците биотина, а также при прочих воздействиях на клеточную стенку [196]. Для изучения действия этого канала были индуцированы гигантские протопласты из клеток *Bac. subtilis* (на основе *S.g.* не удалось создать достаточно крупные протопласты) [240, 241]. У штамма *Bac. subtilis* были делетированы все 4 гена, кодирующие мембранные каналы (см. выше), а ген из *S.g.* NCg11221 интегрирован в хромосому, и его экспрессия была индуцирована. С помощью специальной микротехники измерялся ток ионов через мембраны искусственных вакуолей, полученных из гигантских протопластов (электрофизиологический метод patch-clamp). Показано, что при нажатии на мембраны происходит выброс анионов из вакуолей, то есть каналы действительно открываются при механическом напряжении мембраны. Если же мембраны не содержали транспортера Ncg11221, то происходил разрыв мембран без тока ионов. Ионы глутамата или аспартата вызывали значительно больший ток, чем неорганические ионы буфера. При этом никакого ионного градиента по обе стороны мембран не было, АТФ также отсутствовал. Таким образом, движение ионов глутамата или аспартата энергонезависимо, то есть является пассивной диффузией. Кроме того канал обладает незначительно большей специфичностью в отношении Глу по сравнению с аспартатом. Аналогичные эксперименты с использованием гигантских протопластов на основе штаммов

E.coli с делецией генов, кодирующих МЧК, выполненные немецкими исследователями, подтвердили эти данные [242]. Эти эксперименты подтверждают по сути *leaky model*, предложенную почти полвека лет назад, которая объясняла продукцию Глу повышением проницаемости мембраны, за исключением того, что поры для выделения Глу состоят из белка.

Учитывая низкую специфичность транспортера NCg11221, его удалось использовать для продукции фенилаланина продуцентом на основе *E.coli*, при этом использовалась мутантная форма транспортера, которая не требовала напряжения мембраны для открытия пор (делеция С-концевого периплазматического домена) [241]. Применение мутантного NCg11221 позволило и увеличить накопление фенилаланина в среде, и улучшить рост, который был подавлен высоким внутриклеточным пулом фенилаланина ввиду недостаточной экскреции этой аминокислоты. Этим примером показана возможность использования этого или ему подобных МЧК для усиления продукции любой аминокислоты их продуцентами по крайней мере полученными на основе кишечной палочки.

МЧК NCg11221, был всесторонне изучен у двух штаммов дикого типа *S.g.* ATCC13869 в Японии и ATCC13032 – в Германии. Определение нуклеотидной последовательности мутантного гена Ncgl1221, вызывающего продукцию Глу, показало, что ген содержит инсерцию IS1207 в позиции 1258, что должно приводит делеции С-концевого фрагмента белка. Чтобы убедиться, что именно эта делеция вызывает продукцию Глу без обычной индукции, хромосомный ген дикого типа был заменен мутантный, клонированный на плазмиде. Полученный штамм эффективно продуцировал Глу без какой-либо индукции. Секвенированы также гены NCg11221 у других ранее полученных мутантов, продуцирующих Глу без индукции. Следующие замены аминокислот обуславливали продукцию: Ala100->Thr, Ala111->Val, Pro424->Leu, а также замена Trp15 на вставку Cys-Ser-Leu-Trp (мутации обозначены на рис. 30). Мутации замены Ala на Val в позиции 111 (С-конец третьего трансмембранного домена, см. Рис. 30) было посвящено

специальное исследование с применением электрофизиологического метода patch-clamp с использованием сферопластов *E.coli* [243]. Эта замена вызывала открывания канала и тока через него ионов при более слабом натяжении мембраны, чем белок дикого типа. Кроме того, раз начавшись, этот ток не прекращался и после снятия натяжения мембраны (явление гистерезиса), что объясняет постоянное накопление Глу штаммами, имеющими данную мутацию.

Делеция гена NCg11221 практически полностью устраняла продукцию даже при индукционном воздействии (биотиновое голодание). При этом резко увеличивалась внутриклеточная концентрация Глу, а также до некоторой степени аспартата, но концентрация 2-кетоглутаровой как внутри, так и вне клеток не менялась. Всё это однозначно подтверждало, что белок NCg11221, является экспортером Глу.

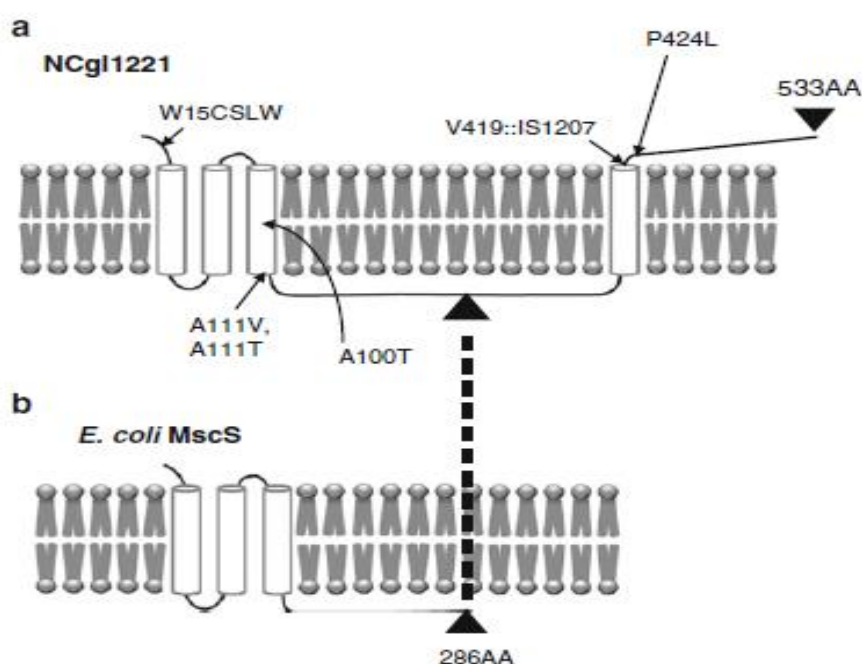


Рис. 30. Мембранная топология белка NCg11221 и его гомолога MscS из *E.coli* [242].

Топология белка NCg11221 была предсказана с помощью общедоступной компьютерной программы-предиктора PHD.htm (<http://www.predictprotein.org>) и приведена на рис. 30 [242]. Мутации, упомянутые выше и вызывающие продукцию Глу, обозначены. Ниже для сравнения показана топология

гомологичного белка MscS (YggB) из *E.coli*. Белок из *S.g.* содержит 4 трансмембранных домена, тогда как из *E. coli* - только 3. Вторым отличием является наличие С-концевого периплазматического домена и длинной внутриклеточной петли между 3-м и 4-м трансмембранными доменами. С-концевой домен имеет уникальную последовательность и присутствует только у коринебактерий, включая *Cor. diphtheriae*.

Альтернативную топологию белка NCg11221 предложили китайские исследователи [244]. К С-концу белка был пришит путем слияния генов зеленый флуоресцирующий белок, и клетки *E.coli* и *S.g.*, в которые была введена плаزمида с полученной конструкцией, изучали с помощью флуоресцентного микроскопа. Флуоресценция наблюдалась по краям клеток, что свидетельствовало о том, что изучаемый белок находится в мембране, а, во-вторых, сам факт флуоресценции свидетельствовал о нахождении С-конца белка NCg11221 в цитоплазме, а не в периплазме. Эти результаты не обсуждались в более поздней литературе, и по общепринятому мнению С-конец этого белка все же не находится в цитоплазме. Позднее эта же группа китайских исследователей использовала С-конец белка NCg11221, сшив его с геном альфа-амилазы для использования крахмала в качестве источника углерода для продукции Глу [245], что еще раз подтверждает факт того, что С-конец этого белка находится не в цитоплазме, а в периплазме.

Н-конец белка, включая 3 трансмембранных домена, сходен с MscS *E.coli*. Были получены делеционные варианты белка NCg11221 с различной протяженностью делеций, начиная с С-конца. При делеции экстраплазматического С-последовательности и введение соответствующей плазмиды в клетки штамма дикого типа, у которого делетирован ген NCg11221, такой штамм имел продуцирующий фенотип без индукции голоданием по биотину или иным способом. То есть, наблюдалось то же, что в случае инсерции IS1207 (см. выше). Неожиданным оказался результат, полученный в случае делеции, начиная с 287-ой аминокислоты в цитоплазматической петле. Плаزمида, экспрессирующая N-концевой фрагмент длиной 286 аминокислот, сообщала способность к продукции

в условиях индукции (пенициллин, голодание по биотину) также, как и плаزمиды с полной последовательностью гена. Более короткие фрагменты N-концевой последовательности были не эффективны в этом отношении. Итак, без C-концевого экстраплазматического домена есть продукция Глу без индукции, а при более протяженной делеции, включающей не только экстраплазматический домен, но и 4-ый трансмембранный домен, продукция происходит только при индукции. Этот факт наводит на мысль о взаимодействии экстрацитоплазматического домена с N-концевым фрагментом. Возможно, что C-концевой домен, включая его экстрацитоплазматическую последовательность, играет роль затычки для канала, хотя он и не участвует в процессе открытия/закрытия канала при механическом натяжении мембраны – N-терминальная часть белка сама является сенсором натяжения.

Сравнение трехмерных моделей (<http://swissmodel.expasy.org>) N-терминальных доменов NCg1221 с соответствующим доменом MscS (*E. coli*) обнаруживает их большое сходство (Рис. 31). Отличием является то, что NCg1221 содержит уникальную петлю (221 – 232 аминокислоты), делеция которой из полноразмерного гена приводила к неспособности комплементировать хромосомную делецию гена NCg1221 (полная неспособность секретировать Глу). Это указывает на то, что эта петля тем или иным образом связана со способностью к продукции Глу. Отсутствие этой петли, возможно, является причиной, по которой другие микроорганизмы не продуцируют Глу в ответ на индукцию (дефицит биотина, пенициллин и т.п.). Не исключено также, что эта петля участвует в регуляции активности КГДК, вызывая перенаправление 2-кетоглутарата из ЦТК на синтез Глу. С другой стороны, сейчас ясно, что открытие канала NCg1221 мутациями в гене, его кодирующем, само по себе достаточно для возникновения продукции Глу и перенаправлению потока углерода из ЦТК в сторону синтеза Глу.

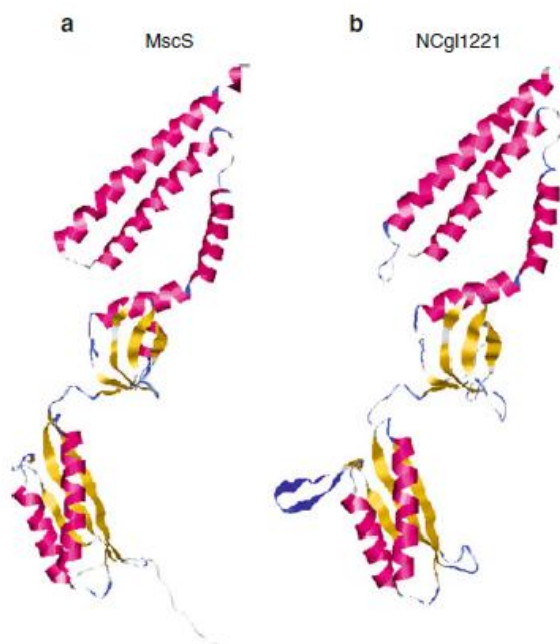


Рис. 31. Трехмерные модели транспортера MscS (*E. coli*) и гомологичному ему транспортеру глутамата NCgl1221 (*C. g.*)

После обнаружения японскими исследователя того факта, что мутации в гене NCgl1221 вызывают продукцию Глу [196], к изучению белка, кодируемого этим геном, приступили германские ученые. Они изучали ген и соответствующий белок, обозначенные ими как *mscCG* [224] у штамма *C. g.* ATCC 13032, в то время как японские исследователи - гомолог этого гена в штамме *C. g.* ATCC 13869. В серии работ [224, 246-248] они в целом подтвердили результаты, полученные японскими исследователя, сделав ряд дополнений. В частности отмечается, что *MscCG* выполняет две функции: он является каналом для выхода из клетки катионов и бетаина в случае гипоосмотического стресса, а в случае повышенного потока метаболитов из гликолиза в ЦТК он служит клапаном для сбрасывания излишнего количества Глу во внешнюю среду. Отмечается невысокая степень экспрессии гена *mscCG*, сравнимая с экспрессией *mscS* (*yggB*) в клетках *E. coli*, в которых присутствует 20-30 каналов *MscS* на клетку [248]. Исследований было направлено в основном на изучение роли С-концевой последовательности этого белка, которая отсутствует в гомологичном канале *MscS* в клетках *E. coli*. Планировалось создание интактного канала из субъединиц

MscCG в протеолипосомах с последующим рентгеноструктурным анализом. Но, несмотря на выделение и очистку этого белка в значительных количествах, воссоздать работоспособный канал не удалось, даже при использовании мембраны с фосфолипидным составом, близким к таковому у *S. g.*. Поэтому изучалось влияние различной длины делеций С-концевого фрагмента белка на функциональность канала (эскреция Глу в ответ на механическое растяжение канала в опытах *in vivo* с индукцией пенициллином и в электрофизиологических экспериментах *in vitro*). При делеции дистальной части гена оказалось, что N-концевой фрагмент MscCG (три трансмембранных домена и половина цитоплазматической петли. См. Рис. 29) способен к эскреции Глу в ответ на механическое натяжение мембраны, то есть образующийся канал полностью функционален без С-концевой части. К удивлению исследователей оказалось, что гетерологическая экспрессия MscS из *E.coli* в клетки *S. g.* (с делецией в хромосоме гена MscCG) в ответ на индукцию продукции пенициллином (условия натяжения мембраны) наблюдалась эскреция Глу, но в меньших количествах, чем в присутствии собственного гена *mscCG* (NCg11221). Без индукции пенициллином продукция Глу не происходило. Возможно, канал из кишечной палочки приобретает такую способность и приближается по свойствам к белку MscCG, будучи погруженным в мембрану *S.g.*, которая состоит из сильно отрицательно заряженных фосфолипидов [249] в отличие от более нейтральной по заряду мембраны *E.coli*, в которой кроме заряженных фосфолипидов присутствует фосфатидилэтаноламин, снижающий отрицательный заряд. И наоборот, экспрессия гена MscCG в клетках *E.coli* приводила к продукции Глу (до 1 г/л) без индукции продукции.

К каналу MscS был пришит С-конец MscCG (половина цитоплазматической петли, четвертый трансмембранный домен и экстраплазматическая С-концевая последовательность (Рис. 30). Введение соответствующего гибридного гена в клетки *S.g.* приводила к усилению продукции Глу при индукции пенициллином.

Интересно, что те мутации в С-концевой части MscCG, которые нарушали продукцию Глу, точно также нарушали продукцию этим гибридным каналом.

В работах немецких исследователей получен большой набор делеций гена, кодирующего MscCG, а также проведена рандомизация некоторых участков. Полученные результаты в целом подтверждают ранее полученные данные японских исследователей [242] и дополняют их. В частности, делеции фрагментов С-концевого экстрацитоплазматического фрагмента не имели последствий для функционирования транспортера, но делеция, начинающаяся сразу после 4-го трансмембранного домена (делеция 110 а.к. от С-конца) приводила к способности экскретировать Глу без индукции пенициллином. Именно в этом месте гена ранее была найдена инсерция IS-элемента, прерывающая трансляцию гена, обнаруженная у штамма, продуцирующего Глу в присутствии биотина. Любая делеция 4-го трансмембранного домена не приводит к спонтанной продукции Глу: для продукции всегда требовалась индукция пенициллином. Рандомизация цитоплазматической петли полностью блокировала как спонтанную, так и индуцированную продукцию Глу.

Полученные к настоящему времени данные не позволяют представить себе механизм действия канала MscCG в полной мере. Будущие исследования, включающие в себя построение трехмерной модели собранного из субъединиц MscS работоспособного канала, должны предоставить такую возможность.

1.21. Современное представление о механизме продукции глутамата ГПКБ

Феномен продукции Глу ГПКБ известен уже более полувека, но, несмотря на всесторонние исследования, до сих пор трудно однозначно описать механизм продукции этой аминокислоты, который присущ этим микроорганизмам, найденным в природе. Тем не менее, многое уже стало ясно. Как показано выше, для продукции Глу необходимы два условия: во-первых, снижение активности КГДК, во-вторых, открывание специального канала для выхода Глу из клетки.

Действительно, даже полное отсутствие активности КГДК (делеция соответствующего гена) приводит лишь к накоплению в клетках и выделению предшественника Глу, 2-КГ [196]. С другой стороны, мутация в гене, кодирующем канал NCg11221, обуславливающая постоянно открытое состояние этого канала, вначале вызывает выделение Глу, однако по исчерпанию глюкозы в среде происходит быстрое поглощение Глу клетками с последующей метаболизацией через КГДК и далее через ЦТК (Рис. 28). Только совмещение этих двух факторов вызывает нормальную продукцию Глу, которая наблюдается у штаммов дикого типа при индукционном воздействии внешних условий.

Первоначально индукцию продукции Глу обнаружили и использовали при голодании по биотину, кофактору фермента, ацетил-КоА-карбоксилазы, необходимого для синтеза ЖК [11]. Позднее было показано, что ингибирование синтеза ЖК антибиотиком церуленином также приводит к продукции Глу [89]. Важно отметить, что этот антибиотик блокирует активность другого фермента синтеза ЖК, что, тем не менее, приводит к индукции продукции Глу. Очевидно, и голодание по биотину, и действие церуленина должно обуславливать одновременно оба условия продукции: открытое состояние канала NCg11221 и снижение активности КГДГ.

Можно представить следующий механизм индукции. Дефицит ЖК, как результат дефицита биотина или действие церуленина, приводит к механическому напряжению цитоплазматической мембраны, что переводит механочувствительный канал NCg11221 в открытое состояние. Эти же факторы замедляют синтез миколовых кислот, которые в норме ковалентно прикрепляются к нижележащему слою ПГ-арабиногалактана клеточной стенки. Неполноценность этого слоя ощущается пенициллин-связывающими белками, которые трансдуцируют этот сигнал внутрь клетки, снижая степень фосфорилирование ингибиторной субъединицы КГДК OdhI, что в свою очередь приводит к ингибированию активности КГДК. Таким образом, оба упомянутых условия для продукции Глу выполняются.

Подобным образом действуют все остальные факторы, индуцирующие продукцию Глу, как внешние (пенициллин, этамбутол, Твины), так и внутренние (мутации чувствительности к лизоциму, и нарушающие сборку миколатной мембраны). Например, пенициллин подавляет образование сшивок в ПГ, снижая ригидность клеточной стенки. Клетки округляются, увеличиваются в объеме, что приводит к растяжению цитоплазматической мембраны и механическому воздействию на Глу канал NCgl1221, что переводит его в открытое состояние.

Что касается, снижения активности КГДК, необходимого для продукции Глу, то точный механизм ингибирования активности этого ферментного комплекса не вполне ясен. Не вызывает сомнения следующее. Белок OdhI в своем активном (нефосфорилированном) состоянии, связывается с КГДК и подавляет его активность. Фосфорилирует этот белок, точнее определенные остатки треонина, главным образом цитоплазматическая треонин/серинпротеинкиназа PknG, которая переводится в активное (фосфорилированное) состояние под действием цитоплазматического домена трансмембранного белка PknA.

Механизм подавления активности КГДК в соответствии с результатами многолетних исследований выглядит следующим образом. PknA своими периплазматическими С-концевым доменами опознает либо присутствие пенициллина, либо неполноценность структуры ПГ, вызванного пенициллином или другими факторами. Этот сигнал передается (изменением конформации) цитоплазматическому домену, который в результате этого утрачивает способность к фосфорилированию цитоплазматического фермента PknG – треонин/серинпротеинкиназе. PknG в нефосфорилированной форме не фосфорилирует OdhI, и нефосфорилированный OdhI ингибирует активность КГДК (Рис. 28). Можно допустить и несколько иной механизм: сигналом служит механическое натяжение цитоплазматической мембраны, вызванная упомянутыми выше факторами, что влияет на конформацию PknA и приводит к его неспособности фосфорилировать PknG, и ингибиторный белок OdhI в нефосфорилированной форме подавляет активность КГДК. По этой модели,

независимо от источника сигнала (натяжение мембраны или нарушение структуры ПП), происходит снижение активности КГДК, что способствует продукции Глу.

Предлагается и иной механизм ингибирования КГДК. Обнаружено, что пенициллин вызывает существенную дерепрессию синтеза субъединицы OdhI [210, 211]. При этом активности PknG просто не достаточно, чтобы фосфорилировать увеличившееся количество белка OdhI, и значительная часть этот ингибиторного белка остается нефосфорилированной и ингибирует активность КГДК. По этой модели остается неясным, каков механизм дерепрессии синтеза OdhI, каким путем передается сигнал из периплазмы к дерепрессии. Обе модели ингибирования активности КГДК предусматривают взаимодействие белков (передачу фосфата от PknA к PknG и далее к OdhI), хотя ряд деталей требует дополнительных исследований.

Все же, остаются пока необъяснимыми некоторые экспериментально полученные данные. В частности, трудно найти объяснение тому факту [29], что внесение в среду биотина полностью и практически мгновенно (несколько минут) останавливает продукцию Глу, обусловленную голоданием по этому витамину. При этом если в среде присутствует церуленин (ингибитор синтеза ЖК), то биотин не подавляет продукцию. Возможно, что эти данные, полученные уже 25 лет назад, являются результатом технической ошибки. Отметим, что ни один из соавторов данного исследования в последующих работах не ссылается на этот, казалось бы, очень важный для понимания механизмов продукции Глу эксперимент.

2. Материалы и методы

Микроорганизмы

Штаммы дикого типа *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Escherichia coli* K12 (B-7, MG1655) получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Производные этих штаммов либо получены также из ВКПМ, либо – в ходе настоящей работы. Генотипы этих штаммов указаны в соответствующих разделах Экспериментальной части.

Среды

Полноценная среда LB (г/л): дрожжевой экстракт – 5; пептон – 10; хлорид натрия – 10; pH 7,2. Агаризованная среда содержала 15 г/л агара Sigma.

Минимальная агаризованная среда для *C.glutamicum* (г/л): хлорид аммония – 5; нитрат аммония – 1; сульфат натрия – 2; дигидрофосфат калия – 1; гидрофосфат калия – 1; сульфат магния семиводный – 0,01; агар – 20; биотин – 0,0002; тиамин – 0,0001; глюкоза – 10.

Жидкая минимальная среда для *C.glutamicum* Kaneko [250] (г/л): сульфат аммония – 10; мочевины – 3; дигидрофосфат калия – 1; хлорид натрия – 0,05; сульфат магния семиводный – 0,4; биотин – 0,0001; глюкоза – 20.

Ферментационная среда Ф1 (г/л): сахароза – 100; сульфат аммония – 40; дигидрофосфат калия – 1; сульфат магния семиводный – 0,4; биотин – 0,0002; мел – 20.

Посевная среда для засева ферментационных сред: разведенная в два раза водой ферментационная среда Ф1.

Аминокислоты и их биосинтетические предшественники получены от фирмы Sigma.

Индукция мутаций. В качестве мутагенного фактора использовали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (нитрозогуанидин). В отдельных случаях использовали методы транспозонного мутагенеза с помощью транспозона Tn5.

Транспозонный мутагенез. Для получения мутантов *E.coli*, не способных деградировать треонин, от штамма В7-2-38 (с повышенной способностью к деградации треонина и нуждающегося в глицине в результате мутации в гене *glyA*) получали мутанты с инсерцией Tn5 в гене, кодирующем треониндегидрогеназу (*tdh*). Лизат мутантного бактериофага ϕ b221 cI857 с инсерцией транспозона Tn5 (*rex::Tn5*) смешивали с множественностью 10:1 с двухчасовой культурой штамма В7-2-38, выращенной в L-бульоне с 0,01M сульфатом магния и 0,2% мальтозы, и ресуспендированной в физрастворе с 0,01M сульфатом магния и инкубировали 45 мин при 28°C. Затем культуру осаждали центрифугированием и ресуспендировали в L-бульоне, содержащем цитрат натрия (0,05 M), и инкубировали 3 часа при перемешивании. После инкубации клетки отмывали и помещали в жидкую среду М9, содержащей глицин (0,1 мг/мл) и канамицин (30 мкг/мл), и выращивали в течение ночи при 28°C. Утром клетки отмывали от среды и переносили в колбу со средой М9, содержащей треонин (0,5 мг/мл) как источник глицина. При удвоении оптической плотности вносили пенициллин G (1000 ед/мл). После видимого лизиса культуру высевали на агар М9 с добавками глицина (0,1 мг/мл) и канамицина (30 мкг/мл). Через 2-е суток инкубации при 28°C образовавшиеся колонии тестировали на способность к росту на треонине вместо глицина на агаре М9 с соответствующими добавками аминокислот.

Пенициллиновое обогащение недостаточными мутантами *E.coli* проводили по общепринятой методике, указанной во многих руководствах по микробиологии и генетике микроорганизмов. При необходимости процедуру обогащения проводили дважды.

Пенициллиновое обогащение ауксотрофными мутантами культуры *S. glutamicum* проводили по разработанной нами методике. Суспензию клеток с исходной мутностью 0,01-0,1 (титр 10^9 - 5×10^{10}) выращивали 3 – 4 часа в жидкой минимальной среде Kaneko [250] до увеличения мутности в 3-4 раза, добавляли

пенициллин (10 ед./мл) и инкубировали в течение 3 часов. Затем клетки центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин, осадок ресуспендировали в 1/2 - 1/3 начального объема той же среды, содержащей лизоцим (0,1 мг/мл). Через 2 – 3 часа инкубации при 37°C после видимого лизиса производили высеv на полноценный агар. Колонии, появившиеся через 2-е суток после инкубации при 30-32°C, перепечатывали с помощью бумажных фильтров на агаризованную минимальную среду для *S. glutamicum*. На следующий день выявляли негативные колонии ауксотрофов и рассевали их до отдельных колоний на полноценной агаризованной среде.

Количественное определение аминокислот в культуральной жидкости проводили методом тонкослойной хроматографии (пластинки “Silufol” фирмы Kavalier) в системе растворителей н-пропанол - аммиак (70:30) или методом бумажной хроматографии в системе бутанол – ледяная уксусная к-та – вода (4:1:1). Образцы культуральной жидкости объемом 5 мкл наносили на пластинки или бумагу. После разделения аминокислот в специальных камерах и высушивания хроматограмм их обрабатывали р-ром (0,5%) нингидрина в ацетоне и соответствующие пятна элюировали раствором 0,5%-ного хлорида кадмия в 50%-ном этаноле. Измерения светопоглощения проводили с помощью фотоэлектроколориметра марки КФК-2МП при длине волны 540 нм. В некоторых случаях для количественного определения аминокислот использовали аминокислотный анализатор Biotronik LC 5001.

Концентрацию **фенилпирувата** определяли по его светопоглощению (320 нм) в щелочной среде. **Префенат** определяли после его превращения в кислой среде в фенилпируват с последующим определением фенилпирувата (см. выше). **Арогенат** определяли после его превращения в кислой среде в фенилаланин с последующим определением фенилаланина.

Производство аминокислот культурами *S. glutamicum* определяли после культивирования в условиях глубоинной ферментации. Испытываемые штаммы,

выращенные в течение суток в посевной среде, пересевали в ферментационную среду, помещенную в ферментационные пробирки, колбы или лабораторные ферментеры. Количество посевного материала составляло 5 – 10% от объема ферментационной среды. Ферментацию проводили на качалках в течение 3-х суток при 30° С, либо в лабораторных ферментерах объемом 1,2 л, снабженных системой рН-статирования с использованием 6%-ной аммиачной воды для поддержания заданного значения рН среды.

Приготовление ферментных препаратов клеток *C. glutamicum*. В

зависимости от цели исследования использовали два способа приготовления ферментных препаратов клеток *C. glutamicum*: 1) с помощью ультра-звукового дезинтегратора или 2) действием антибиотика грамицидина С.

1) Клетки, выращенные в жидкой минимальной среде или в ферментационных средах, отделяли от мела центрифугированием, дважды промывали 0,05%-ным р-ром КСl, ресуспендировали в фосфатном буфере (50 мМ, рН 7,0) и обрабатывали ультразвуком в ледяной бане (дезинтегратор MSE 200, амплитуда 9 мк, общее время обработки 10 мин циклами по 1 мин). К супернатанту, полученному после отделения обломков клеток центрифугированием, добавляли 5-ти кратный объем насыщенного р-ра сульфата аммония. Осадок белков после центрифугирования растворяли в фосфатном буфере и хранили при -20°С, размораживая непосредственно перед определением энзиматической активности.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури с соавт., 1951. Ферментативная активность выражена как количество наномолей продукта реакции, образованного за 1 мин на 1 мг белка ферментного препарата (бесклеточный экстракт или фракция белка, осажденного сульфатом аммония).

2) Клетки, выращенные в жидкой минимальной среде или в ферментационных средах, отделяли от мела центрифугированием, дважды промывали 0,05%-ным р-ром КСl, ресуспендировали в трис-Буфере (50мМ рН 7,0), содержащем 5 мМ MgCl₂, 2мМ дитиотриетол и 1 мМ L-триптофан (в случае измерения активности

ДАГФ-синтазы и хоризматмутазы). Для измерения префенандегидратазы и арогенатдегидрогеназы буфер содержал только 1 мМ дитиотриетол. К полученной суспензии клеток добавляли грамицидин С в концентрации 0,05%, тщательно перемешивали, центрифугировали, ресуспензировали осадок клеток в 1/5 исходного объема и, измерив оптическую плотность (светорассеяние) суспензии клеток при длине волны 540 нм (ОП), использовали ее как ферментный препарат. Ферментативная активность выражена как количество наномолей продукта реакции, образованного за 1 мин на оптическую плотность клеточной суспензии (ОП540), присутствующей в реакционной смеси и обработанной грамицидином С. **Активность ДАГФ-синтазы** определяли по методу Sugimoto, Shio, 1980 [251]. Реакционная смесь (0,2 мл) содержала ферментный препарат (пермембилизированные клетки), трис-НСl (50 мМ, рН 7,5), эритрозо-4-фосфат (0,5 мМ), фосфоенолпируват (0,5 мМ). Реакцию проводили при 30°C 5 мин, останавливали добавлением 40 мкл 10%-ной ТХУ, центрифугировали и отбирали 200 мкл супернатанта, в который вносили 200 мкл 10%-ного раствора NaIO₄ и выдерживали 10 мин при 37°C. Добавляли 400 мкл 10%-ного раствора Na₃AsO₃ в 0,5 М НСl до исчезновения желтой окраски и затем 1,6 мл 2%-ного р-ра тиобарбитуровой к-ты. Полученный р-р кипятили 8 мин до появления малиновой окраски и после охлаждения измеряли светопоглощение при 549 нм.

Определение внутриклеточного содержания ДАГФ проводили по методике определения активности ДАГФ-синтазы, описанной выше, начиная с этапа добавления к внутриклеточному экстракту р-ра NaIO₄.

Активность хоризматмутазы определяли на основе метода Cotton, Gibson, 1965 [252]. Реакционная смесь (0,4 мл) содержала ферментный препарат (пермембилизированные клетки), фосфатный буфер (50 мМ, рН 7,0), хоризмат (2,5 мМ), дитиотриетол (1 мМ), L-триптофан (0,01 мМ). Реакцию проводили при 30°C 20 мин и останавливали добавлением 0,4 мл 1М НСl, выдерживали 10 мин и измеряли светопоглощение (320 нм) образовавшегося фенилпирувата после добавления 3,2 мл 1М р-ра NaOH.

Активность префенатдегидратазы определяли по методу Sugimoto, Shiio, 1974 [253]. Реакционная смесь (0,1 мл) содержала ферментный препарат (пермебилизированные клетки), фосфатный буфер (50 мМ, рН 7,6) префенат (1 мМ). Реакцию проводили при 37°C 15 мин и останавливали добавлением 0,9 мл 2,5М р-ра NaOH. Измеряли светопоглощение (320 нм) образовавшегося фенилпирувата.

Активность арогенатдегидрогеназы определяли по методу Fasel, Jensen, 1979 [254]. Реакционная смесь (1,0 мл) трис-HCl (50 мМ, рН 7,5), арогенат (0,1 мМ), НАДФ (0,25 мМ). Реакцию запускали добавлением раствора ферментного препарата и помещали реакционную смесь в термостатированную ячейку спектрофотометра и в течение 5 мин регистрировали изменение светопоглощения при 340 нм.

Активность ароматических аминотрансфераз определяли на основе метода определения активности тирозиновой аминотрансферазы [255]. Реакционная смесь (0,93 мл) содержала помимо ферментного препарата фосфатный буфер (80 мМ, рН 7,6), 2-кетоглутаровую к-ту (9 мМ), пиридоксаль-5-фосфат (0,1 мМ), ЭДТА (1 мМ), дитиотриетол (1 мМ) и L-фенилаланин (100 мМ). Реакцию проводили при 30°C в течение 15 мин, останавливали добавлением 70 мкл 10М р-ра KOH с быстрым перемешиванием. Измеряли светопоглощение при 320 нм.

Определение нуклеотидной последовательности проводили по методу Сэнгера, 1977 [256]. Секвенирующие праймеры для плазмид pBluescript II SK+ и pBluescript II KS+ (5'-GCTCTAGAACTAGTGGATCC-3' и 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3') были синтезированы в Центре «Биоинженерия» РАН.

Определение активности ферментов в клетках кишечной палочки

Глутаматдекарбоксилаза (ГДК). Клеточную биомассу (0,25 мг сырой массы) инкубировали (15 мин, 37°C) в 1%-ном р-ре глутаминовой кислоты (рН 4,6) объемом 1 мл. Реакцию останавливали добавлением 30 мкл 30%-ного р-ра NaOH. Количество образовавшейся гамма-аминомасляной кислоты определяли методом

восходящей бумажной хроматографии (бумага FN-11, Германия) в системе растворителей бутанол - уксусная к-та - вода (4:1:1). Ферментативную активность выражали как количество микромолей гамма-аминомасляной к-ты, образующейся в присутствии 1 мг сырого веса клеток в 1 мин при 37°C.

Треониндегидрогеназа (ТДГ). Бесклеточный экстракт получали из ночной культуры клеток, выращенных в 100 мл бульона и отделенных центрифугированием. Осадок клеток дважды отмытых в холодном физрастворе ресуспендировали в 1,5 мл 10мМ фосфатного буфера (рН 7,2) и обрабатывали ультразвуком (5 циклов по 30 сек при амплитуде 0,6 нм). Обломки клеток отделяли центрифугированием (20 мин, 12000 об/мин)

Активность определяли по образованию аминокетона по Urata, Granick, 1963 [257]. Реакционная смесь содержала 0,15 мл треонина (0,3 М р-р, рН 7,5), 0,15 мл р-ра NAD^+ (0,005М), 0,75 мл р-ра Трис-НСl (0,2М, рН 7,5), 20 – 200 мкл бесклеточного экстракта, объем доводили до 1,5 мл водой. Реакцию (15 мин, 37°C) останавливали добавлением 0,8 мл 0,5М р-ра ТХУ, выдерживали в ледяной бане 10 мин и удаляли осадок центрифугированием (20 мин, 15000 об/мин). К 1 мл супернатанта добавляли 1 мл 1М ацетатного буфера (рН 4,6) и 0,1 мл ацетилалацетона и инкубировали 10 мин в водяной бане при 100°C. В пробирки вносили 2 мл реактива Эрлиха, приготовленного по Mauzerall, Granick, 1956 [258]. Измеряли оптическую плотность (552нм). Реактив Эрлиха (100 мл) готовили растворением 2 г пара-аминобензальдегида в 60 мл ледяной уксусной к-ты, добавляли 16 мл конц. хлорной кислоты и доводили объем до 100 мл уксусной к-той.

Для массового определения наличия или отсутствия активности ТДГ нами разработана упрощенная модификация данного метода. Клетки культуры, выращенной в объеме 5 мл бульона, однократно промывали в физрастворе и ресуспендировали в 1 мл 10 мМ фосфатного буфера (рН 7,2). Обрабатывали ультразвуком (15 сек, амплитуда 0,6 нм) и отделяли обломки центрифугированием (10 мин, 12000об/мин). В ячейки пластиковой платы (100

ячеек по 200 мкл) вносили 35 мкл реакционной смеси, состоящей из р-ра треонина (0,3М, рН 7,5), NAD^+ (5мМ), Трис-НСl (0,2М, рН7,5), взятых в соотношении 1:1:5. Реакцию запускали добавлением 15 мкл бесклеточного экстракта и инкубировали 20 мин при 37°C, затем останавливали внесением 50 мкл смеси 1М ацетатного буфера (рН 4,6) и ацетилацетона в объемном отношении 10:1. Инкубировали в водяной бане при 100°C 10 мин, охлаждали и добавляли в каждую ячейку по 100 мкл реактива Эрлиха. При наличии активности ТДГ происходило окрашивание раствора в яркий малиновый цвет. Отрицательным контролем служили ячейка, в которой был добавлен экстракт штамма, обладающего активностью ТДГ, но реакционная смесь не содержала треонин.

2-Амино-3-кетобутиратлигаза (АКБ-лигаза). Фермент катализирует второй этап деградации треонина – КоА зависимое расщепление 2-амино-3-кетобутирата до глицина и ацетил-КоА. Эту реакцию использовали в обратном направлении, приводящую к образованию 2-амино-3-кетобутирата, неферментативно превращающегося в аминокетон, который определили по методу Urata, Granick, 1963 [257]. Бесклеточный экстракт получали, как это описано при определении активности ТДГ. Ввиду низкой активности АКБ-лигазы и подверженности ацетил-КоА ферментативной деградации бесклеточный экстракт был частично очищен фракционированием белков на колонке с сефадексом G100 (размер 80x2,5 см) в 0,2М Трис-НСl (рН 7,5). Фракции, обладающие активностью АКБ-лигазы объединяли и высаживали белки 5-ти кратным объемом насыщенного р-ра сульфата аммония и через 2 часа отделяли центрифугированием (30 мин, 15000 об/мин), а затем ресуспендировали в 3-5 мл 0,2М Трис-НСl. Полученный белковый препарат вносили в реакционную смесь, состоящую из 0,1 мл 0,4М р-ра глицина, 0,5 мл 2,5 мМ р-ра ацетил-КоА, 0,3 мл 0,2М Трис-НСl (рН 7,5). Объем смеси доводили водой до 1,5 мл. Инкубировали 20 мин при 37°C. Останавливали реакцию и определяли образовавшийся аминокетон так же, как описано при определении активности ТДГ.

Треонинальдолаза. Клетки выращивали в бульоне или в жидкой среде M9 с добавлением 50 мкг/мл глицина, отмывали от среды и ресуспендировали в р-ре Трис-НСl (50 мМ, рН 8,5) с добавлением дитиотрейтола (2 мМ). После обработки ультразвуком и отделения обломков клеток осаждали белки 5-ти кратным объемом насыщенного р-ра сульфата аммония (2 часа). Осадок белков после центрифугирования (30 мин, 15000 об/мин) растворяли в 3-5 мл Трис-НСl (50 мМ, рН 8,5) с добавлением дитиотрейтола (2 мМ). Полученный ферментный препарат (по 0,025 – 0,2 мл) вносили в реакционную смесь (0,1 мл 0,5М р-ра треонина, Трис-НСl (50 мМ, рН 8,5) и воды до объема 0,5 мл) и инкубировали 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали внесением 0,4 мл 0,2 М глицинового буфера (рН 1,6) и 0,1 мл 2-х процентного водного р-ра 3-метил-2-бензатиазолинонгидазона (МБТГ), нагревали до 100°C в течение 3 мин и осаждали центрифугированием (15 мин, 12000 об/мин). К аликвотам (0,7 мл) добавляли 1 мл конц. р-р FeCl₃ и спустя 15 мин 2 мл 50%-ного р-ра ацетона в воде. Определяли светопоглощение (670 нм).

Серинтрансгидроксиметилаза (СТГМ). Выращивание клеток и получение ферментного препарата проводили также, как для определения треонинальдолазы. Определение СТГМ проводили колориметрическим методом, основанным на убыли формальдегида [259]. Реакционная смесь (1,2 мл) состояла из 0,05 мл 1М глицина, 0,1 мл 0,025М формальдегида, 0,1 мл тетрагидрофолата (р-р 3 мг/мл), 0,1 мл 0,3 мМ пиридоксаль-5-фосфата, 0,15 мл 0,5М фосфатного буфера (рН 7,5) и белкового препарата в объеме 0,05 – 0,2 мл, остальное – вода.

Глутатионредуктаза. Определялось изменение светопоглощение (340 нм) при изменении концентрации NADPH при восстановлении глутатиона [260].

S-сульфоцистеинредуктаза. Восстановление S-сульфоцистеина происходит за счет окисления глутатиона. Количество окисленного глутатиона определяли по расходу NADPH на восстановление глутатиона в присутствии препарата глутатионредуктазы (Sigma), что сопровождается снижением светопоглощения (340 нм). Реакционная смесь (1 мл) содержала бесклеточный экстракт, 2 мМ S-

сульфоцистеин (Sigma), 1 ед. глутатионредуктазы (Sigma), 0,1 мМ восстановленный глутатион (GSH), 0,125 мМ NADPH, 100 мМ Трис-НСl (рН 7,5). Реакция инициировалась добавлением субстрата S-сульфоцистеина и регистрировали изменение светопоглощения (340 нм) при 25°C. Единицей ферментативной активности служило количество белка ферментного препарата, способного окислить 1 мкмоль NADPH за 1 мин.

L-серин-О-ацетилтрансфераза (САТ). Использовался модифицированный метода Кредича и Томкинса, 1966 [261]. Клетки выращивали в среде М9 до окончания логарифмического роста. После центрифугирования осадок клеток промывали фосфатный буфером (50 мМ, рН 7,1), содержащем 2 мМ дитиотриэтол и 1 мМ ЭДТА, ресуспендировали в этом же буфере и обрабатывали УЗ на льду. Белковые препараты получали дробными осаждениями $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (насыщение от 20 до 75%) с последующим центрифугированием всех фракций. Осадки растворяли в том же буфере и диализовали против того же буфера, затем белковый препарат загружали в колонки с Q-Sepharose (2 мл). Элюцию поглощенных белков проводили линейным градиентом КСl (от 0 до 0,5 М) в том же буфере. Фракции, обладающие нужной ферментативной активностью, объединяли и осаждали концентрированным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,8 от насыщения), осадок белка растворяли в том же буфере и обессоливали диализом. Полученный частично очищенный препарат использовали для определения энзиматической активности. Инкубационная смесь (1 мл) помимо белкового препарата содержала 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ L-серин, 0,1 мМ ацетил-КоА. Определили уменьшение светопоглощения (232 нм), вызванного разрывом тиозфирной связи в молекулах ацетил-КоА. Разница в светопоглощении при 232 нм между ацетил-КоА и КоА составляет 3,2 ммоль/л/см, что и использовалось для расчета активности препарата, за единицу которого принималось количество мг белка, которое катализирует образование 1 мкмоль КоА в мин.

Компьютерное моделирование каталитического сайта L-серин-О-ацетилтрансфераза (САТ). Известно, что цистеин (ингибитор) связывается тем

же сайтом, что и серин (один из субстратов). Трехмерная структура аминокислотных остатков, связывающих цистеин, была известно из рентгено-структурных исследований Pye et al., 2004 [262]. С помощью компьютерной программы InSightII (Molecular simulations Inc., США), предназначенной для «причаливания» лигандов к рецепторным структурам была получена 3D модель центра связывания серина, путем удаления из активного центра молекулы цистеина. Молекула серина была помещена с помощью «ручного моделирования» на место цистеина. Учитывая только ближайшие к молекуле серина аминокислотные остатки (менее 6 ангстрем), из 10 возможных ориентаций молекулы серина относительно ближайших аминокислотных остатков была выбрана одна, отвечающая минимальной свободной энергии структуры. Сравнение 3D структур, связывающих цистеин (известная) и серин (полученная с помощью компьютерной симуляции) позволило выбрать изменения в структуре активного центра, ослабляющие связывание ингибитора (цистеина), но не влияющие на эффективность связывания субстрата – серина. Более подробно данный метод изложен в патенте РФ №2279477.

Рандомизация аминокислотной последовательности, прилегающей к активному центру SAT. Промоторные последовательности генов *ompC*, а также *nlpD* из штамма *E.coli* MG1655, характеризующиеся высокой эффективностью, были включены в состав плазмидного вектора pMW118 (Nippon Gene). Под регуляцию этих промоторов был установлен ген *cysE* из штамма дикого типа MG1655 (амплифицирован методом ПЦР), и в результате плазмиды pMW118-PompC-cysE и pMW118-PnlpD-cysE были сконструированы. Вначале был амплифицирован фрагмент гена *cysE*, кодирующий с 1 по 102 аминокислоты. В качестве матрицы использовали плазмиду pMW118-PompC-cysE, а также праймеры содержащие по 6 рандомизированных нуклеотидов. Полученный фрагмент был извлечен из геля (электрофорез) и использован в качестве праймера (10 циклов ПЦР), чтобы получить полноразмерный ген *cysE*. На третьем этапе ПЦР к полученному фрагменту добавлен праймер, гомологичный промотору PompC и проведены 15

циклов ПЦР. Полученный фрагмент, содержащий рандомизируемую область гена *cysE* после выделения был сшит с вектором *pMW-PompC* с образованием плазмиды *pMW-PompC-cysE* (рандомизированный). Полученные плазмиды использовались для трансформации клеток-реципиента, в качестве которого использовали штамм *E.coli* LE392 *cysE::Km^R*. Трансформанты вначале проверялись на способность комплементировать ауксотрофность по цистеину, а затем среди не нуждающихся в цистеине трансформантов были отобраны такие, которые выделяли в агар цистеин, подкармливая цистеином клетки ауксотрофного по цистеину штамма *E.coli* LE392 *cysE::Km^R*.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Разработка метода пенициллинового обогащения биохимическими мутантами *Corynebacterium glutamicum*

Для изучения биохимических и генетических механизмов биосинтеза аминокислот на основе *Corynebacterium glutamicum*, а также для конструирования продуцентов аминокислот на его основе с применением методов генной инженерии необходимо получать мутанты, неспособные к росту без присутствия в среде необходимого фактора роста, аминокислоты, витамина, нуклеинового основания. Возникают также задачи получения мутантов, не усваивающих какой-либо источник углерода, азота, серы и т.п., обладающих не устойчивостью, а наоборот повышенной чувствительностью к ингибиторам роста (антибиотиков, антиметаболитов), к повышенной температуре и т.п. Для отбора такого рода мутантов с утраченной функцией на заре развития генетики микроорганизмов предложен метод пенициллинового обогащения [263], который основан на том, что пенициллин, который блокирует синтез пептидогликана клеточной стенки, убивает только клетки, способные к росту в данных условиях. В то же время клетки, не растущие в данных условиях, сохраняют жизнеспособность, и их можно легко обнаружить высевом на соответствующие агаризованные среды. При этом часть немутантных клеток также сохраняется, но доля искомым мутантов возрастает, то есть происходит обогащение популяции целевыми мутантами. Этот метод после ряда усовершенствований успешно применялся в основном на грамм-отрицательных бактериях и в особенности на кишечной палочки.

Еще в 60-х годах предпринималась попытка применить пенициллиновое обогащение для получения ауксотрофных мутантов *C. glutamicum* [264].

Пенициллин (5 – 40 ед.) добавляли к растущей в жидкой минимальной среде культуре ГПКБ. В модельном эксперименте смешивали клетки прототрофного и ауксотрофного штамма в отношении 8,26:1. В наиболее успешном эксперименте

после действия пенициллина произошло обогащение клетками ауксотрофного штамма в 4,7 раз. Позднее метод пенициллинового обогащения уже не использовался для ГПКБ ввиду его неэффективности.

Нами была поставлена задача разработать более эффективный метод, применимый для практических задач, и использовать его в своих исследованиях. Известно, что ГПКБ высоко чувствительны к действию пенициллина, однако не было ясно, приводит ли действие пенициллина, ингибирующего рост, к гибели растущих прототрофных клеток в достаточной степени. Чтобы прояснить этот вопрос, культуру штамма *S. glutamicum* ATCC 13032 выращивали в жидкой минимальной среде в течение 3-х часов до наступления логарифмической фазы и вносили пенициллин в указанных в Таблице 1 концентрациях.

Таблица 1.

Гибель клеток штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC 13032 при действии пенициллина.

Конц. пенициллина	Оптическая плотность (ОП ₅₄₀) и титр живых клеток			
	В момент внесения пенициллина		Через 3 часа после внесения пенициллина	
	ОП ₅₄₀	Титр	ОП ₅₄₀	Титр
0,0	0,52	1,6x10 ⁸	3,5	5,7x10 ⁸
0,3			3,0	7,9x10 ⁷
1,0			1,2	6,5x10 ⁷
10,0			0,85	3,1x10 ⁷
100,0			0,87	2,5x10 ⁷

Пенициллин полностью подавлял рост клеток, начиная от концентрации 1 ед./мл, однако титр живых клеток, способных образовывать колонии на полноценном агаре (L-агар), снижалось незначительно – в 5 – 7 раз при концентрации пенициллина от 10 ед. и выше. Не наблюдалось существенного снижения титра живых клеток и после 18 часов воздействия пенициллина (данные

не приведены). Эти данные показывают неэффективность использования пенициллинового обогащения культуры *S. glutamicum* ввиду отсутствия гибели покоящихся немутатных клеток.

Существовали литературные данные о том, что обработка клеток ГПКБ, уже подвергшихся действию пенициллина, позволяет получить протопласты, неспособные к росту на обычных средах в отсутствие осмопротекторов [265]. Однако оставалось неясным, происходила ли гибель таких клеток в этих условиях. Принимая во внимание эти данные, мы попытались оценить действие лизоцима на обработанные и необработанные пенициллином (10 ед., 3 часа) клетки, которые инкубировали лизоцимом в течение 16 часов при 37°C. Определение титра клеток, способных к росту в отсутствие осмопротекторов, проводили высевом разведений на L-агар.

Таблица 2

Гибель клеток штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC 13032, обработанных пенициллином, при последующем действии лизоцима

Концентрация		Оптическая плотность (ОП) и титр живых клеток					
		В момент добавления				Через 16 часов	
пеницил ед.	лизоцим а мкг/мл	пенициллина		лизоцима			
		ОП	Титр	ОП	Титр		
10	0	0,39	$1,1 \times 10^8$	0,78	$1,5 \times 10^7$	0,39	3×10^5
10	100					0,14	2×10^3
10	1000					0,12	3×10^3
0	100			2,2	$6,1 \times 10^8$	51	6×10^{12}
0	1000			0,39		9×10^6	

Если обработка пенициллином снижала титр клеток только в 7 раз, то последующее инкубирование с лизоцимом приводило к снижению титра на 4 порядка (таблица 2). В результате двойной обработки происходило снижение титра на 6 порядков (данные не приведены). Титр культуры, к которой не был добавлен лизоцим, за 16 часов снижался только в 50 раз и в 370 раз за весь период действия пенициллина (19 часов). Таким образом, действие пенициллина с последующей обработкой лизоцимом в 100 – 150 раз более эффективно, чем действие одного пенициллина. Действие же одного лизоцима на клетки, не имевшие контакта с пенициллином, как видно из табл.1, совершенно не эффективно.

Далее оценивали действие пенициллина и лизоцима на голодающую (нерастущую) культуру метионинового ауксотрофа штамма *S. glutamicum* ATCC 13032. Клетки, выращенные в жидкой минимальной среде в присутствии метионина, переносили на свежую среду, лишенную метионина, и после остановки роста в связи с исчерпанием внутриклеточного пула метионина, вносили пенициллин в конечной концентрации 10 ед./мл. После инкубации (3 час, 30°C) вносили лизоцим (0,1 мг/мл) и инкубировали 12 час. В контрольную культуру добавляли метионин (50 мкг/мл) одновременно с добавлением пенициллина. Титр голодающей культуры снизился незначительно, с $2,4 \times 10^7$ до $7,5 \times 10^6$, тогда как титр клеток растущих в присутствии метионина упал на 4 порядка, с $5,7 \times 10^7$ до $7,5 \times 10^3$. Таким образом, последовательная обработка пенициллином и лизоцимом избирательно вызывает гибель только растущих (прототрофных) клеток.

Изучали действие пенициллина и лизоцима на смешенную культуру прототрофного штамма *S. glutamicum* ATCC 13032 и полученного от него метионинового ауксотрофа в отношении 7:1. После действия пенициллина (10 ед./мл, 3 час), клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в свежей среде, в которую был добавлен лизоцим (0,1 мг/мл). Через 2 и 12 часов

Таблица 3

Обогащение смешанной культуры прототрофных и ауксотрофных по метионину клеток *S. glutamicum* при последовательной обработки пенициллином и лизоцимом

Оптическая плотность суспензии клеток до обогащения	Отношение числа прототрофов к ауксотрофам, (обогащение, раз)		
	До обработки пенициллином	После инкубация с лизоцимом	
		2 часа	12 часов
0,1	7:1	1:21 (147)	1:11 (77)
0,01	7:1	1:29 (203)	1:45 (315)

образцы суспензии после серийных разведений высевали на чашки для определения титра прототрофных и недостаточных по метионину клеток. При использовании культуры с большим титром клеток ($ОП_{540} = 0,1$) наибольшее обогащение ауксотрофами наблюдалось после 2 часов действия лизоцима (в 147 раз), после чего происходила неизбирательная гибель клеток обоих типов (Таблица 3). Суспензия клеток с меньшим в 10 раз начальным титром обогащается более эффективно (в 200 – 300 раз). Возможно, низкая избирательность данного метода при высоком исходном титре клеток обусловлена лизисом погибших прототрофных клеток и выхода внутриклеточного метионина в среду, что приводит к росту ауксотрофных клеток и их последующей гибели. Мы показали также, что, если доля спонтанно возникших недостаточных по синтезу аминокислот мутантов в популяции *S. glutamicum* ATCC 13032 составляет 0,065%, то после одного цикла обогащения она повышается до 1,4% при исходной $ОП_{540}$ 0,1 и – до 4,1% при исходной оптической плотности 0,01. Метод позволяет без действия мутагенов, которые вызывают множественные мутации кроме целевых, отбирать негативные мутанты, необходимые для конструирования различных продуцентов и научных исследовании данного микроорганизма.

При отборе мутантов, утративших способность использовать тот или иной источник углерода или азота, эти вещества добавляются в минимальную среду выращивания вместо соответственно источника углерода или азота в предварительно подобранных концентрациях.

На основе описанной выше методике были отобраны ауксотрофные мутанты по биосинтезу ароматических аминокислот: нуждающиеся в триптофане, фенилаланине или тирозине. Отобраны также мутанты по общему для фенилаланина и тирозина пути биосинтеза. Дальнейшее исследование этого биосинтетического пути у *S. glutamicum* выявило новые возможности получения продуцентов этих аминокислот, что описано в ниже.

Выделены все известные классы мутантов, недостаточных по метионину (*metA*, *metB*, *metC*, *metE*).

Удалось блокировать три заключительные стадии биосинтеза треонина из аспарагиновой кислоты:

- *thrA2* (нуждаются в гомосерине, блокирован фермент гомосериндегидрогеназа, продуцируют лизин);
- *thrB* (нуждаются в треонине, продуцируют смесь гомосерина и лизина);
- *thrC* (также потребность в треонина, но не продуцируют аминокислот).

Мутанты классов *tthA2* и *thrB* были использованы для клонирования генов *S. glutamicum*, кодирующих гомосериндегидрогеназ и гомосеринкиназы

Используя разработанный нами метод, отобраны мутанты, неспособные усваивать серин в качестве единственного источника углерода. Эта мутация важна для продукции серина продуцентами на основе *S. glutamicum*, используемыми в промышленности. Активность сериндезаминазы, у одного из исследованных мутантов была снижена в 5 раз по сравнению с исходным штаммом (в бесклеточном экстракте активность сериндезаминазы у мутантного штамма составляла 6,5 наномолей пирувата в мин на мг белка, у родительского штамма – 33 наномоля пирувата в мин на мг белка).

Данным методом получены мутанты по одному из генов центрального метаболизма, кодирующего пируваткиназу (ген *рук*). Пируваткиназа катализирует превращение фосфоенолпирувата в пируват, который далее превращается в ацетил-КоА и поступает в ЦТК. Для улучшения продукции некоторых метаболитов, например, лейцина или жирных кислот, которые синтезируются с участием ацетил-КоА, целесообразно усилить это направление биосинтеза. Для продуцентов аминокислот аспарагинового семейства, наоборот, желательно снизить активность пируваткиназы, чтобы уменьшить расход фосфоенолпирувата, который необходим для синтеза щавелевоуксусной кислоты – 4-х углеродного предшественника аминокислот аспарагинового семейства. Точно также снижение активности пируваткиназы благоприятно при продукции ароматических аминокислот, в биосинтезе которых фосфоенолпируват является предшественником.

Синтез пирувата из фосфоенолпирувата катализируется не только пируваткиназой, но происходит также при каждом акте транслокации глюкозы и некоторых других сахаров из среды внутрь клеток. Этот процесс осуществляется фосфоенолтрансферазной системой, использующей фосфоенолпируват и превращающей его в пируват. Для применения разработанного нами метода пенициллинового обогащения необходимо было создать условия выращивания, при которых мутация в гене *рук* препятствовала бы росту клеток. Поскольку сахар рибоза, как известно [266], проникает в клетку *S. glutamicum* без участия фосфоенолтрансферазной системы, то этот сахар использовался вместо глюкозы в среде для действия пенициллина и затем лизоцима. Клетки предварительно выращенные на глюкозной среде отмывали центрифугированием и ресуспендированием в среде с рибозой (0,4%) в качестве единственного источника углерода. В результате получены мутанты и с полностью заблокированной, и со сниженной 8 – 10 раз активностью пируваткиназы.

Разработанная нами методика опубликована:

- Э.Б. Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М. Модификация метода пенициллинового обогащения ауксотрофными мутантами культуры *S. glutamicum* // Микробиологическая промышленность. Отечественный опыт. 1988, вып.10. стр.12-15)
- Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М. Метод пенициллинового обогащения ауксотрофными мутантами культуры *S. glutamicum* АТСС 13032// Тезисы докладов V съезда ВОГИС. 1987. с.21
- Ворошилова Э.Б. Селекционно-генетическое изучение мутантов *S. glutamicum* – продуцентов фенилаланина: автореф. дис. канд. биол. наук:03.01.15. М. 1995. 20 с.

Ауксотрофные штаммы *S. glutamicum*, полученные по данной методике, использованы в следующих исследованиях:

- Огороков А.Л., Буканов Н.О., Бескровная О.Ю., Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Грищенко В.Г., Янковский Н.К., Дебабов В.Г. Конструирование новых векторов для глутамат-продуцирующих бактерий. // Генетика, 1990, Т. 26 (4), С. 648-656.
- Передельчук М.Ю., Буканов Н.О., Смирнов Ю.В., Ростова Ю.В., Федорова Н.Д., Огороков А.Л., Гусятинер М.М., Янковский Н.К. Клонирование генов *asd* и *lysC* *Comyebacterium glutamicum*// Мол.генетика, микробиол. вирусол, 1992, N5-6, С.25-27.
- Ростова Ю.Г., Передельчук М.Ю., Огороков А.Л., Гусятинер М.М., Дебабов В.Г. Конструирование челночного вектора для коринебактерий и *E.coli*. Клонирование и изучение экспрессии гена *lysC*//Биотехнология. 1993. N4. с. 14-17.
- Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М. Получение и исследование пируваткиназных мутантов коринеподобных бактерий, продуцирующих лизин // Тез. конф. «Аминокислоты для сельского хозяйства, пищевой промышленности, медицины и научных исследований». Ереван. 1988. с.28-29.

3.2. Пермеабиллизация клеток *S. glutamicum* с помощью антибиотика грамицидин С

Как показано в главе Обзор литературы клеточная стенка ГПКБ отличается необычной структурой. В частности, она обладает помимо обычной цитоплазматической мембраны второй миколатной мембраной. Кроме того, слой пептидогликана усилен слоем полисахарида арабиногалактана, к которому ковалентно присоединен слой миколовых кислот, представляющих собой внутренний слой миколатной мембраны (Рис. 17). Такой мощный защитный слой клеточной стенки является препятствием для создания продуцентов белков и других продуктов, которые накапливаются в цитоплазме и не могут выйти в культуральную жидкость.

Оценка уровня активности и свойств ферментов в целях изучения их свойств таких, например, как десенсибилизация их к ингибированию конечными продуктами и т.п. требует разрушение клеточной стенки в основном механическими воздействиями (продавливание замороженной биомассы через микроскопические отверстия френч-пресса, обработка ультразвуком). В частности, если обработка ультразвуком клеток *E. coli* или *Bac. subtilis* достаточно 30 – 90 секунд, то для клеток *S. glutamicum* обычно требуется 15 – 30 минут циклами продолжительностью не более 1 мин с последующим охлаждением суспензии в ледяной бане, чтобы избежать термической и ферментативной денатурации ферментов. Несмотря на эти предосторожности при получении бесклеточных ферментных препаратов клеток измерение активности ферментов, которые обладают активностью только, если они сохраняют мультимерную структуры и не распадаются на субъединицы, представляет определенные сложности. В частности, долгое время считалось, что ЦТК у ГПКБ разорван ввиду отсутствия активности 2-кетоглутаратдегидрогеназы [22,23]. Лишь спустя много лет, при использовании специальных протекторов этого фермента удалось

показать его присутствию в бесклеточных экстрактах, полученных с помощью ультразвуковой обработки [24].

В нашей работе при изучении аналогорезистентных мутантов *S. glutamicum* с нарушенной регуляцией синтеза ароматических аминокислот мы также испытывали сложности с определением активности и аллостерических свойств ферментов, которые изучали в бесклеточных экстрактах, полученных с помощью ультразвукового дезинтегратора. Для преодоления этой проблемы был испытан целый ряд известных мембранотропных агентов, способных нарушить барьер проницаемости клеточной стенки бактерий. Среди них наиболее эффективным оказался отечественный антибиотик грамицидин С, препараты которого доступны в аптечной сети. В частности, мы использовали 2%-ный спиртовой раствор грамицидина С, который добавляли к суспензии свежих клеток *S. glutamicum*, создавая конечную концентрацию грамицидина С 0,05%. Ферментативная активность обнаруживалась практически мгновенно после добавления этого антибиотика, то есть он быстро обеспечивал проницаемость мембран клеток для субстратов и продуктов реакций. Величину ферментативной активности было удобно относить к оптической плотности суспензии клеток, присутствующих в реакционной смеси (см. главу Материалы и методы).

Можно было ожидать, что измерения активности ферментов, находящихся внутри клеток, будут давать более низкие цифры по сравнению с величинами активности бесклеточных препаратов, поскольку локальные (внутриклеточные) концентрации субстратов в результате их потребления ферментами могут быть ниже, чем внеклеточные. Для сравнения активности ферментов в бесклеточном экстракте, полученным обработкой ультразвуком и грамицидином С, густую (ОП540 = 250) суспензию клеток штамма *S. glutamicum* ATCC 13032 разделили на две части. К первой – добавили грамицидин С, а вторую обработали ультразвуком (см. Материалы и методы) и получили супернатант, содержащий клеточные белки (конц. белка 23,9 мг/мл). В двух полученных препаратах измеряли активность префенатдегидратазы (фермент биосинтеза фенилаланина и

тирозина). В суспензии клеток, обработанных грамицидином С, она составила 0,2 наномоля/мин/ОП540, а в супернатанте – 5,2 наномоля/мин/ мг белка, что соответствует 0,5 наномоля/мин/ ОП540 (как, если бы в реакционную смесь вместо бесклеточного супернатанта внесли бы эквивалентное количество обработанных грамицидином С клеток). Таким образом, удельная активность префенатдегидратазы в клетках была в 2,5 раза ниже, чем в бесклеточном препарате, полученном из такого же количества клеток. Этот факт необходимо учитывать, при оценке уровня активности ферментов.

В то же время, при обработке грамицидином С фермент значительно лучше сохраняет свои свойства. Это касается в первую очередь чувствительности к аллостерическим ингибиторам, которая часто зависит от распада на субъединицы олигомерных регуляторных ферментов. Так как обработка грамицидином С позволяет измерять активность в условиях, приближенных к условиям *in vivo*, можно было ожидать, что чувствительность ферментов к аллостерическому ингибированию в бесклеточном экстракте, полученном после обработки ультразвуком, и в пермеабелизованных грамицидином С клетках могут различаться. Как оказалось, активность префенатдегидратазы *S. glutamicum* дикого типа в бесклеточном экстракте, полученном УЗ-обработкой, ингибировалась на 50% при концентрации фенилаланина (аллостерический ингибитор этого фермента) около 0,1 мМ ($I_{50}= 0,1$ мМ) тогда как при обработке грамицидином фермент оказался на порядок более чувствительным к ингибированию фенилаланином ($I_{50}=0,01$ мМ). Субъединичная структура префенатдегидратазы из *S. glutamicum* не изучалась, в то же время известно, что этот фермент из родственного микроорганизма *M. tuberculosis* состоит из 4-х идентичных субъединиц, что показано методом рентгено-структурного анализа [267]. Снижение чувствительности к ингибированию фенилаланином активности префенатдегидратазы, присутствующей в ферментном препарате, полученным обработкой УЗ, вероятно связано с частичным распадом на

субъединицы нативного четырех-субъединичного фермента, подобного обнаруженному в клетках *M. tuberculosis*.

Разработанная нами методика пермеабиллизации клеток ГПКБ опубликована:

- Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М. Определение активности ферментов биосинтеза ароматических аминокислот в клетках *S. glutamicum* с использованием мембранотропных агентов // Тез. докл. IV конференции «Биология культивирования и биотехнология микроорганизмов» 1989. Ташкент. С.28-29
- Ворошилова Э.Б. Селекционно-генетическое изучение мутантов *S. glutamicum* – продуцентов фенилаланина: автореф. дис. канд. биол. наук:03.01.15. М. 1995. 20 с.

3.3. Пермеабиллизация клеток кишечной палочки на примере метода получения гамма-аминомасляной кислоты.

В процессах биотрансформации система целых клеток считается предпочтительной по сравнению с методами, связанными с извлечением ферментов из клеток, поскольку исключаются дорогостоящие и длительные процедуры изоляции и очистки ферментов. Для использования целых клеток необходимо устранить барьер их проницаемости, чтобы обеспечить диффузию субстратов внутрь клетки и выход в среду продуктов реакции. Главным барьером проницаемости служит цитоплазматическая мембрана, а некоторые бактерии и в частности *S. glutamicum* и *E. coli* дополнительно снабжены и внешним мембранным покрытием. Прочие компоненты клеточной стенки также в определенной степени препятствуют диффузии метаболитов. Обычно пермеабиллизацию клеток проводят с помощью мембранотропных химических агентов, таких как ацетон, толуол, цетилтриметил бромид аммония (СТАВ), ЭДТА. Иногда используют антибиотики, нарушающие синтез клеточных стенок. Во всех случаях химического воздействия возникает необходимость в

дополнительных этапах процесса получения конечного продукта, которые особенно нежелательны при промышленных масштабах.

Нами разработан метод температурной пермеабиллизации клеток *E.coli*, предназначенный для промышленного получения гамма-аминомасляной кислоты (далее ГАМК), которую можно получать биотрансформацией глутаминовой кислоты под действием глутаматдекарбоксилазы по уравнению:



ГАМК является важнейшим тормозной нейромедиатором в ЦНС человека и животных и используется как пищевая добавка в европейских странах и в США, а также в качестве лекарственного препарата как таковая и в виде соединений со вспомогательными молекулами с целью преодоления гематоэнцефалического барьера. Примером служит ноотропный препарат пикамелон (разработан в СССР) - соединение ГАМК с никотиновой кислотой. Кроме медицинского назначения ГАМК может быть использован для синтеза биоразлагаемого полимера «нейлон 4», который экологичен, но дорог в производстве, что ограничивает его применение.

E. coli обладает способностью синтезировать ГАМК из глутаминовой кислоты, обладая двумя изомерными глутаматдекарбоксилазами (далее ГДК) *GadA* и *GadB*, кодируемые соответственно генами *gadA* и *gadB*. Есть также антипортер глутамат/ГАМК, кодируемый геном *gadC*, и в принципе кишечная палочка способна превращать глутаминовую кислоту в ГАМК, поглощая глутаминовую кислоту из среды с помощью антипортера *GadC* в обмен на выход в среду ГАМК, образованной под действием *GadA* и *GadB*. Однако очевидно, что при сверх-экспрессии генов, кодирующих глутаматдекарбоксилазы, потенции *GadC* как для эффективного поглощения глутамата из среды, так и для выхода в среду ГАМК недостаточно.

Для разработки эффективного метода биотрансформации глутаминовой кислоты (в виде глутамата натрия) в ГАМК ген *gadA* из *E.coli* K12 был амплифицирован с помощью метода ПЦР с использованием соответствующих

праймеров и включен в состав экспрессионной плазмиды pGEMEX (фирма «Promega»). Клонированный ген *gadA* был помещен в хвостовую часть гена 10 бактериофага T7, который имеется в составе этого вектора, что позволяет использовать для экспрессии все необходимые регуляторные элементы транскрипции и трансляции гена 10. Полученная плазида, обозначенная pGAD1, далее была перенесена в специальный штамм *E.coli* В BL21(DE3) фирмы «Novagen», в хромосоме которого содержится ген РНК-полимеразы фага T7, что позволяет эффективно экспрессировать гена 10 и, соответственно, вшитый в него ген *gadA*. Полученный плазмидный устойчивый к ампициллину штамм назван *E.coli* GAD1. Дополнительно получен штамм *E.coli* GAD10, устойчивый одновременно к ампициллину и канамицину. Подробно получение обоих штаммов описано в патенте Российской Федерации №2143002 (Гусятинер М.М. и др. «Способ получения гамма-аминомасляной к-ты»). Штамм *E.coli* GAD10 обладал несколько большей активностью ГДК и использовался в дальнейших экспериментах. Данный штамм характеризуется многократным (10 – 40 раз) увеличением активности ГДК по сравнению со штаммом *E.coli* С600 дикого типа при приблизительно равном накоплении биомассы.

Для использования штамма в промышленных условиях для получения ГАМК необходимо было подобрать метод пермеабиллизации клеток, из которых наиболее технологичным выглядел метод термического воздействия: выращивание клеток в благоприятных для роста условиях, сепарация клеток и их хранение в замороженном состоянии. Для каждой операции получения ГАМК замороженные клетки оттаивались и подвергались термической обработке для нарушения целостности мембран. В ряде проведенных экспериментов было показано, что наилучшую активность биомасса приобретала при выдерживании при 53оС в течение до 50 мин. При этой температуре происходило лишь незначительное (на 40%) снижение внутриклеточной активности ГДК, определяемое при разрушении клеток ультразвуковой обработкой (Рис. 32).

При сравнении с химическими методами пермеабилзации и разрушением ультразвуком (см. Материалы и методы) показано, что термический метод пермеабилзации превосходит по эффективности указанные выше методы,

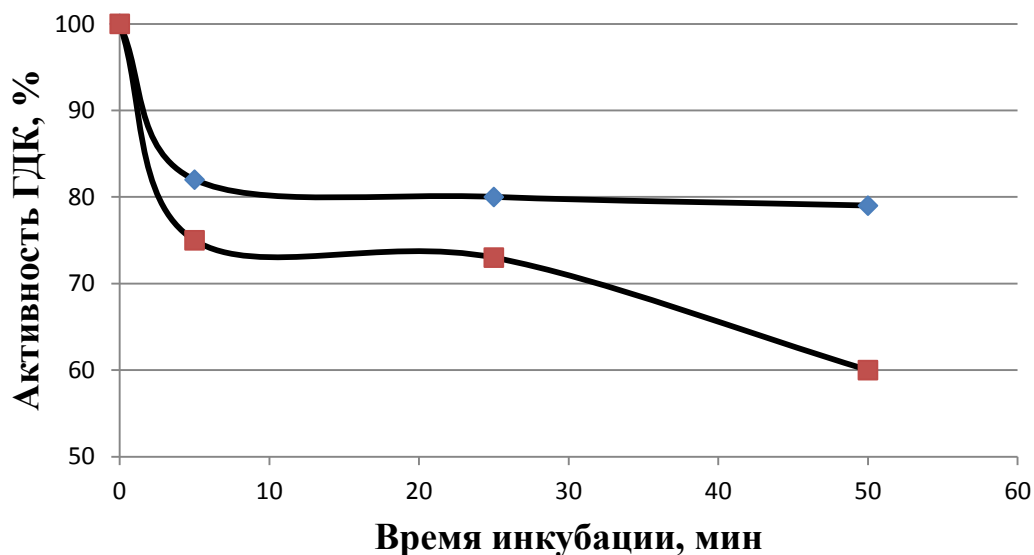


Рис. 32. Термальная инактивация ГДК штамма E.coli GAD10

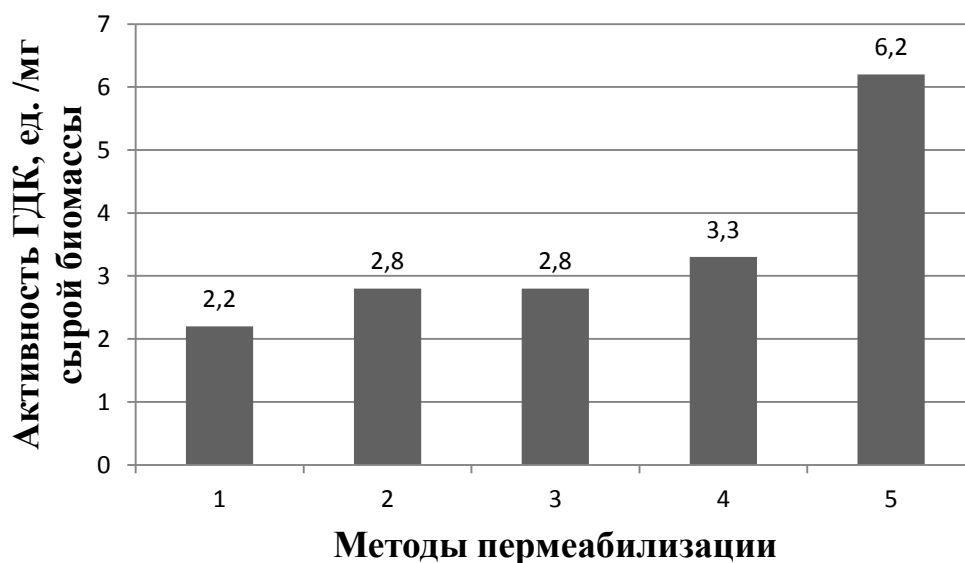


Рис. 33. Сравнение пермеабилзации обработки клеток.

Без обработки (контроль); 2. ультразвук; 3. этилацетат; 4. толуол; 5. термическая активация

поскольку обеспечивает максимальную ферментативную активность (Рис. 33) и одновременно наименее затратен. Следует отметить, что ферментативная

активность пермеабелизированной клеточной массы снижается после 4-х часов процесса декарбоксилирования глутамата. В связи с этим при оптимизации этого процесса предусматривается дробная или непрерывная подача свежих порций биомассы. В результате этого и ряда других технологических усовершенствований данного процесса было продемонстрировано, что штамм GAD10 способен в течение суток продуцирует ГАМК со скоростью 5 г/час в объеме 1 л. За 35 часов разработанного нами процесса из 200 г глутаминовой кислоты образовывалось 138 г ГАМК, что близко соответствует теоретически возможному выходу продукта (99% от теоретического выхода). При этом 1 г сырой биомассы пермеабелизированных клеток продуцировал 23 г ГАМК. Данный метод получения ГАМК был использован для коммерческого получения ГАМК компанией Мосагроген.

Разработанный нами метод получения ГАМК опубликован:

- Гусятинер М.М. Калужский В.Е., Ямпольская Т.А. и др. Способ получения гамма-аминомасляной кислоты// Патент Российской Федерации. №2143002 (<http://www.findpatent.ru/patent/214/2143002.html>)
- Plokhov A.Y., Gusyatiner M.M., Yampolskaya T.A. et al. Preparation of γ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000. V.88. pp. 257–265
- Плохов А.Ю. Разработка биокаталитических процессов получения аминомасляной кислоты и циклодекстрина // автореф. дис. канд. техн. наук:03.00.23. М. 1997. 20 с.

3.4. Механизм продукции фенилаланина ауксотрофными по тирозину и аналогорезистентными мутантами *S. glutamicum*.

Стадии биосинтеза тирозина из префеновой кислоты (общий предшественник тирозина и фенилаланина, рис.34) в клетках *S. glutamicum* отличаются от хорошо известных путей биосинтеза, установленных для *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. У большинства бактерий префенат подвергается окислительному декарбоксилированию (префенатдегидрогеназа), а затем продукт этой реакции, 3-гидроксифенилпируват, аминирован с участием ароматических трансаминаз с образованием тирозина (Рис.34, слева). В клетках *S. glutamicum* обнаружена обратная последовательность реакций превращения префената в тирозин: сначала префенат аминирован, а на следующей стадии происходит окислительное декарбоксилирование с образованием тирозина. Аминированная форма префената имеет название арогенат (устаревшее название – претирозин). Превращения префената в тирозин в арогенатном показано на Рис. 34 (правая часть).

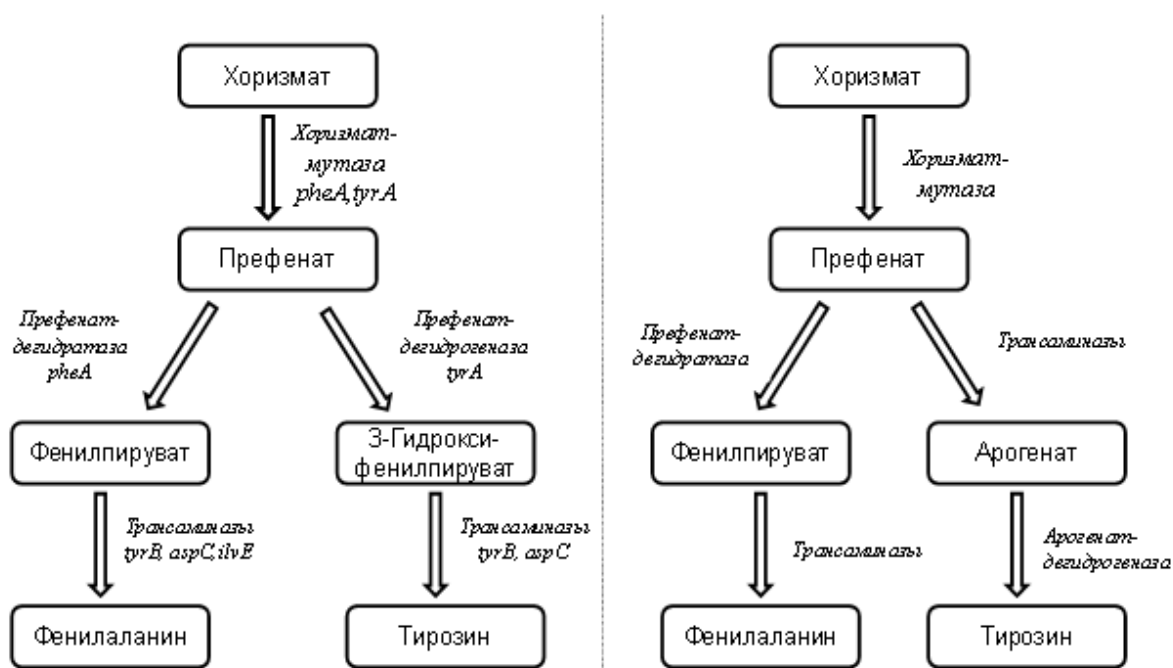


Рис. 34. Пути биосинтеза фенилаланина и тирозина у *E. coli* (слева) и *S. glutamicum* (справа)

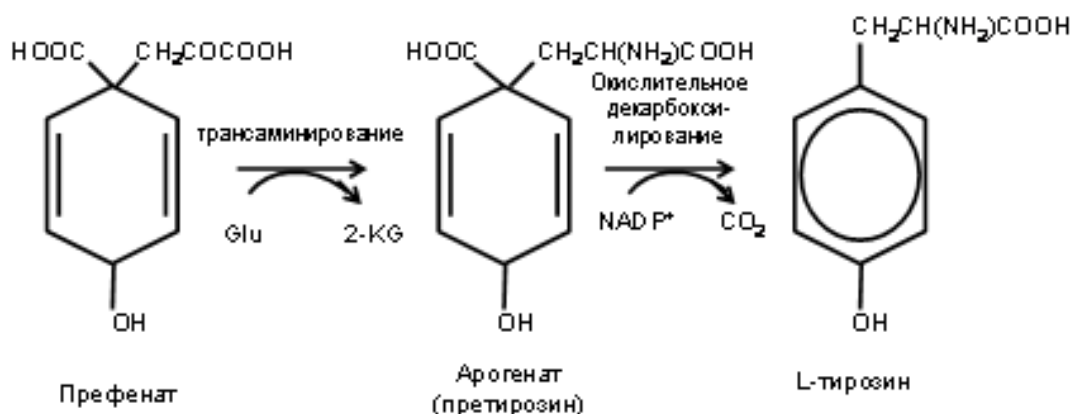


Рис. 35. Превращение префената в тирозин в арогенатном пути.

Арогенатный биосинтез тирозина у *S. glutamicum* был установлен лишь в 1979-80 годах [268, 269], а впервые обнаружен у некоторых сине-зеленых водорослей в 1974 году [270]. Исследование регуляции биосинтеза ароматических кислот проводилось в 70-е годы исходя из предположения об обычном, неарогенатном пути синтеза тирозина, который был обнаружен у *E. coli* (Рис.34, слева), что порождало ряд ошибок [271-273]. Так описаны свойства, как это теперь очевидно, несуществующего фермента у *S. glutamicum* - префенатдегидрогеназы, которая на самом деле была суммой двух стадий: аминирования префената и последующего его окисления с участием арогенатдегидрогеназы. В те же годы в ходе работ по созданию продуцентов фенилаланина на основе ГПКБ были получены ауксотрофные по тирозину мутанты, которые продуцировали фенилаланин, без каких-либо дополнительных регуляторных мутаций. Полагали, что у полученных ими тирозиновых ауксотрофов блокирован фермент префенатдегидрогеназа, что основывалось на ошибочной методике измерения активности этого фермента, как указано выше. Очевидно, ауксотрофность вызывалась блокированием активности арогенатдегидрогеназы. Голодание по тирозину должно было увеличить поток метаболитов по общему пути биосинтеза ароматических аминокислот, поскольку первый фермент общего пути,

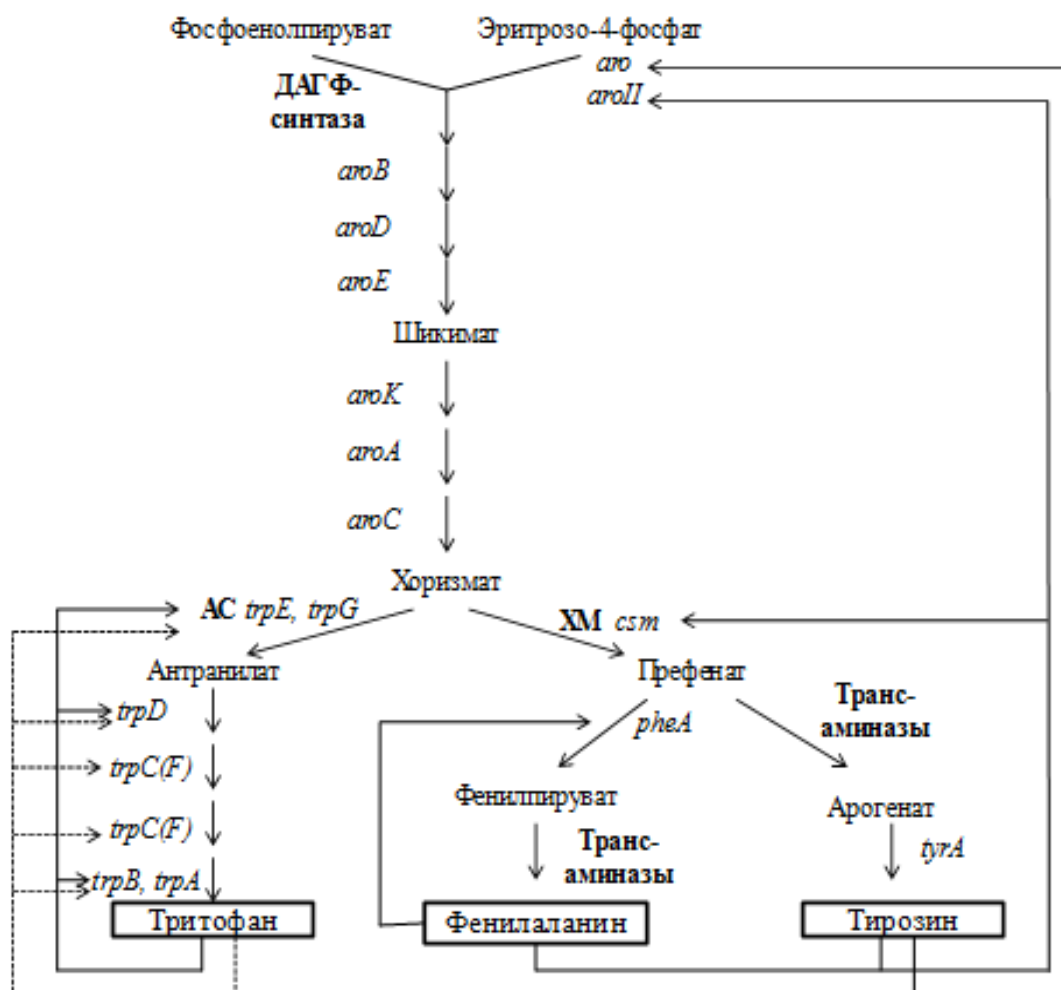


Рис.35. Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот в клетках *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 по Ikeda, 2006 [274]. Сплошные стрелки – ретроингибирование; точечные – репрессия синтеза ферментов.

3-дезоксид-D-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтаза (ДАГФ-синтаза), ингибируется только совместным действием фенилаланина и тирозина, но ни тем, ни другим веществом в отдельности (Рис.35). То же касается и следующей регулируемой стадии – хоризматмутаза: ее активность также подавляется только при одновременном присутствии тирозина и фенилаланина. Превращение хоризмовой кислоты в антраниловую по направлению к триптофану строго контролируется триптофаном и поэтому исключается. В результате, поток предшественников беспрепятственно направляется в сторону синтеза префената. При высокой внутриклеточной концентрации префената ослабляется

ингибирование префенатдегидратазы фенилаланином, так как это ингибирование смешанного типа по отношению к префенату. Последнее объяснение противоречит данным этих же исследователей, которые показали, что даже при большой (нефизиологической) концентрации префената фенилаланин вызывает практически полное ингибирование префенатдегидратазы.

3.4.1. Механизм продукции фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *C.glutamicum*

Для изучения механизма продукции фенилаланина с помощью разработанной нами методики пенициллинового обогащения (см. главу 4.1) было отобрано 6 независимых не индуцированных мутагенами тирозиновых ауксотрофов. У всех шести мутантов отсутствовала активность арогенатдегидрогеназы в отличие от родительского штамма дикого типа. Все 6 полученных тирозиновых ауксотрофов продуцировали фенилаланин, как и отмечалось ранее в литературе [273]. Максимальное накопление фенилаланина наблюдается при концентрации около 100 мг/мл, при более высокой концентрации продукция фенилаланина снижается, несмотря на увеличение

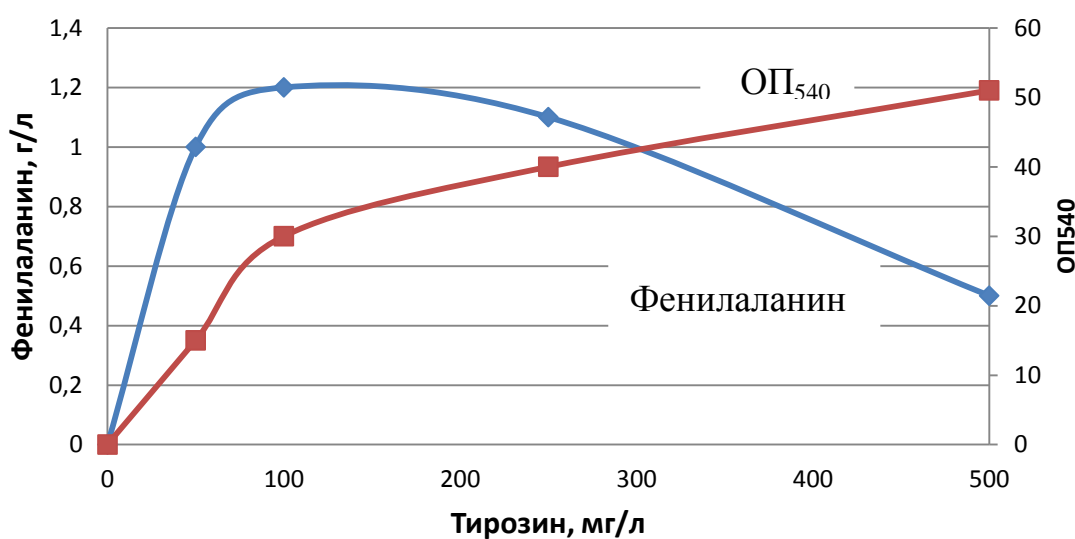


Рис. 36. Влияние концентрации тирозина, добавленного в ферментационную среду Ф1, на рост и накопление фенилаланина тирозиновым ауксотрофом *tyr-6*.

биомассы (Рис. 36), что, очевидно, связано с ингибированием ДАГФ-синтазы совместным действием добавленного в среду роста тирозина и синтезируемым ими фенилаланином.

Полученные от тирозин-зависимых штаммов прототрофные ревертанты полностью утрачивали способность к продукции фенилаланина, что указывает на значимость тирозиновой недостаточности для продукции фенилаланина и об отсутствии в этих штаммах каких-либо регуляторных мутаций, вызывающих продукцию фенилаланина. Оставалось непонятным, почему фенилаланин не подавлял свой синтез ингибированием активности префенатдегидратазы, которая весьма чувствительна к ингибированию фенилаланина ($I_{50} = 0,005$ мг/мл). Этот факт привел нас к предположению, что продукция фенилаланина происходила без участия префенатдегидратазы. Для подтверждения этой гипотезы от двух независимо полученных тирозиновых ауксотрофов были отобраны мутанты с двойной потребностью: в тирозине и фенилаланина (всего 66 двойных мутантов). Ауксотрофность по фенилаланина была обусловлена мутацией в гене, кодирующем префенатдегидратазу. Активность этого фермента отсутствовала, как показали результаты определения активности префенатдегидратазы. Все полученные ауксотрофы с двойной питательной потребностью сохранили способность к продукции фенилаланина (1 - 2 г/л), однако в ферментационную среду Ф1 было необходимо вносить не только тирозин, но и фенилаланин для того, чтобы рост начался. Кроме того, оказалось, что одинарные ауксотрофы, полученные от штамма дикого типа, нуждающиеся только в фенилаланина, также продуцировали фенилаланин в жидкой ферментационной среде, но в меньших количествах – около 0,3 г/л. Для роста этих ауксотрофов в ферментационную среду также было необходимо внести фенилаланин (0,05 г/л). Наблюдалось парадоксальное явление: нуждающиеся для роста в фенилаланине мутанты накапливали в среде фенилаланин.

Пытаясь объяснить обнаруженные парадоксы, мы предположили, что тирозин-недостаточные мутанты мутантов с блокированной арогенатдегидрогеназой накапливают и выделяют в среду субстрат этой этого фермента - арогенат, который затем неферментативно или под действием арогенатдегидратазы (такой фермент обнаружен у некоторых микроорганизмов [275]) превращается в фенилаланин. Химические свойства арогената указывали на первую возможность: арогенат крайне неустойчив в кислой среде, в которой он превращается в фенилаланин (рис.37) [276]. Точно также в кислой среде префенат превращается, но не в фенилаланин, а в его неаминированный предшественник, фенилпируват [277]. Аминирование фенилпирувата ароматическими трансминазами приводит к образованию фенилаланина (Рис. 35).

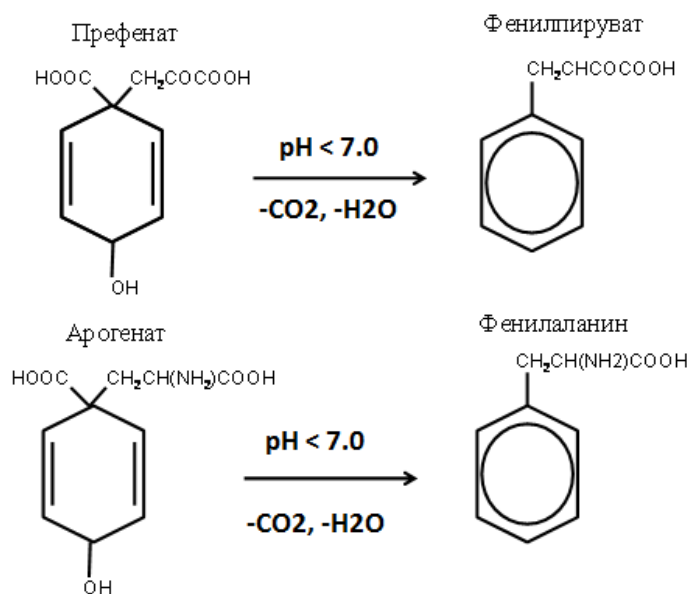


Рис. 37. Неферментативные превращения префената и арогената в кислой среде [276, 277].

Учитывая химические свойства префената и арогената, мы предположили, что первоначально у тирозиновых ауксотрофов происходит накопление не фенилаланина, а префената и арогената. Выделенные клетками в культуральную жидкость эти вещества при подкислении среды, которое обычно наблюдается в ходе периодической ферментации без pH-статирования, превращаются либо в фенилаланин (из арогената), либо в фенилпируват (из префената). Фенилпируват

после поглощения клетками из среды мог бы также превратиться в фенилаланин под действием внутриклеточных аминотрансфераз, однако вклад этого процесса в накопление фенилаланина не оценивался в настоящем исследовании.

Выращивали штамм *tyr-6* в ферментерах в течение 2-х суток в условиях рН-статирования и без него и определяли содержание арогената, префената и фенилаланина в культуральной жидкости (Табл.4). Определение фенилаланина

Таблица 4.

Влияние рН среды на накопление фенилаланина и его предшественников при выращивании ауксотрофного по тирозину мутанта *tyr-6* в лабораторных ферментерах

Значение рН среды	Концентрация фенилаланина и его предшественников, г/л.			
	Префенат	Арогенат	Фенилаланин	Фенилаланин после подкисления пробы
6,0	0,11	0,00	1,58	1,30
7,0	0,82	0,67	0,13	0,80
7,5	1,07	1,35	0,13	1,48
Без рН-статирования	0,17	0,14	1,07	1,21

проводили методом тонкослойной хроматографии в щелочной среде, чтобы исключить превращение арогената в фенилаланин. Как видно из приведенных данных, накопление в среде префената, арогената и фенилаланина зависит от поддерживаемого значения рН среды. В нейтральной (рН 7,0) и слабощелочной среде (рН 7,5) происходит накопление предшественников фенилаланина – префената и арогената, тогда как фенилаланин практически не накапливается. Подкисление образца культуральной жидкости (до рН 1,0) вызывает немедленное

превращение арогената в фенилаланин, а префената – в фенилпируват. На рис. 38 представлен механизм продукции фенилаланина у тирозиновых ауксотрофов, полученных от штамма дикого типа ATCC 13032. Первоначально (при pH среды 7 и выше) накапливается префенат и арогенат, поскольку голодание по тирозину устраняет ингибирование ключевых ферментов общей части пути биосинтеза, ДАГФ-синтазы и хоризматмутазы, а ферментативное превращение арогената в тирозин заблокировано мутацией.

При естественном подкислении среды в ходе периодической ферментации префенат неферментативно превращается в фенилпируват (ферментативно этот процесс невозможен в виду ингибирования префенатдегидрогеназы фенилаланином), который накапливается в среде, а арогенат – в фенилаланин. Штаммы с двойной потребностью в тирозине и фенилаланине, у которых дополнительно заблокирована префенатдегидратаза также накапливают арогенат, который в кислой среде неферментативно превращается в фенилаланин. При этом фенилаланин-специфический путь биосинтеза не используется в виду мутации, блокирующей префенатдегидратазу. Поток общих ароматических предшественников в сторону префената обеспечивается голоданием одновременно по фенилаланину и тирозину, что освобождает регуляторные ферменты общего пути (ДАГФ-синтаза, хоризматмутаза) от ингибирования.



Рис. 38. Превращение префената в фенилаланин тирозин-недостаточными мутантами штамма ATCC 13032, а также мутантами с двойной потребностью в тирозине и фенилаланине.

3.4.2. Механизм продукции фенилаланина мутантами *S. glutamicum* ATCC 13032, устойчивыми к структурным аналогам фенилаланина

Для дальнейшего изучения механизма продукции фенилаланина от штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC 13032, а также от его тирозиннедостаточных производных (см. выше) были отобраны аналогорезистентные мутанты. Для данной селекции использовали два структурных аналога фенилаланина: мета-фторфенилаланин (мФФ) и пара-фторфенилаланин (пФФ) – поскольку было известно, что мутанты, устойчивые к этим веществам, продуцируют фенилаланин [278]. От прототрофного штамма ATCC 13032 было отобрано 100 мутантов, устойчивых к мФФ (0,5 мг/мл). пФФ не вызывал необходимого для отбора мутантов ингибирования роста (до конц. 2 мг/мл) и поэтому не использовался. Мутанты, резистентные к мФФ продуцировали смесь фенилаланина и тирозина (около 2 и 1,5 г/л соответственно). Механизм продукции аминокислот мФФ-резистентными мутантами, полученными от прототрофного штамма ATCC 13032, рассмотрен ниже.

Ауксотрофные по тирозину штаммы, полученные от штамма дикого типа ATCC13032, были чувствительны к ингибированию как мФФ, так и пФФ. От 6-ти тирозиновых ауксотрофов (см. выше) были получены мутанты на средах, содержащих мФФ или пФФ (концентрация аналогов 0,5 мг/мл, L-тирозин 0,05 мк/л). От каждого из 6-ти штаммов отобрано по 100 мутантов, устойчивых к мФФ, и по 20 - 50 – устойчивых к пФФ. Как оказалось, уровень продукции фенилаланина был повышен практически у всех полученных мутантов с 0,8 -1,0 г/л до 3 г/л (ферментационная минимальная среда с 100 мг/л L-тирозина). Лучший штамм 6-27, который исследовался далее, продуцировал на ферментационной среде Ф1 около 4 г/л фенилаланина. Среди полученных аналогорезистентных мутантов встречались прототрофные по тирозину ревертанты, которые продуцировали одновременно фенилаланин и тирозин, подобно

аналогорезистентным мутантами, полученным от прототрофного штамма дикого типа ATCC 13032.

В то же время, все полученные мутанты, устойчивые к пФФ, утратили аукотрофность тирозину, а продукция фенилаланина исчезла. Очевидно, в присутствии пФФ происходил отбор прототрофных ревертантов, которые устойчивы к используемой концентрации пФФ, но не мФФ. Эти ревертанты не получили регуляторных мутаций, вызывающих продукцию фенилаланина.

Как показало исследование регуляторных ферментов биосинтеза ароматических аминокислот, ДАГФ-синтазы, хоризматмутазы и префенатдегидратазы, устойчивых к мФФ, полученных от прототрофного штамма дикого типа (для примера взят штамм Д28), продуцирующих смесь тирозина и фенилаланина выявлена десенсибилизация первого фермента общей части ароматического биосинтеза – ДАГФ-синтазы к согласованному ингибированию фенилаланином и тирозином (Рис. 39). Этот мутантный фермент утратил чувствительность к ингибированию (по крайней мере до концентрации 1 мМ), тогда как концентрация смеси тирозина и фенилаланина всего 0,001 мМ ингибировала активность ДАГФ-синтаза на 50% у исходного штамма. Хоризматмутаза (катализирует превращение хоризмата в префенат) штамма Д28 также была полностью освобождена от согласованного ингибирования тирозином и фениланином (данные не приведены), что и следовало ожидать, так как активности ДАГФ-синтазы и хоризматмутазы регулируются общим аллостерическим центром [279]. В то же время, префенатдегидратаза, фермент специфического фенилаланинового пути, сохранил чувствительность к ингибированию фенилаланином. Учитывая высокую чувствительность префенатдегидратазы к ингибированию фенилаланином и одновременно отсутствие ингибирования ДАГФ-синтаза и хоризматмутаза, мы предполагаем, что у такого рода штаммов, как и у тирозиновых ауксотрофов, происходит накопление арогената, который затем под действием арогенатдегидрогеназы превращается в тирозин, избыток которого выделяется в среду. Выделившийся в

среду арогенат неферментативно при снижении рН превращается в фенилаланин (Рис.40). Этот механизм объясняет одновременное накопление фенилаланина и тирозина мутантами, устойчивыми к мФФ с десенсибилизацией ДАГФ-синтазы (и, следовательно, хоризматмутаза).

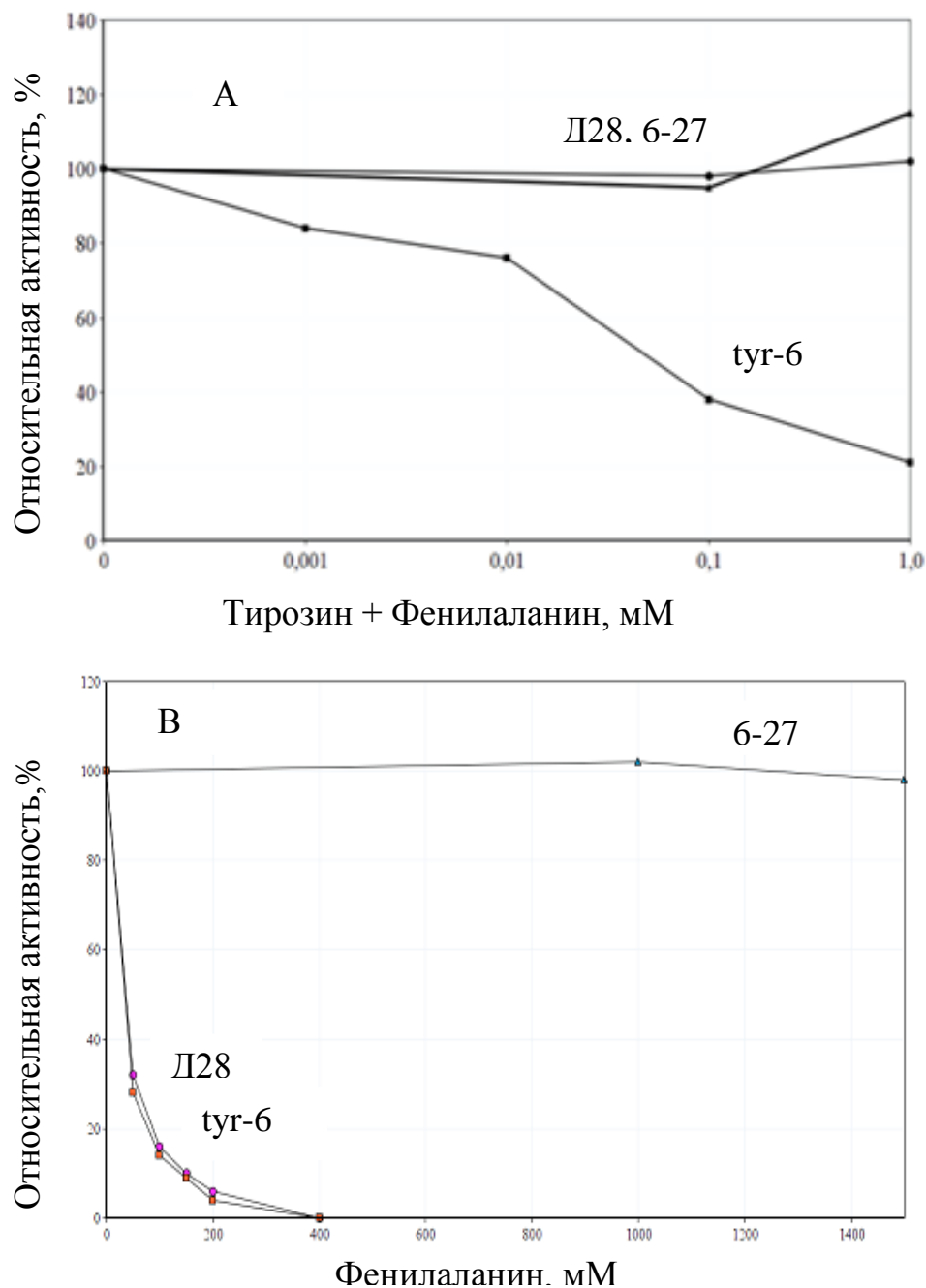


Рис. 39. Ингибирование ДАГФ-синтазы (А) и префенатдегидратазы (В) эквимольной смесью фенилаланина и тирозина (А) или фенилаланином (В) в клетках мутантов, устойчивых к мФФ, а также тирозинового ауксотрофа, полученного от штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC 13032. За 100% принята ферментативная активность в отсутствие аминокислот.

Свойства ключевых ферментов биосинтеза фенилаланина у наиболее продуктивного продуцента, устойчивого к мФФ (штамм 6-27), полученного от ауксотрофного по тирозину штамма *tyr-6* отличаются от таковых прототрофных аналогорезистентных мутантов. Как показано на Рис. 39, у этого штамма выявлена не только десенсбилизация регуляторных ферментов общего пути, ДАГФ-синтазы (рис.39А) и хоризматмутаза к согласованному ингибированию фенилаланином и тирозином, но также и префенатдегидратазы к ингибированию фенилаланином (рис.39 В)



Рис.40. Превращение префената в фенилаланин арогенатным путем прототофными мутантами штамма ATCC 13032, резистентными к мФФ, у которых произошла десенсбилизация только ДАГФ-синтазы (мутант Д28).

Таблица 5

Активности ДАГФ-синтазы и хоризматмутаза у штамма *Tyr-6* и полученного от него мФФ-резистентного мутанта 6-27

Штамм	Ферментативная активность	
	ДАГФ-синтазы*	Хоризматмутаза**
<i>Tyr-6</i>	6,5	2,7
6-27	7,9	12,7

*Удельная активность ДАГФ-синтазы выражена в нмолях ДАГФ, образующегося в мин на ед. ОП₅₄₀×10⁻³. **Удельная активность хоризматмутаза выражена в наномолях образующегося префената в мин на ед. ОП₅₄₀×10⁻².

Кроме того, была выявлена повышенная в 4-5 раз активность хоризматмутаза (дерепрессия синтеза) у штамма 6-27, что также должно

способствовать продукции фенилаланина (Табл. 5). У штамма 6-27, у которого десенсibilизированы ферменты как общей части биосинтеза ароматических кислот, так и специфической фенилаланиновой ветви, префенатдегидратаза, но при этом блокирована арогенатдегидратаза, синтез фенилаланина происходит в основном ферментативно без существенного накопления арогената или префената. Этот механизм подтверждается опытами с рН-статированием в лабораторных ферментерах (Таблица 6, Рис. 41).

Таблица 6

Влияние рН среды на накопление фенилаланина и его предшественников при выращивании аналогорезистентного продуцента фенилаланина 6-27, нуждающегося в тирозине

рН среды ферментации	Концентрация фенилаланина и его предшественников, г/л.			
	Префенат	Арогенат	Фенилаланин	Фенилаланин после подкисления пробы
6,0	0,0	0,2	2,3	2,5
7,5	0,1	0,4	2,1	2,5

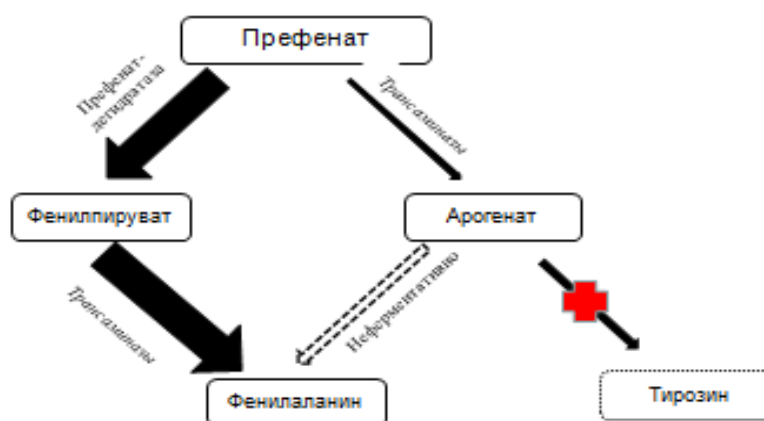


Рис.41. Превращение префената в фенилаланин ферментативным путем клетками штамма 6-27, нуждающимся в тирозине, имеющим мутации, вызывающие десенсibilизацию ДАГФ-синтазы и префенатдегидратазы.

3.4.3 Возможности дальнейшего повышения уровня продукции фенилаланина

Несмотря на полную десенсibilизацию к ингибированию тирозином и фенилаланином ключевых ферментов в штамме 6-27, можно было предполагать, что мутации резистентности к другим ароматическим аналогам могут вызвать дополнительные изменения в биосинтезе фенилаланина, например, вызывать дерепрессию важных для продукции генов. Чтобы испытать эту возможность были индуцированы нитрозогуанидином мутации (по 100-150 мутантов) устойчивые к следующим структурным аналогам: 5-метилтриптофан, 3,4-дигидроксифенилаланин, 2-метилфенилаланин, 3-аминотирозин. Однако селекция на устойчивость к указанным веществам не улучшило продукцию.

В то же время, мутации, вызывающие повышенную устойчивость к уже использованному аналогу, м-ФФ, позволили отобрать более продуктивные штаммы. Для индукции мутаций, сообщающих более высокую степень устойчивости к мФФ, в качестве источника тирозина для тирозинзависимого штамма 6-27 использовали дипептид лейцил-тирозин. Это вещество проникает в клетки особой транспортной системы и не может конкурировать с мФФ за

Таблица 7

Результаты селекции продуцентов фенилаланина, резистентных к мФФ, производных тирозин-недостаточного штамма *S. glutamicum* 6-27

Исходный штамм	Конц. мФФ	Количество проверенных на продукцию фенилаланина	Уровень продукции фенилаланина лучшим штаммом, г/л
6-27	7	350	6 (штамм 125)
	9	200	6 (штамм 20)
20	15	100	8 (штамм 54)
	17,5	100	8
	20	150	8 (штамм 16)
125	8	150	6
	10	150	6

транспорт внутрь клеток. Присутствие тирозина во внутриклеточном пуле должно способствовать ингибирующему действию мФФ, аналога фенилаланина. Этим способом были вначале получены мутанты, устойчивые к мФФ в концентрации 7 мг/мл, а затем от некоторых полученных штаммов, были индуцированы мутанты с большей устойчивости к аналогу. в результате двухступенчатой селекции на средах с повышающимися от 7 до 20 мг/мл концентрациями мФФ были получены производные штамма 6-27. Ход проведенной селекции показан в Таблице 7. У полученных аналогорезистентных штаммов, у которых продукция фенилаланина улучшилась, изменений уровня ферментативных активностей ключевых ферментов не обнаружено по отношению к их родительскому штамму 6-27 (Табл. 8). Отмечается повышение внутриклеточного содержания ДАГФ – продукта первой реакции синтеза ароматических аминокислот, ДАГФ-синтазы.

Это, очевидно, связано с увеличением уровня синтеза субстратов реакции для ДАГФ-синтазы, эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата, синтез которых происходит в пентозофосфатном пути и гликолизе.

Таблица 8

Некоторые биохимические свойства продуцентов фенилаланина, обладающих повышенной устойчивостью к мФФ

Штамм	Продукция фенилаланина, г/л	Ферментативная активность, % (За 100% принята удельная активность штамма tyr-6)		Внутриклеточный пул ДАГФ (за единицу принято содержание ДАГФ у штамма tyr-6)
		ДАГФ-синтаза	Хоризматмутаза	
Tyr-6	2,8	100	100	1
6-27	6,6	122	467	9,0
20	10,6	162	376	15,2
16	11,9	91	335	17,7
54	12,4	160	390	18,1

Таблица 9

Аминокислотный состав культуральной жидкости у продуцентов фенилаланина, обладающих повышенной устойчивостью к мФФ

Аминокислота	Содержание аминокислот, г/л				
	туг-6	6-27	20	16	54
Фенилаланин	2,8	6,6	10,6	11,9	12,4
Тирозин	1,9	0,2	0,1	0,1	0,1
Валин	6,3	1,8	0,9	<0,1	0,3
Лейцин	0,3	0,3	<0,1	<0,1	<0,1
Изолейцин	0,2	0,6	0,8	0,5	0,9
Аланин	1,5	3,1	1,3	0,7	1,5
Глутамат	0,3	0,7	0,6	0,5	0,7
Глицин	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
Лизин	1,8	1,0	1,4	1,1	1,2

Кроме того, обращает на себя внимание отсутствие лейцина в культуральной жидкости (Табл. 9). По-видимому, присутствующий в ферментационной среде лейцин потребляется из среды. Действительно, рост наиболее активных продуцентов фенилаланина зависит от добавленного в минимальную жидкую среду лейцина, подобно тому, как это наблюдается у специально полученного от штамма туг-6 лейцинового ауксотрофа. Отметим также, что среди большого количества различных ауксотрофных по аминокислотам мутантов, полученных от штамма 6-27, только у лейциновых ауксотрофов значительно улучшалась продукция фенилаланина (данные не приведены). Эти наблюдения указывают на регуляторную связь между синтезом лейцина и фенилаланина. В клетках *E.coli* такая связь действительно наблюдается. Трансаминаза, кодируемая геном тугВ, участвует в аминирование как кето-предшественников ароматических аминокислот, так и кето-предшественника лейцина (2-кетоизокапроата). Возможно, сходная двойная функция трансаминаз присуща и клеткам *S. glutamicum*. В этом случае физиологическая (негенетическая) зависимость продуцентов фенилаланина может быть результатом того, что в связи с высоким уровнем аминирования фенилпирувата, кето-предшественника фенилаланина,

лейцин выступает в качестве основного донора аминогрупп, превращаясь в кето-предшественник лейцина (кето-изокапроат). В результате значительного расходования лейцина на синтез фенилаланина и происходит голодание по лейцину для включения этой аминокислоты в белок. Действительно, мутанты с повышенным уровнем продукции фенилаланина, отобранные на устойчивость к повышенной концентрации мФФ в присутствии дипептида лейцил-тирозина, нуждаются для роста в добавке лейцина. Несмотря на внесение в среду высоких концентраций лейцина (500 мкг/мл) рост мутантов 20, 16, 54 все же остается более низким, чем у специально полученного аукострофа по лейцину (tyr-6 Leu). Очевидно, что отбор мФФ-резистентных мутантов в присутствии лейцин-содержащего дипептида позволил отобрать лейцин-недостаточных мутантов с повышенным уровнем продукции фенилаланина.

Таблица 10

Влияние лейцина на рост продуцентов фенилаланина в минимальной ферментационной среде Ф1

Штамм	Рост (ОП ₅₄₀)			
	Концентрация лейцина, мкг/мл			
	0	50	200	500
Tyr-6	28	23	36	11
Tyr-6 Leu ⁻	3	8	13	34
6-27	41	14	25	21
20	3	8	13	17
16	3	7	15	11
54	3	8	10	26

Представляется возможным создание эффективного метода получения фенилаланина на основе *S. glutamicum*, используя накопление арогената при значениях рН среды выше 7 с последующим подкислением среды и превращение этого вещества в фенилаланин. Арогенат, не являясь конечным продуктом в синтезе ароматических аминокислот, не ингибирует активность ферментов

ароматического пути, что, вероятно, позволяет добиться высокого уровня накопления этого промежуточного продукта.

3.4.4. Роль плазмидной амплификации гена *rheA* на продукцию фенилаланина

Как показано выше, продукция фенилаланина у регуляторных мутантов происходит ферментативным путем с участием префенатдегидратазы (ген *rheA*). Увеличение активности этого фермента, например, путем амплификации мутантного (нечувствительного к ретроингибированию фенилаланином) могло бы увеличить отток префената и хоризмата в сторону синтеза фенилаланина. В соответствии с этой идеей был клонирован ген *rheA* из клеток штамма 6-27 (плазмида pRJ627, векторная плазмида pHY416 [280], Рис. 42).

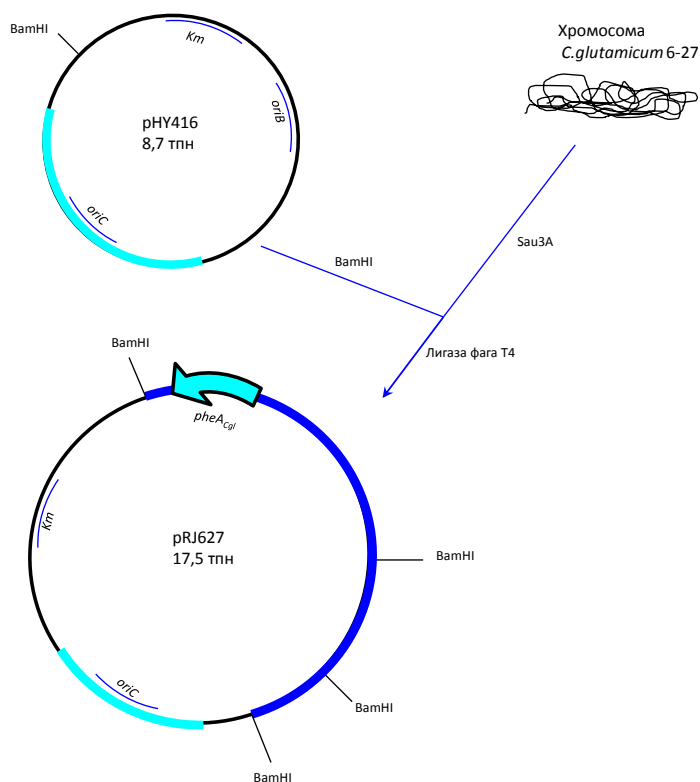


Рис. 42. Схема клонирования гена *rheA* из хромосомы штамма 6-27 и получения плазмиды pRJ627

Введение плазмиды pRJ627, несущей ген pheA из штамма 6-27, в клетки штамма дикого типа обуславливало устойчивость к аналогу фенилаланина и продукцию этой аминокислоты (Таблица 11). Тот же эффект наблюдался при введении этой плазмиды в штамм, у которого собственный ген pheA был блокирован (Phe1). Что касается эффекта амплификации в тирозиновом ауксотрофе tyr-6, который накапливает арогенат, превращающийся затем в

Таблица 11

Эффект плазмидной амплификации гена pheA из хромосомы аналогорезистентного продуцента фенилаланина *S. glutamicum* 6-27

Штамм/ плазида	Потреб- ность в амино- кислотах	Устой- чивость к мФФ*	Активность ферментов, отн. ед.**		Продук- ция фенил- аланина, г/л***
			ПД	ХМ	
13032 (дикий тип)	нет	–	1	1	0,0
13032/pRJ627	нет	+	6	1	4,0
Phe1	Phe	–	0	н.о	0,0
Phe1/pRJ627	нет	+	4	н.о	2,8
Tyr-6	Tyr	–	1	1	1,0
Tyr-6/pRJ627	Tyr	+	6	1	2,6

*устойчивость к мФФ в конц. 0,1 мг/мл; **за единицу активности принята активность префенатдегидрогеназы (ПД) и хоризматмутазы (ХМ) у штамма 13032; ферментация в пробирках (2 мл среды Ф1).

фенилаланин (см. 4.4.3), то продукция фенилаланина улучшилась не столь значительно. По-видимому, пул префената, субстрата для префенатдегидратазы, снижен в результате оттока префената в арогенат и выделения последнего в среду. В то же время, у продуцента фенилаланина 6-27 и полученных от него более продуктивных мутантов (16, 20, 54), у которых префенатдегидрогеназа уже полностью освобождена от ингибирования фенилаланином, амплификация гена pheA не влияла на продукцию фенилаланина (данные не приведены). Из

полученных данных очевидно, что, лимитирующая стадия в синтезе фенилаланина у штамма 6-27 находится в более ранних участках биосинтеза, например, на уровне хоризматмутазы.

Чтобы оценить влияние амплификации гена, кодирующего хоризматмутазу, соответствующий ген *pheA* из хромосомы *E.coli* был клонирован. Этот ген кодирует бифункциональный фермент префенадегидратаза-хоризматмутаза, о котором известно, что он выражается в клетках *S. g.* [281]. Было известно также, что этот фермент превращает хоризмат непосредственно в фенилпируват, при этом промежуточный продукт, префенат, остается связанным с этим белком и не поступает в клеточный пул. Таким образом, этот фермент предназначен для синтеза фенилаланина, но не тирозина, и активность этого фермента подавляется только фенилаланином. В клетках *E.coli* существует и хоризматмутаза, предназначенная для биосинтеза тирозина, которая, соответственно, ингибируется только тирозином.

Вначале от штамма, лизогенного по фагу мю, были отобраны 2 мутанта, устойчивые к мФФ и продуцирующие фенилаланин за счет десенсibilизации префенатдегидратазы (ген *pheA*) к ретроингибированию. Далее путем термоиндукции лизогенного фага мю получен фаговый лизат, которым трансформировали культуру *PheA*⁻ реципиентного штамма, и отобрали трансдуктанты *PheA*⁺, из которых затем выделили плазмиды с геном *pheA*, кодирующим десенсibilизированный к ингибированию фермент. Ген *pheA* присутствовал на вставке размером 2,1 тпн. Структура одной из полученных плазмид, pELA26, показана на Рис. 43. Для тестирования эффекта амплификации гена *pheA* из *E.coli*, этот ген был включен в состав бирепликонной плазмиды (*E.coli/C.glutamicum*) pNS2, сконструированной нами. Плазмида pNS2 получена на основе криптической плазмиды pBO1, способной реплицироваться в *S. g.*, и известного вектора для *E.coli* pUC19. В результате генно-инженерных манипуляций получена плазмида pVEB24, несущая ген *pheA* кишечной палочки,

кодирующий бифункциональный фермент хоризматмутаза-префенатдегидратаза, утративший чувствительность к ингибированию фенилаланином.

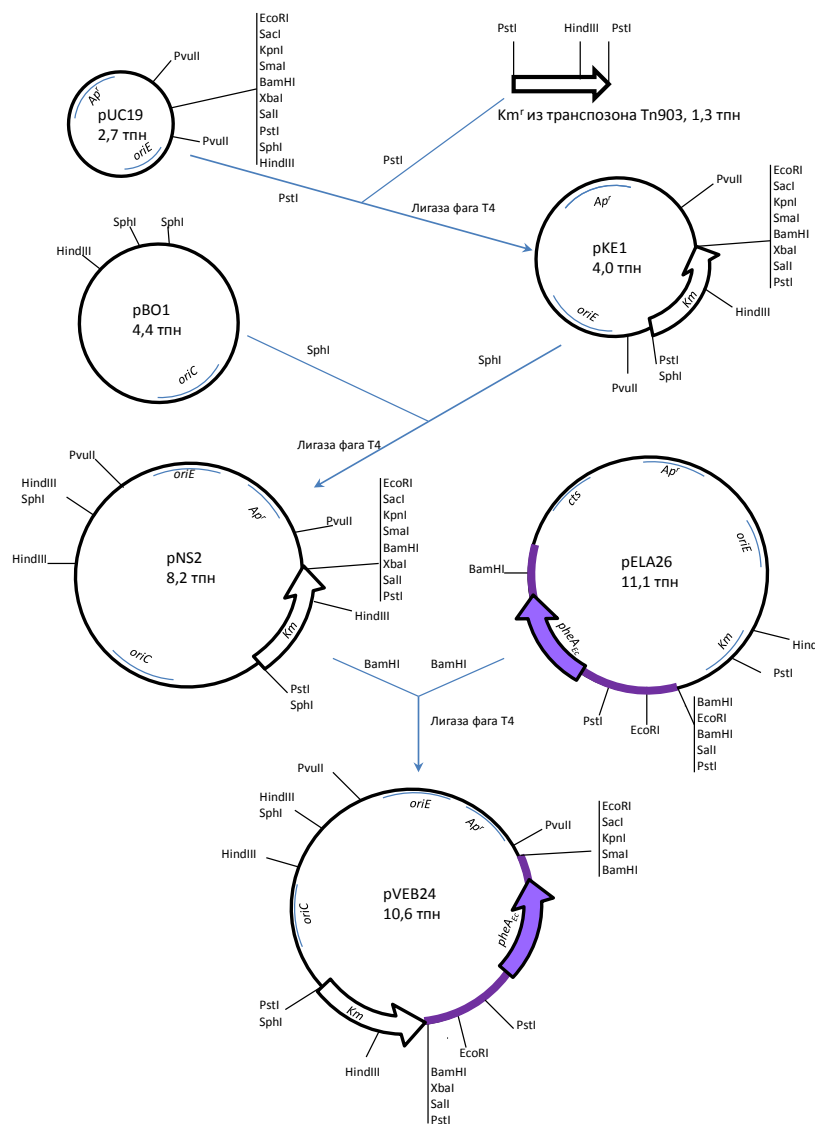


Рис.43. Конструирование бирепликонной плазмиды pVEB24, содержащую вставку гена *pheA* из *E.coli*.

Введение полученной плазмиды pVEB24 в штамм дикого типа *S. g.* ATCC 13032 вызывало продукцию фенилаланина, но значительно меньшую (0,2 г/л), чем плазида pRJ627, несущая ген *pheA* из штамма *S.g.* 6-27 (4 г/л, Табл.11), что, очевидно, связано с остаточной чувствительностью префенатдегидратазы, кодируемой этой плазмидой, к ингибированию фенилаланином (табл. 12). Чтобы

повысить устойчивость к ингибированию был проведен дополнительный раунд селекции на устойчивость к мФФ. Мутации индуцировались нитрозогуанидином с последующим отбором клонов штамма *C.glutamicum* pheA, содержащего плазмиду pVEB24. Из клона с наибольшим уровнем продукции фенилаланина выделили плазмиду, обозначенную pVEB62, которая кодировала ферменты со значительно большей устойчивости к ингибированию (Таблица 12).

Таблица 12

Ингибирование фенилаланином префенатдегидратазы и хоризматмутазы, кодируемой геном pheA из *E.coli* в составе плазмид pVEB24 и pVEB62 в клетках *C.glutamicum*

Фенилаланин, мМ	*Префенатдегидратаза, %		Хоризматмутаза, %	
	pVEB24	pVEB62	pVEB24	pVEB62
0	100	100	100	100
10	43	100	113	120
50	23	86	120	120

*Активность ферментов выражена в % от активности в отсутствие фенилаланина

Плазмида pVEB62 была введена в клетки продуцентов фенилаланина (электропорация), указанные в Таблице 13. У полученных трансформантов активность префенатдегидратазы и хоризматмутазы увеличилась в 27-100 и в 7-18 раз соответственно, однако продукция фенилаланина улучшилась, только у тех продуцентов, у которых данные ферменты не были десенсibilизированы к ингибированию фенилаланином (tyr-6 и Д28). У штамма 6-27 усиление данной ферментативной активности не повлияло на продукцию фенилаланина, а в случае штамма 47 (мутант штамма 6-27, обладающий повышенной устойчивостью к мФФ) даже несколько снизило продуктивность.

Полученные данные показывают, что превращение хоризмовой кислоты в фенилаланин у штамма 6-27 и его производных (47 и др.) не лимитирует продукцию фенилаланина, а лимитирует уровень синтеза хоризмовой кислоты

(см. рис.35). В случае штамма 6-27 и его более продуктивных производных, у которых десенсibilизирован первый ароматический фермент, ДАГФ-синтаза,

Таблица 13.

Влияние амплификации гена *pheA* из *E.coli* на ферментативную активность и продукцию фенилаланина штаммами *S.glutamicum*, продуцирующими фенилаланин

Штамм/плазмида	Ферментативная активность		Продукция фенилаланина, г/л
	Префенат-дегидратаза	Хоризмат-мутаза	
Д28	0,05	0,14	1,8
Д28/pVEB62	1,34	1,04	3,4
Tyr-6	0,02	0,06	2,9
Tyr-6/pVEB62	2,15	1,09	5,8
6-27	0,04	0,14	9,0
6-27/pVEB62	2,15	1,09	10,0
47	0,03	--	16,0
47/pVEB62	--	--	13,8

происходит накопление ДАГФ (см. выше). Этот факт указывает на недостаточную активность ферментов, оперирующих в промежутке от ДАГФ до хоризмата, где, очевидно, находится узкое место, лимитирующее продукцию фенилаланина полученными мутанта *S.g.* Следует также обратить внимание и реализовать возможность создание продуцента арогената, который может накапливаться в ферментационной среде в нейтральных и слабо щелочных условиях, не превращаясь в фенилаланин. Это превращение легко осуществляется неферментативно снижением рН среды уже после окончания ферментации. Арогенат, не являясь конечным продуктом, не оказывает ингибирующего действия на ферменты биосинтез ароматических аминокислот. Поэтому можно использовать только усиление экспрессии генов ароматического биосинтеза без

каких-либо регуляторных мутаций в структурных частях этих генов, которые, как правило, ухудшают ферментативную активность.

3.4.5. Мутация в гене *pheA* *S.glutamicum*, вызывающая десенсбилизацию префенадегидратазы к ингибированию фенилаланином

Определение нуклеотидной последовательности клонированного нами мутантного гена *pheA* проводили по модифицированному метода Сэнгера (см. Материалы и методы) с использованием дезоксинуклеотид-фосфатов и ДНК-полимеразы бактериофага T7. Для определения всей нуклеотидной последовательности гена *pheA* клонированный фрагмент разбивался на несколько частей. Фрагмент ДНК, содержащий ген *pheA* из штамма 6-27, находящийся на плазмиде pRJ627 (см. рис. 42), был обработан рестриктазами EcoRI, SalI, KpnI, BamHI, и образованные фрагменты были перенесены в соответствующие сайты плазмид pBluescript II KS(+) и pBluescript II SK(+). 98% последовательности ДНК вставки бы были определены по обеим цепям. Полученная нуклеотидная последовательность сопоставлялась с ранее известной нуклеотидной последовательностью этого ген [282]. При анализе нуклеотидной последовательности не обнаружено мутаций в регуляторной зоне, тогда как в структурной части гена *pheA* выявлены три нуклеотидные замены: C215 ->T, A258->G, T704->C. Только последняя нуклеотидная замена привела к аминокислотной замене: Ser235->Pro.

Как показали более поздние биоинформационные исследования Кунина с соавт., 1999 [283], эта мутация находится в универсальном регуляторном домене, названном авторами доменом АСТ. Название происходит от ферментов, у которых первоначально был обнаружен этот домен: аспартаткиназа, хоризматмутаза и префенатдегидратаза (TugA). Первоначально (1995 год) этот регуляторный домен был выявлен при рентгеноструктурном анализе фермента из кишечной палочки 3-фосфоглицератдегидрогеназы (ген *serA*) [284] чередованием

альфа- и бета спиралей : $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ протяженностью около 80 аминокислотных остатков. Два таких АСТ фрагмента на С-конце SerA образуют водородные связи с конечным продуктом – с серином, и в результате С-концы фермента оказывались связанными между собой. Ферментативной активностью обладает димер SerA, который образован из двух мономеров за счет связывания мономеров с N-концов (голова к голове). После связывания молекулы серина С-концевым АСТ-доменом происходит образование тетрамера (димера димеров), который теряет каталитическую активность. Сигнал о связывании серина вызывает конформационный сдвиг белковой структуры, и при этом увеличивается расстояние между центрами связывания двух субстратов :3-фосфоглицерата и NAD^+ , что препятствует окислению субстрата - 3-фосфоглицерата [285].

Мутация Ser235Pro, полученная нами в гене *pheA* *S.g.*, кодирующем префенатдегидратаза и сообщающую полную устойчивость к ингибированию фенилаланином, находится в структуре АСТ-домена. В 2008 году был проведен рентгеноструктурный анализ префенатдегидараз из двух видов бактерий: *Staph. aureus* и *Chlorobium tepidum* [286]. Как и в случае 3-фосфоглицератдегидрогеназы кишечной палочки оба фермента содержат С-концевые АСТ-домены, состоящие из структур $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$.

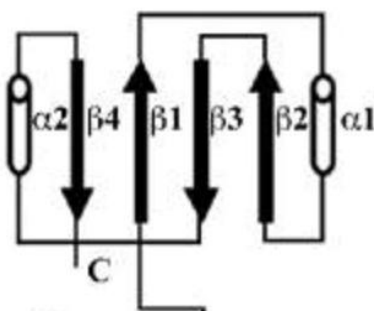


Рис. 44. Структура АСТ-домена префенатдегидратазы *St. aureus* [286].

Как видно из Рис.44 бета-цепи упакованы антипараллельно и образуют плотный лист, между ними расположены две альфа-спирали. Поскольку кристаллическая структура префенатдегидратазы *S.chlorobium* была получена в

присутствии фенилаланина, то некоторые аминокислотные остатки одного АСТ-домена, образуют связи с фенилаланином, в то же время как другие аминокислотные остатки второго домена также связаны с той же молекулой фенилаланина, которая располагается между двумя АСТ-домена разных молекул белка. Это связывание АСТ-доменов через фенилаланин создает

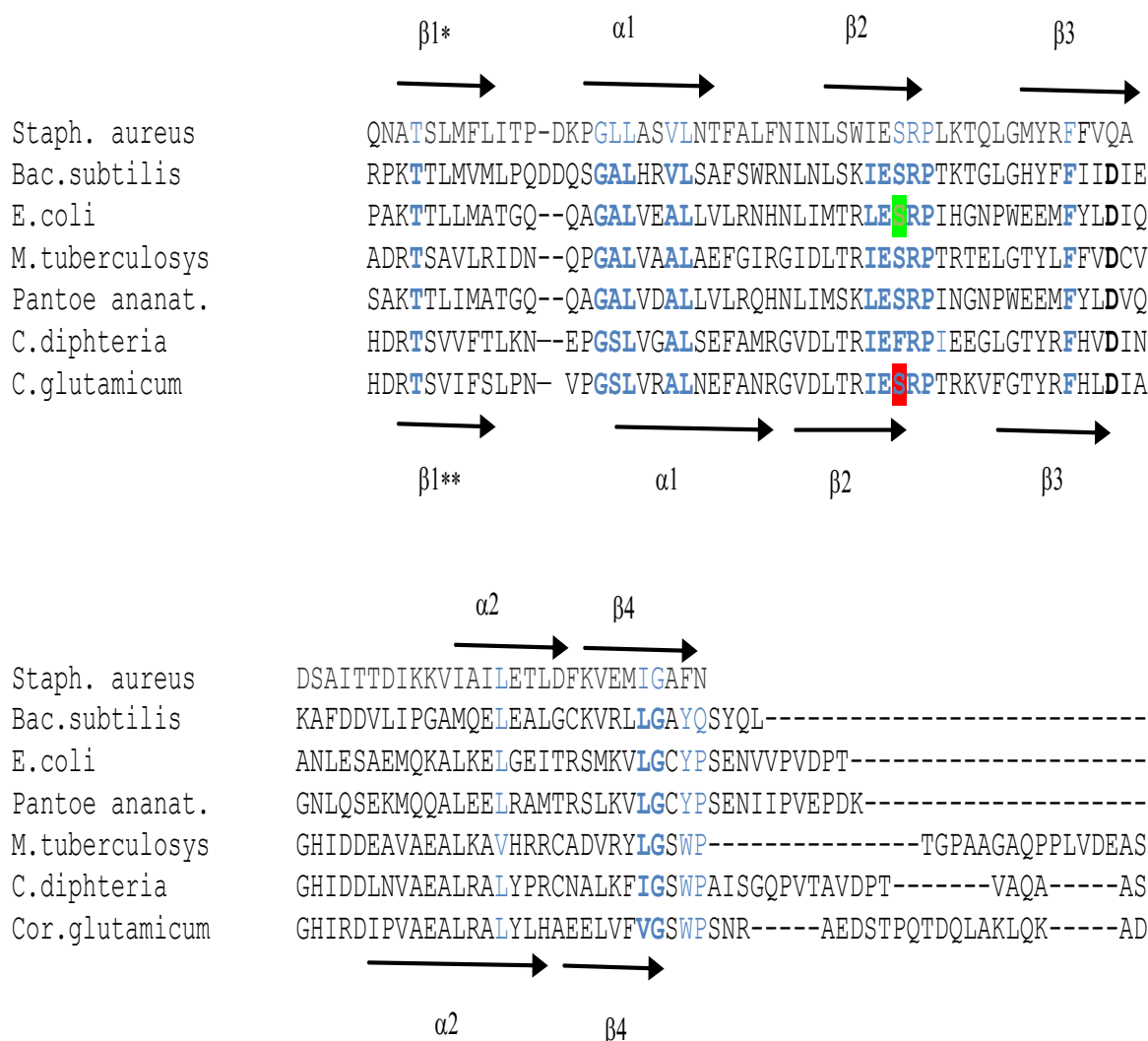


Рис.45. Сравнение последовательности аминокислот С-конца префенатдегидратазы из некоторых микроорганизмов. Красным шрифтом указана замена, обнаруженная в настоящей работе (штамм 6-27).

* Греческими буквами α и β обозначены участки альфа-спиралей и бета-цепей на основании рентгено-структурного анализа белка PheA из *S. aureus* (Kemin et al. 2008). **Указаны участки альфа-спиралей и бета-цепей белка PheA *C.glutamicum* ATCC13032 на основании проведенного нами анализа структуры с помощью Yaspin secondary structure prediction (Centre for integrative bioinformatics VU)

напряжение внутри белковых молекул, и это переводит каталитический центр в неактивное состояние. Оба фермента представлены тетрамерами, состоящими из

напряжение внутри белковых молекул, и это переводит каталитический центр в неактивное состояние. Оба фермента представлены тетрамерами, состоящими из параллельно расположенных мономеров.

Поскольку кристаллическая структура PheA из *S.g.* пока не установлена, мы наложили С-концевые последовательности ряда префенатдегидратаз (Рис.45). Из этого наложения (alignment) очевидна определенная гомология в некоторых консервативных участках и, в частности, в позиции 235, в которой нами обнаружена мутация. Используя доступные программы анализа структуры белка, мы показали, что С-концевой участок изучаемого белка имеет структуру $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, которая в точности соответствует установленной рентгеноструктурным анализом структуре этого белка из *St. aureus*. Таким образом, есть достаточные основания полагать, что С-конец префенатдегидратазы *S.glutamicum* представляет собой АСТ-домен, а мутация Ser235Pro расположена в структуре $\beta 2$, что должно искажать ее бета-структуру, препятствуя связыванию фенилаланина.

Интересно, что в продуценте фенилаланина, полученном на основе *E.coli*, введение сайт-специфическим мутагенезом мутации, приводящей к замене Ser330Pro (соответствует Ser235 в структуре этого белка *S.glutamicum*, выделено зеленым на рис.45), вызывало десенсибилизацию данного фермента к ингибированию фенилаланином [287]. Учитывая широкое распространение АСТ-доменом в структурах ферментов, подверженных ретроингибированию, а также в белках-репрессорах, по нашему мнению является целесообразным поиск в них АСТ последовательностей методами биоинформатики с целью внесения в них мутаций, нарушающих их структуру.

3.4.6. Дегградация фенилаланина клетками *C.glutamicum*

Известно, что некоторые микроорганизмы способны метаболизировать фенилаланин. В то же время, нам не удалось обнаружить какие-либо данные о дегградации фенилаланина клетками ГПКБ. Для того чтобы выбрать исходный штамм для получения эффективных продуцентов фенилаланина, важно знать, способны ли данные микроорганизмы дегградировать эту аминокислоту.

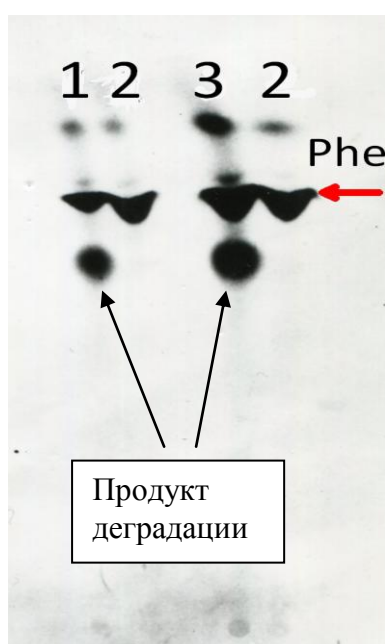
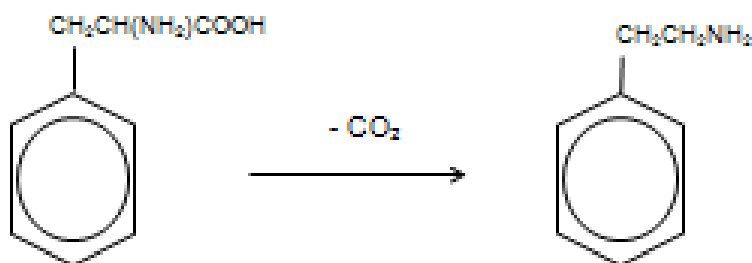


Рис.46. Радиоавтограф тонкослойной хроматограммы культуральной жидкости штаммов *C.glutamicum* ATCC 13032 (1), полученного от него тирозинового ауксотрофа *tyr-6* (2) и фенилаланинового ауксотрофа *pheA* (3). Использована минимальная среда Ф1 с добавлением C^{14} -фенилаланина (1 мг/мл).

Чтобы изучить дегградацию фенилаланина штамм дикого типа *C.glutamicum* ATCC 13032, а также полученные от него тирозиновые и фенилаланиновые ауксотрофы выращивали в минимальной ферментационной среде Ф1 в присутствии меченных по углероду (C^{14}) фенилаланина. При сравнении радиоавтографов пластинок для тонкослойной хроматографии после разделения веществ, находившихся в культуральной жидкости, видно, что штамм дикого типа, а также полученный от него ауксотрофный по фенилаланину мутант (*pheA*) образуют неидентифицированное вещество, содержащее радиоактивную метку, которое находится на хроматограмме ниже фенилаланина (рис. 46). В то же время, тирозиновый ауксотроф (*tyr-6*) утратил способность метаболизировать

фенилаланин с образованием этого вещества. Следует принять во внимание накопление немеченого фенилаланина штаммов tyr-6 (tyrA) и некоторое разбавление «холодным» фенилаланином радиоактивного фенилаланина. Это разбавление происходило приблизительно в 2,5 раза, так как штамм tyr-6 накапливает около 1,5 г/л фенилаланина, а радиоактивный фенилаланин вносился в среду в концентрации 1 г/л. Но, учитывая полное отсутствие этого продукта деградации фенилаланина в культуральной жидкости штамма tyr-6, а также то, что фенилаланиновый ауксотроф также продуцирует фенилаланин (0,3 г/л), но тем не менее деградирует экзогенный фенилаланин, мы связываем отсутствие продукта деградации фенилаланина у штамма tyr-6 с мутацией, блокирующей арогенатдегидрогеназу.

Вещество, образующееся из радиоактивного фенилаланина нами не идентифицировано. Соответствующее ему пятно на тонкослойной хроматограмме имеет желтоватую окраску, оно не окрашивается ни нингидрином, ни 2,4-динитрофенилгидразином, то есть не является ни аминокислотой (не является фенилпируватом). При обработке реактивом Паули пятно приобретает характерную оранжевую окраску, что говорит о наличии у него ароматического кольца со смещенной электронной плотностью. Таким веществом мог бы быть фенилэтиламин, который образуется в некоторых известных путях деградации фенилаланина путем декарбоксилирования последнего:



По-видимому, фермент арогенатдегидрогеназа из *S. glutamicum* способен не только декарбоксилировать арогенат, но и катализировать декарбоксилирование фенилаланина в сходной реакции. С точки зрения создания продуцентов

фенилаланина ауксотрофность по тирозину за счет блокирования арогенатдегидрогеназы представляется весьма полезным. Эта мутация, во-первых, приводит к накоплению арогената, при подкислении среды превращающегося в фенилаланин, а, во-вторых, блокирует деградацию накапливающегося фенилаланина.

Результаты данного исследования (раздел 4.4) опубликованы:

- Тюрин М.В., Ворошилова Э.Б., Ростова Ю.Г., Опарина Н.Ю., Гусятинер М.М. Электрический ответ внутренних мембранных структур клеток коринебактерий при электротрансформации. // Микробиология, 1998, Т. 67 (3), С. 338-344.
- Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Жданова Н.И., Нестеренко П.Н., Дегтярь В.Г., Бачина Т.А. Механизм продукции фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *C. glutamicum* // Биотехнология. 1989. т.5. №2. с.137-141.
- Gusyatiner M.M., Voroshilova E.B. Accumulation of tyrosine auxotrophic analog resistant mutants of *C. glutamicum* ATCC 13032// The first biennial conference of amino acid research (Kyoto). 1991
- Ростова Ю.Г. Ворошилова Э.Б., Клонирование гена *pheA*, кодирующего нечувствительную к ингибированию фенилаланином префенатдегидратазу *C. glutamicum* // Биотехнология. 1990. №1. с.9-11
- Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Жданова Н.И. Селекция и свойства продуцентов фенилаланина – мутантов штамма *C. glutamicum* ATCC 13032// Биотехнология. 1991. №1. с.15-19
- Voroshilova E.B., Rostova Y.G., Gusyatiner M.M., Zhdanova N.I. Overproduction of phenllalanine by tyrosine-auxotrophic analog resistant mutants of *Corynebacterlum glutamicum*. 6-th International symposium on the genetic of Industrial microorganisms// 6-Th International symposium on genetics of industrial microorganisms (Strassbourg). 1990
- Окороков А.Л., Буканов Н.О., Бескровная О.Ю., Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Грищенко В.Г., Янковский Н.К., Дебабов В.Г. Конструирование новых векторов для глутамат-продуцирующих бактерий. // Генетика, 1990, Т. 26. №4, С. 648-656.
- Толмачев О.Э., Гусятинер М.М. Потенциальные векторы для молекулярного клонирования в *Brevibacterium flavum*// Мол. ген. микробиол. вирусол. 1991. №11. с. 3- 8.

3.5. Изучение путей деградации треонина у *Escherichia coli*.

В культуральной жидкости плазмидных продуцентов треонина, полученных в институте ВНИИгенетика в период с 1978 по 1989 год в качестве основной примеси методом хроматографии с использованием нингидрина, дающего цветную реакцию с аминокислотами, обнаруживалась аминокислота глицин. Кроме того присутствовало желтое пятно неидентифицированного вещества. Подобную желтую окраску под действием нингидина дают соединения, содержащие аминогруппу, расположенную рядом с карбонилем $-\text{CO}-\text{CHNH}_2-$. Принимая во внимание исследование, проведенное на кишечной палочке [288], в котором показано, что продукт окисления треонина под действием треониндегидрогеназы (ТДГ), 2-амино-3-кетобутират (АКБ), спонтанно превращается в аминокетон, а также ферментативно под действием АКБ-лигазы – в глицин и ацетил-КоА (Рис. 47), мы предположили, что неидентифицированное желтое пятно свидетельствует о наличии аминокетона в культуральной жидкости.

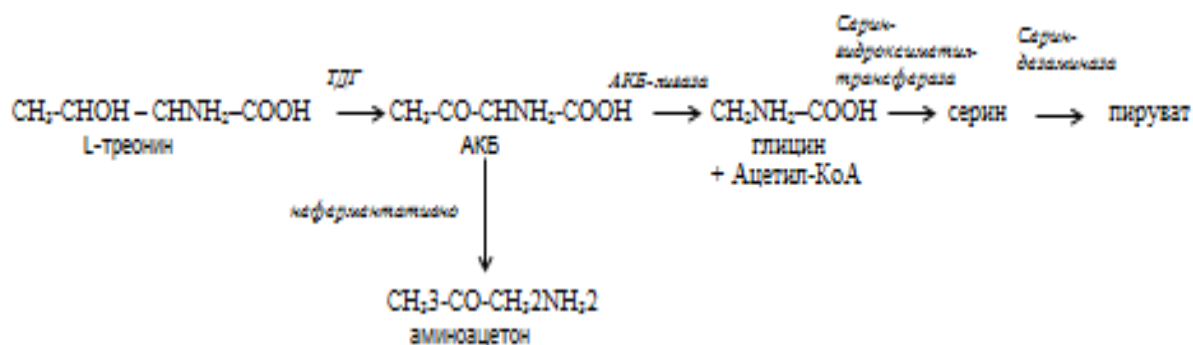


Рис. 47. Деградация треонина в кишечной палочке с участием треониндегидрогеназы.

Действительно, при обработке хроматограмм и культуральной жидкости реактивом Эрлиха, предназначенного для обнаружения аминокетона, возникало характерное малиновое окрашивание, свидетельствующее о присутствии этого

вещества. Кроме того, измерение активности ТДГ в клетках плазмидных продуцентов треонина показывало наличие высокой активности этого фермента.

3.5.1. Транспозонное блокирование гена *tdh*, кодирующего треониндегидрогеназу, и использование полученной мутации в улучшении плазмидных продуцентов треонина

Для предотвращения деградации треонина продуцентами треонина с участие ТДГ была предпринята попытка заблокировать ген, кодирующий ТДГ, в модельном штамме с помощью транспозонного мутагенеза и затем перенести полученную маркированную антибиотикорезистентностью мутацию в хромосому плазмидного продуцента треонина. В качестве родительского был выбран штамм *E.coli* ВКПМ В7, который ранее использовался в качестве родительского при получении плазмидных продуцентов треонина.

Было известно, что дикие штаммы *E.coli* не способны к росту на треонине в качестве источника углерода и/или азота, но сообщалось о мутантах, приобретших эту способность. Получив такой мутант, далее можно было бы от него отобрать мутанты, утратившие такую способность за счет блокирования активности ТДГ. Однако попытка использования полученных мутантов не привела к желаемому результату.

Кроме того, было ранее показано, что можно получить мутанты, усваивающие треонин в качестве источника глицина или серина, и у таких мутантов повышен уровень активности ТДГ. В связи с этим мы от штамма В7 получили мутант, у которого был блокирован синтез серина, но который мог расти в присутствии серина или глицина в виду взаимопревращения этих аминокислот под действием серинтрансгидроксиметилазы (СТГМ), кодируемой геном *glyA*. От *Ser⁻* штамма нитрозогуанидином были индуцированы мутации, которые эффективно использовали треонин в качестве источника серина. От одного из таких мутантов были получены под действием нитрозогуанидина 12 производных, которые

потеряли способность к росту на треонине в качестве источника серина. Как показали измерения активности ТДГ, все полученные мутанты сохранили активность ТДГ, но при этом они утратили способность усваивать глицин в качестве источника серина. Вероятно, у полученных мутантов была блокирована активность СТГМ.

В связи с описанными неудачными попытками заблокировать ТДГ было сочтено целесообразным использовать треонин в качестве источника только глицина, поскольку треонин превращается в глицин всего после двух биохимических стадий (см. Рис. 47) без участия СТГМ.

Для этого от штамма *E.coli* В7 с помощью нитрозогуанидина с последующим пенициллиновым обогащением был получен мутант В7-2 по гену *glyA* (отсутствовала активность СТГМ), нуждающийся только в глицине, от которого затем были отобраны спонтанные мутанты, образующие крупные колонии на минимальной среде с треонином в качестве источника глицина. Один из таких мутантов, В7-2-38 использовался далее для транспозонного (транспозон Tn5) мутагенеза с целью отбора мутантов, не усваивающих треонин в качестве источника глицина (см. Материалы и методы). В результате был отобран такой мутант, обозначенный И50 у которого отсутствовала активность ТДГ (Рис. 47). Инактивация гена, кодирующего ТДГ и обозначенного нами *tdh*, произошла, очевидно, в результате инсерции транспозона Tn5 в этот ген и сообщившая штамму устойчивость к канамицину.

Таблица 14

Отсутствие активности треониндегидрогеназы (ТДГ) у штамм И50.

Штамм	Генотип	Удельная активность ТДГ, ОП552/мин/ мг белка
В7	Tdh+	0,57
В-2-38	Tdh+ <i>glyA</i>	0,70
И50	<i>tdh::Tn5 glyA</i>	0,00

Как показано в Таблице 14 активность ТДГ полностью отсутствует у мутанта И50, тогда как она обнаруживается у исходного штамма. В то же время, активность АКБ-лигазы полностью сохранилась у штамма И50 (данные не приведены). Таким образом, инсерция транспозона Tn5 не вызвала нарушения экспрессии гена *kbl*, кодирующего структуру этого фермента. Этот результат не исключал возможного оперонного расположения генов *tdh* и *kbl*, если предполагать, что ген *kbl* расположен перед геном *tdh*. В настоящее время после определения нуклеотидной последовательности хромосомы кишечной палочки высказанное предположение подтвердилось: порядок генов в в этом опероне – *kbl*-*tdh*.

В хромосому лучшего в то время плазмидного продуцента треонина *E.coli* ВНИИГенетика 472-Т23 (Таблица 15) был передан с помощью общей трансдукции фагом P1 инактивированный инсерцией транспозона Tn5 ген *tdh* из штамма И50. В результате был создан новый штамм *E.coli* ВНИИГенетика ТДГ-6 (ВКПМ В-3420), который в отличие от всех штаммов-предшественников не накапливал в среде аминокетон. Накопление примесных аминокислот, в особенности глицина, также снизилось. Штамм ТДГ-6 более продуктивен, чем его родительский штамм, что очевидно обусловлено его неспособностью деградировать треонин путем, в котором участвует ТДГ (Таблица 16). Штамм ТДГ-6, как и предшествующие продуценты треонина (Таблица 15), содержит плазмиду pYN7, полученную на основе вектора pBR322 и несущую треониновый оперон из хромосомы штамма MG442. Эта плазида сообщает клеткам устойчивость к пенициллину, но не обладает достаточной стабильностью: значительная часть популяции в конце ферментации в промышленных ферментерах большого объема утрачивает плазмиду.

Для улучшения стабильности была сконструирована плазида VIC40 на основе вектора pAUC32, который содержит ген *par*, который контролирует передачу плазмид в дочерние клетки и является более стабильной без селективного давления антибиотиком (Табл. 15). Доля клеток, утративших

плазмиду VIC40 после окончания ферментации в ферментерах, составляет менее 1%.

Таблица 15.

Этапы конструирования плазмидных продуцентов треонина на основе E.coli K12

Штамм	Плазмида	Существенный генотип	Комментарий	Литература
E.coli K12		relA	Штамм К-12, ВКПМ В-2	
MG442		thrA^{ds} ilvA* relA+	Устойчивость к аналогу треонина (β-оксинорвалин)	Гусятинер и др., 1978.
VL334	pYN7	thrA ^{ds} ilvA* relA ⁺ amp^r	Введение плазмиды pYN7, несущей треониновый оперон из штамма MG442	Авт. св. СССР №875663 (1978). Патент США № 4278765 (1981)
M-1	pYN7	thrA ^{ds} ilvA* relA ⁺ amp^r	Отбор продуктивного клона	Авт. св. СССР № 943282 (1979), Патент США № 4321325 (1982)
472-T23	pYN7	thrA ^{ds} ilvA* relA ⁺ amp^r scr+ thr^r	Устойчивость к ингибированию треонином, усвоение сахарозы	Авт. св. СССР №974817 (1981). Патент США №5631157
ТДГ-6	pYN7	thrA ^{ds} ilvA* relA ⁺ amp^r scr+ thr^r tdh::Km^r	Трансдукция фагом P1 tdh::Tn5. Блокирование деградации треонина	Авт. св. СССР №1362021
640	pVIC40	thrA ^{ds} ilvA* relA ⁺ str^r scr+ thr^r tdh::Km^r	Замена плазмиды pYN7 в штамме ТДГ-6 на плазмиду VIC40. Улучшенная стабильность плазмиды.	Авт. св. СССР № 1694643 Патент США №5175107 (1992)

Таблица 16

Продукция треонина при ферментации в лабораторных ферментерах с автоматической подачей р-ра аммиака по датчику рН с использованием плазмидного продуцента 472 Т-23 и его производного ВНИИгенетика ТДГ-6 (ВКПМ В-3420)

Штамм	Состояние гена <i>tdh</i>	Накопление треонина, г/л	
		Ферментационная среда без дрожжевого экстракта. 48 часов	Ферментационная среда содержит 0,1% дрожжевого экстракта (Difco). 54 часа
472 Т-23	<i>tdh</i> ⁺	57,0	66,9
ТДГ-6	<i>tdh</i> ::Tn5	75,9	85,0

3.5.2. Генетическое картирование индуцированной транспозоном Tn5 мутации, блокирующей треониндегидрогеназу у *E.coli* К-12.

Ко времени окончания нашей работы по блокированию гена *tdh*, кодирующего треониндегидрогеназу у кишечной палочки, положение этого гена на генетической карте не было известно. При конструировании продуцентов на основе *E.coli* часто используется перенос генов из модельных штаммов в штамм-продуцент с помощью трансдукции фагом P1. Если учесть, что в дальнейшем предполагалось использовать блокирование гена этого без инсерции в него маркера устойчивости к антибиотикам, то в этом случае потребовалось бы использование какого-либо генетически сцепленного маркера для передачи инактивированного гена *tdh*. В связи с этой практической необходимостью было определено расположение гена *tdh* на генетической карте.

На первом этапе использовался метод конъюгации. Для этого методом общей трансдукции бактериофагом P1 была получена серия генетически маркированных Hfr штаммов (с различным положением начала переноса хромосомы и различными направлениями переноса: K10, KL16, KL14, KL25), в хромосомы которых была введена инсерция *tdh*::Tn5. В качестве штамма F- использовался

маркированный штамм АВ1157, чувствительный к канамицину, но устойчивый к стрептомицину. В результате ряда конъюгационных скрещиваний и анализа частоты передачи неселектируемых маркеров было показано, что инсерция транспозона Tn5 находится на участке хромосомы между 80-ой и 82-ой минутами генетической карты *E.coli* K12. При этом маркер канамицин-резистентности (*tdh::Tn5*) наследуется с частотой, близкой к частотам наследования генов *ху1*, *mtl* и *ругЕ*.

Для установления более точной локализации *tdh::Tn5* вначале был использован дефектный бактериофаг T4GT7, способный осуществлять общую трансдукцию, передающий фрагмент хромосомы до 4 мин карты. Лизат этого фага получали на штамме И50 (см. 4.5.1) и обрабатывали им маркированный штамм (*ху1*, *mtl*, *ругЕ*) с последующим отбором *Mtl*⁺ трансдуктантов, анализ которых показал, что инсерция *tdh::Tn5* наиболее тесно сцеплена с маркером *mtl*, а также то, что *tdh::Tn5* находится между маркерами *mtl* и *ругЕ*.

Более детальное картирование проводилось с помощью трансдукций фагом P1 с использованием маркера *gpsA* (потребность в фосфоглицерине), расположенного на карте между *mtl* и *ругЕ*. Коэффициент котрансдукции генов *gpsA* и *tdh::Tn5* составлял 0,6-0,8, а анализ наследования неселективных маркеров показал, что ген *tdh* расположен между генами *gpsA* (81,1 мин) и *ругЕ* (81,7 мин), ближе к *gpsA*. Расчет по формуле Ву (Wu, 1966) показывает, что ген *tdh* локализуется на 81,2 мин карты *E. coli* K12. Проведенное нами картирование подробно описано (Генетика, т. 23, стр. 2120-2127, 1987). Позднее секвенирование генома *E.coli* K12 полностью подтвердило полученные нами результаты генетического картирования.

3.5.3. Поиск ферментов, участвующих в деградации треонина в клетках *E.coli* K12.

Анализ полученных данных приводил к предположению, что в деградации треонина в клетках *E.coli*, участвует не только путь, в котором первый этап катализируется треониндегидрогеназой и приводящий к накоплению в среде аминокетона и глицина, но и другой путь, который приводит к образованию только глицина. На такую возможность указывало следующее. При отборе мутантов, утративших способность использовать серин в качестве источника треонина, нам не удалось обнаружить мутантов по первому этапу пути деградации, изображенному на Рис. 47. Из четырех стадий превращения треонина в серин у всех полученных мутантов с нарушенной деградацией треонина с применением пенициллинового обогащения оказался блокирован только последний этап – превращение глицина в серин (СТГМ, ген *glyA*). Этот факт можно объяснить тем, что участок пути деградации от треонина до глицина шунтирован. С другой стороны, при использовании штамма с блокированной СТГМ (*glyA*) удалось отобрать мутант с инсерционной инактивацией гена *tdh*. Это наводит на мысль, что СТГМ способна превращать треонин в непосредственно в глицин без участия ТДГ. Действительно, в литературе имеются данные о способности очищенного препарата СТГМ из кишечной палочки катализировать реакцию распада треонина на глицин и ацетальдегид. Вероятно, это связано со сходством треонина и серина в качестве субстратов и образующихся продуктов реакций (ацетальдегид и формальдегид). В связи со сказанным было предположено, что реакцию образования глицина (и ацетальдегида) катализирует СТГМ в качестве побочной (наряду с главной) ферментативной активностью.

Для проверки данной гипотезы были получены два штамма, производные от штамма В7, у которых блокирован ген *glyA* и нуждающихся в глицине (но не в серине, см.). Штамм В7-2 получен под воздействием нитрозогуанидина с

последующим пенициллиновым обогащением, а штамм В7 glyA::Tn5 получен переносом инсерции glyA::Tn5 трансдукцией бактериофагом из музейного штамма E.coli W3110 glyA::Tn5 из коллекции ВКПМ. Клетки штаммов выращивали на минимальной среде М9 с добавлением глицина (0,1 г/л) в течение ночи при 37°C, разрушали ультразвуком. Белковый препарат использовали для определения в нем треонинальдолазной (ТА) активности (образование уксусного альдегида из треонина) и активности СТГМ по способности переносить С1 соединения на молекулу глицина (см. Материалы и методы). Как видно из приведенных данных (Таблица 17) у штамма дикого типа, выращенного на минимальной среде М9, обнаруживаются обе ферментативные активности. Они также присутствуют в клетках, выращенных на полноценной среде (L-бульон), но их значения в 3-5 раза ниже, чем в клетках, выросших на минимальной среде (данные не приведены). Безотносительно к тому, каким методом блокирован ген glyA, ферментативная активность как СТГМ, так и ТА отсутствует (или снижена до уровня чувствительности метода их измерения) в клетках обоих мутантов. Рассмотренные данные показывают, что у штамма E.coli K12 активность ТА обусловлена ферментом СТГМ, кодируемого геном glyA, и, следовательно, нет специального гена для ТА, экспрессируемого в аэробных условиях при росте на минимальной среде с глюкозой (М9) или полноценной среде.

Таблица 17.

Активность серингидроксиметилтрансферазы (СТГМ) и треонинальдолазы (ТА) у штамма E.coli В7 дикого типа и его мутантов по гену glyA (В7-2 и В7 glyA::Tn5)

Тип ферментативной активности	Активность, нмоль/мин/мг белка		
	В7 glyA ⁺	В7 glyA::Tn5	В7-2 glyA ⁻
СТГМ	37±3	3,0±3	0,0±2
ТА	9,1±0,6	0,0±1	0,9±0,5

Эти данные объясняют полученные ранее результаты. Мутанты по треониндегидрогеназе практически невозможно было отобрать, используя треонин в качестве источника серина, поскольку имеется два пути превращения треонина в серин: треониндегидрогеназный и треонинальдолазный, причем оба пути вначале приводят к глицину (Рис.48). Но имеется лишь один фермент

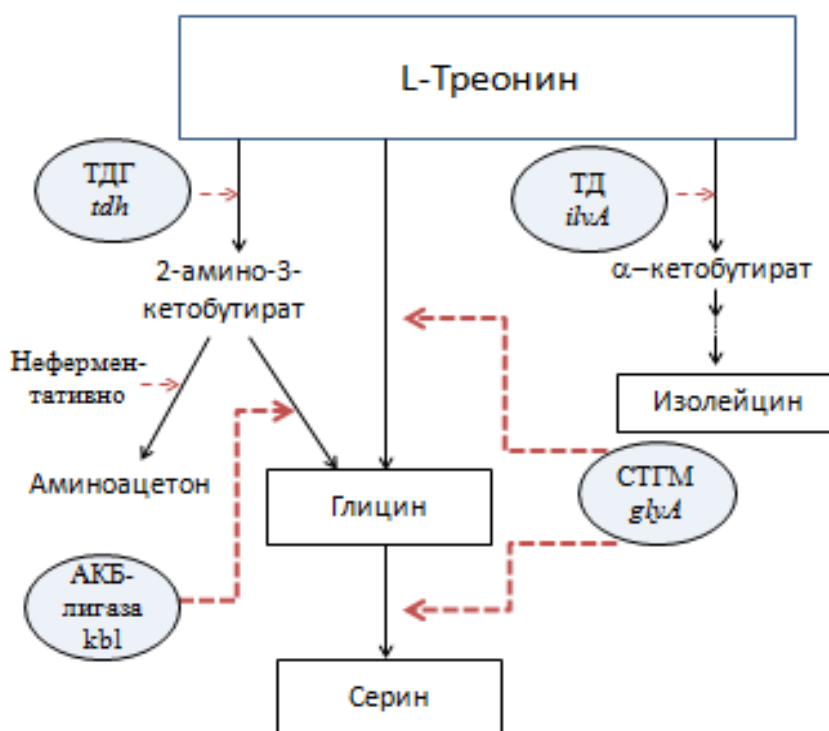


Рис. 48. Пути деградации треонина у *E.coli* K12

превращающий глицин в серин – СТГМ (ген *glyA*). Естественно, мутации по гену *glyA* (вместо *tdh*) и были отобраны. С другой стороны, при использовании для селекции штамма с заблокированной СТГМ (*glyA*⁻) путь деградации до глицина не был шунтирован, и это обстоятельство предоставляло возможность отбора мутантов по гену *tdh*.

3.5.4. Вклад трех путей метаболизации треонина в деградацию треонина клетками *E.coli* K12.

Как показано выше, биодegradация треонина в клетках кишечной палочки осуществляется двумя путями. Кроме того, треонин является предшественником изолейцина в пути биосинтеза этой аминокислоты, в котором треониндезаминаза (ТД) является тем ферментом, субстратом которого является непосредственно треонин. Таким образом, три фермента атакуют треонин: ТД (*ilvA*), ТДГ (*tdh*) и СТГМ (*glyA*). С точки зрения создания продуцентов треонина и в определенной степени изолейцина важно было оценить вклад каждого из упомянутых ферментов в потребление треонина из внешней среды. На рис. 49 показан рост (ОП₅₄₀) клеток штамма *E.coli* K12 дикого типа и потребление треонина, добавленного (1,5 г/л) в минимальную глюкозную среду. В этом эксперименте в потреблении треонина могли участвовать все три фермента. Как видно из графиков, после 6 часов интенсивного роста накопление биомассы прекращается в связи с полным расходом глюкозы. Потребление треонина имеет место только во время роста культуры и полностью прекращается при остановке роста культуры. Подобная динамика потребления треонина показана и для других штаммов, которые различаются по скорости роста и потребления треонина (данные не приведены).

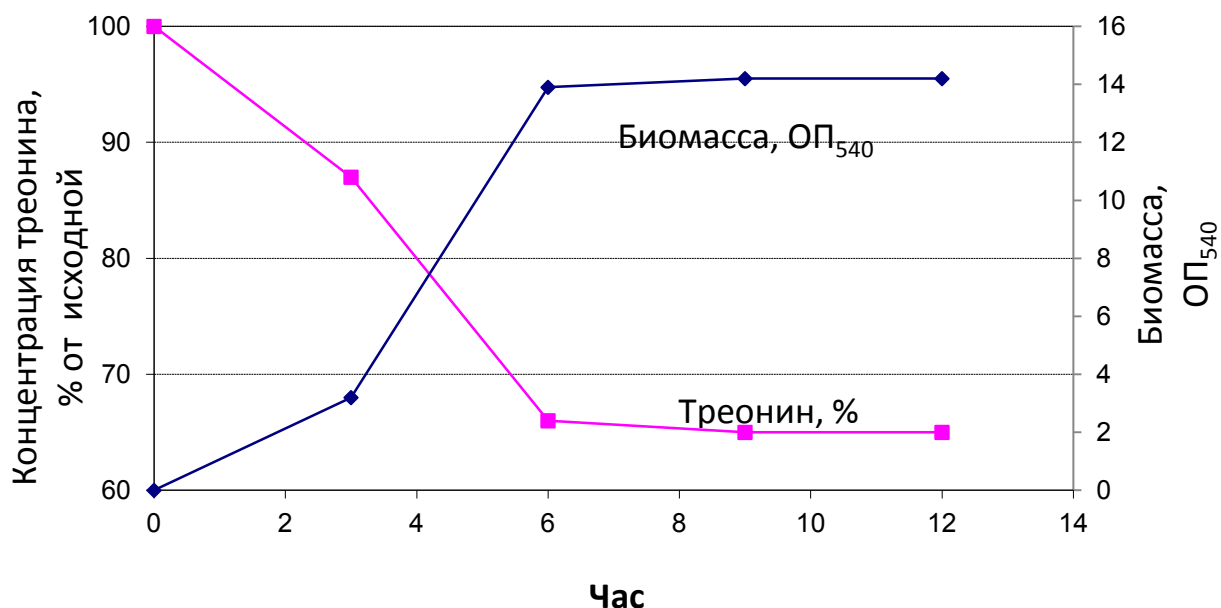


Рис. 49. Рост (ОП₅₄₀) и потребление треонина (% от исходного количества 1,5 г/л) штаммом дикого типа *E.coli* ВКПМ В7.

Для изучения вклада всех трех путей метаболизации треонина на основе одного штамма дикого типа (В7) были сконструированы производные этого штамма, различающиеся аллельными состояниями генов *tdh* и *glyA*, которые контролируют синтез ферментов, субстратом для которых является треонин. У штамма В7 *tdh::Tn5* активность ТДГ отсутствует в результате инсерции транспозона Tn5. В штамме В7-*glyA::Tn5* – инсерцией транспозона Tn5 блокирована СТГМ (нуждается в глицине, но не в серине). У штамма В7-1 блокированы оба эти ферменты: ТДГ – инсерцией транспозона Tn5, а СТГМ блокирована индуцированной нитрозогуанидином мутацией. Что касается ТД, то известно, что активность этого фермента полностью подавляется изолейцином, что позволяет оценить вклад всех трех ферментов, метаболизирующих треонин, добавляя или не добавляя изолейцин в среду. Штаммы выращивали в глюкозо-минеральной среде (М9), в которую добавлен треонин в концентрации 1500 мкг/мл, в течение 6 - 8 часов до остановки роста. Определяли уменьшение

концентрации треонина в расчете на единицу оптической плотности суспензии бактерий (удельное потребление треонина в табл. 18).

Таблица 18

Влияние инактиваций ТДГ (tdh), СТГМ (glyA) и ТД (ilvA) на удельное потребление треонина из среды роста

Штамм	Аллельное состояние генов		Изолейцин (300 мг/л)	Удельное потребление треонина*
	tdh	glyA		
B7	+	-	-	38,8
			+	17,5
B7 tdh::Tn5	-	+	-	29,3
			+	10,4
B7 glyA::Tn5	+	-	-	26,9
			+	8,6
B7-1	-	-	-	16,5
			+	1,9

*Треонин в конц. 1,5 мг/мл добавлен в среду. Удельное потребления треонина выражена в мкг/мл/ОП₅₄₀

Присутствие изолейцина наиболее значительно снижало потребление треонина из среды. Очевидно, что поглощенный из среды треонин лишь частично превращается в конечный продукт – изолейцин. Основная масса треонина дезамируется с образованием альфа-кетомасляной кислоты, которая каким-то образом метаболизируется клетками. Этот вопрос не изучался в настоящем исследовании. Можно лишь предположить, что альфа-кетомасляная трансаминируется с образованием альфа-аминомасляной кислоты, которая не являясь протеиногенной, выделяется из клеток и накапливается в среде.

Блокирование ТДГ (ген tdh) или СТГМ (ген glyA) приводит к приблизительно равному снижению потребления треонина как на фоне

изолейцина, так и в его отсутствие. При блокировании всех трех путей метаболизма треонина (добавлен изолейцин, блокированы ТДГ и СТГМ) потребление этой аминокислоты из среды минимальное.

Отметим, что при реверсии мутации в гене *glyA* (нетранспозонной) потребление треонина клетками ревертантов возросло (данные не приведены), что подтверждает роль СТГМ в метаболизме треонина.

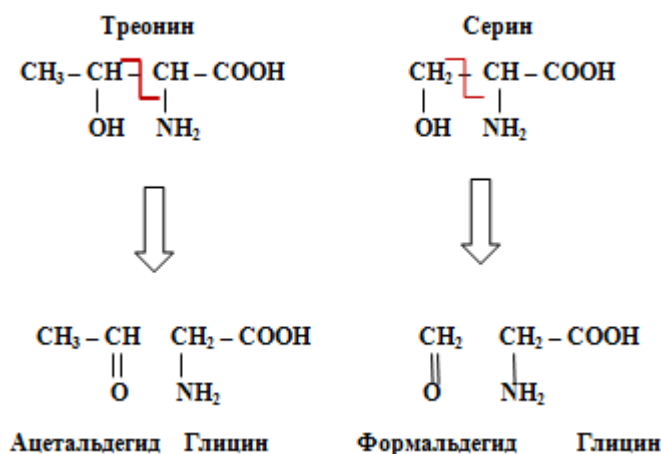


Рис.50. Распад треонина и серина под действием серинтрансгидроксиметилазы

Действительно, в реакции превращения серина в глицин (Рис.50), которую катализирует СТГМ, происходит разрыв связи между вторым и третьим атомами углерода с образованием глицина и формальдегида (C1-соединения). Молекула треонина, являясь структурным аналогом серина (гомологом), разрывается также между вторым и третьим атомом, образуя глицин и уксусный альдегид (C2-соединение). Полученные нами данные об участии СТГМ в потреблении треонина из среды свидетельствуют в пользу высказанного утверждения.

Подводя итог изучению метаболита (деградации) треонина клетками *E.coli* отметим следующее. С помощью транспозонного мутагенеза блокирован ген, кодирующий ТДГ. Перенос мутантного гена, маркированного устойчивостью к канамицину в хромосому плазмидного продуцента, привел к усилению продукции треонина и к прекращению накопления аминокетона в среде. Лицензия на

получение треонина с помощью полученного продуцента продана японской биотехнологической компании Аджиномото для производства треонина на заводах, принадлежащих этой компании.

Основная часть материала, касающегося генетического контроля деградации треонина у *E.coli* и продуцентов треонина, опубликована:

- Шакалис И.О., Гусятинер М.М. Индуцированные транспозоном Tn5 мутации, блокирующие треониндегидрогеназу у *E.coli* K-12 // Тез. VII съезда ВМО. Алма-Ата, 1985. Т.3. С.75.
- Шакалис И.О. Гусятинер М.М. Картирование мутации по гену треониндегидрогеназы (*tdh*), индуцированной транспозоном Tn5, у *E.coli* K-12 // Генетика и биохимия микроорганизмов – биотехнология (тез. докл.). М., Мир, 1986. С.436.
- Шакалис И.О., Гусятинер М.М., Жданова Н.И. Генетическое картирование индуцированной транспозоном Tn5 мутации, блокирующей треониндегидрогеназу у *Escherichia coli* K-12 // Генетика. 1986. Т. XXIII. №12. С.2120-2127.
- Шакалис И.О., Гусятинер М.М. Локализация гена *tdh*, кодирующего треониндегидрогеназу, на генетической карте *E.coli* K-12// Биотехнология. 1987. Т.3. №5. С.564
- Gusyatiner M.M., Shakalis I.O. Genetic mapping of a transposon Tn5 induced mutation affecting threonine dehydrogenase of *E.coli* K-12// Abstr. Second Int. Symp. OMP. Ceske Budejovice. 1988.
- Шакалис И.О., Гусятинер М.М. Треонинальдолазная активность в клетках *E.coli* K-12: отсутствие активности у мутантов *GlyA* // Биотехнология. 1989. т.5. №2. С.155-156.
- Шакалис И.О., Гусятинер М.М. Участие треониндегидрогеназы, треониндезаминазы и серинтрансгидроксиметилазы в деградации треонина в клетках *E.coli* K-12//Биотехнология. 1990. №2. с.16-17.
- Гусятинер М.М. и др. Штамм бактерии *E.coli* ВКПМ В-3420 – продуцент L-треонина // Авт. св. СССР №1362021. 1986.
- Дебабов В.Г. и др. Штамм бактерии *E.coli* – продуцент L-треонина // Авт. св. СССР №1694643, 1987.
- Debabov et al. Bacterial strain of *Escherichia coli* ВКПМ В-3996 as a producer of threonine // United States patents: № 5,175,107. 1992.; № 5,538,873. 1996; № 5,705,371. 1998; № 5,976,843. 1999; № 6,165,756. 2000

3.6. Исследование пути биосинтеза цистеина у *Escherichia coli* с точки зрения создания продуцентов этой аминокислоты

3-Фосфоглицерат – точка ответвления гликолитического потока углерода в сторону серина и далее цистеина (рис.51). Этот поток – один из главных в метаболизме бактерий, через который проходит 15% углерода при росте на сахарах, причем только 6% идет на серин для включения его в белки [289]. На основе углеродного скелета серина синтезируется цистеин и глицин, и в ходе синтеза последнего отщепляются одноуглеродные фрагменты (C1). Серин также является составной частью молекулы триптофана. Глицин в свою очередь - не только компонент белков, но и структурный элемент пуриновых нуклеотидов. Расщепление глицина дает дополнительное количество C1-соединений, которые идут на синтез компонентов ДНК (пурины, тимидин) и на её метилирование.

Дерегуляция этого потока важна при получении микробных продуцентов не только серина и цистеина, а также глицина, метионина и триптофана. Она важна и для продуцентов нуклеотидов и вообще всех метаболитов, в состав которых включаются C1 фрагменты. Путь имеет две точки регуляции конечными продуктами: 3-фосфоглицератдегидрогеназу (ФГД, ингибитор серин) и О-ацетилсеринсинтазу (ОАС, ингибитор цистеин). Если ингибирование ФГД серином тщательно изучено, и известны мутации, вызывающие десенсибилизацию к ингибированию, то другая особенность ФГД – способность восстанавливать 2-кетоглутаровую кислоту (2-КГ) с образованием 2-гидроксиглутаровой кислоты (2-ГГ), приводила к неоправданной с точки зрения получения, например, цистеина, побочной продукции 2-ГГ и снижению выхода цистеина.

В имеющейся литературе оказалось достаточно данных, чтобы высказать гипотезу о природе и значении продукции 2-ГГ и наметить пути устранения этого недостатка продуцентов цистеина на основе *Escherichia coli* и *Pantoea ananatis*.

Значение предложенной гипотезы выходит за пределы чисто практических задач и имеет общебиологическое значение.

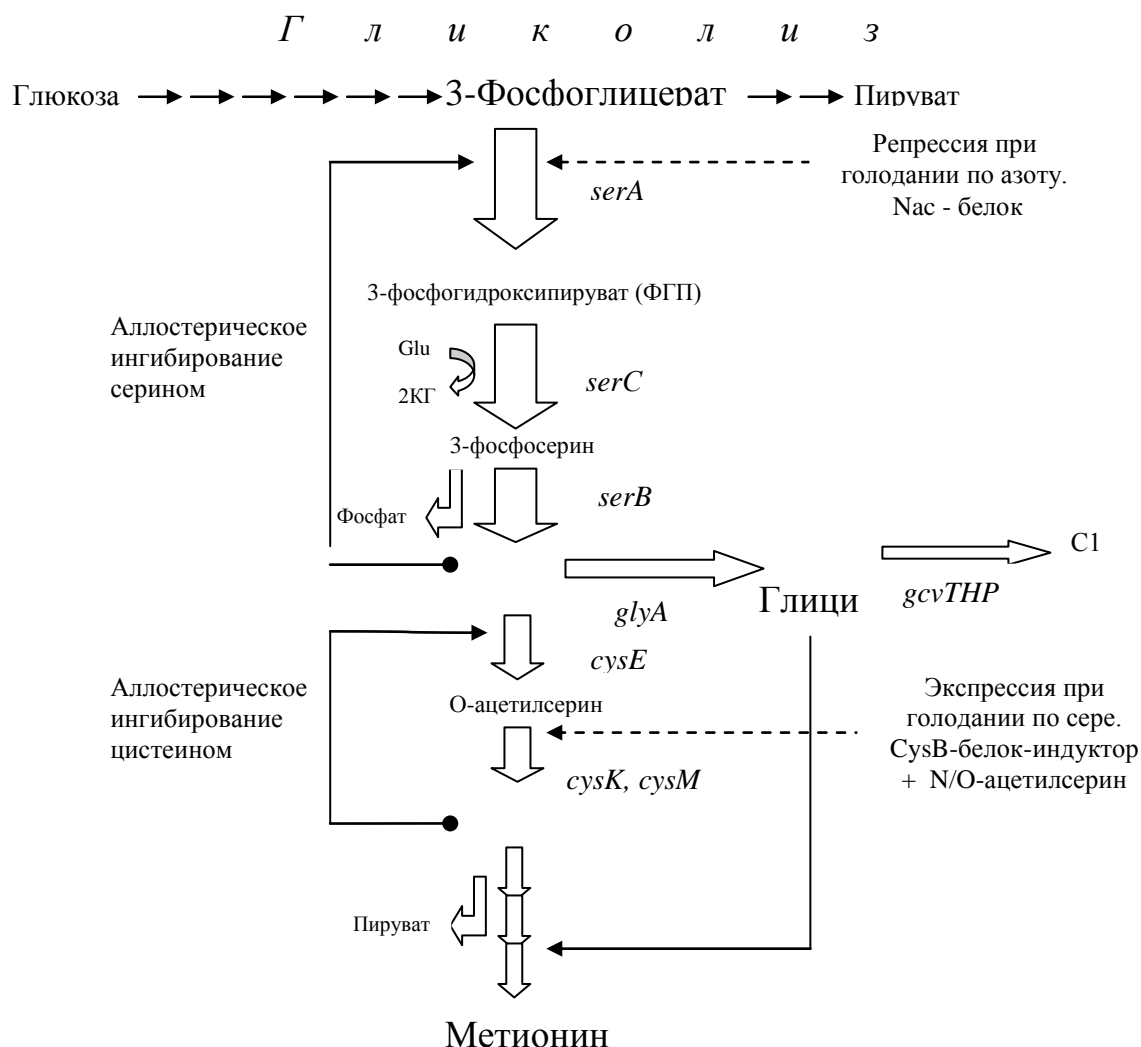


Рис. 51. Регуляция потока углерода в сериновом пути у *E.coli*

Потребность в цистеине также не ограничивается включением цистеина в состав белков. В ходе его синтеза из серина происходит включение атома серы и цистеин становится ее донором в синтезе метионина, сам при этом превращается в пируват, который поступает в центральный метаболизм.

Поток углерода, 3-фосфоглицерата (ФГ) в направлении серина, должен быть хорошо отрегулированным в соответствии с разнообразными потребностями клеток при росте на углеводах. Интенсивность данного потока и его

распределения определяется как уровнем экспрессии соответствующих генов, так и ингибированием активности узловых ферментов серином и цистеином. Так как С1-соединения и глицин необходимы для синтеза богатых азотом нуклеиновых оснований, то существуют механизмы ограничения потока в сторону серина при дефиците доступного источника азота – аммиака. Одним из сигналов этого дефицита служит снижение внутриклеточной концентрации глутамина – главного продукта ассимиляции аммиака в клетках *E.coli*. Этот сигнал вызывает активацию транскрипционного регулятора NtrC, который, получив этот сигнал через систему азотной регуляции, приобретает способность активировать σ 54-зависимый промотор гена *nac*. Белок Nac, также как и NtrC являясь транскрипционным регулятором, связывается с промоторной областью гена *serA*, вызывая трехкратное снижение уровня экспрессии этого гена [290, 291]. Nac-белок, подобно белку CysB (см. ниже), относится к транскрипционным регуляторам семейства LysR и обычно выступает в роли активатора транскрипции нескольких оперонов, важных в условиях лимитации по азоту, и только в данном случае он является репрессором.

Азотная регуляция осуществляется также и на уровне ферментативной активности. Сигналом о дефиците восстановленного азота служит снижение пула глутаминовой кислоты, которая образуется путем переноса аминогрупп с глутамина, первичного акцептора азота, на 2-КГ, образующийся в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). Снижение уровня глутаминовой кислоты тормозит аминирование 3-фосфофогидроксипирувата (ФГП) под действием второго фермента серинового пути, 3-фосфосериаминотрансферазы. В сериновом пути образуются значительные количества 2-КГ из глутаминовой кислоты, учитывая, что 15% потока углерода проходит по этому пути.

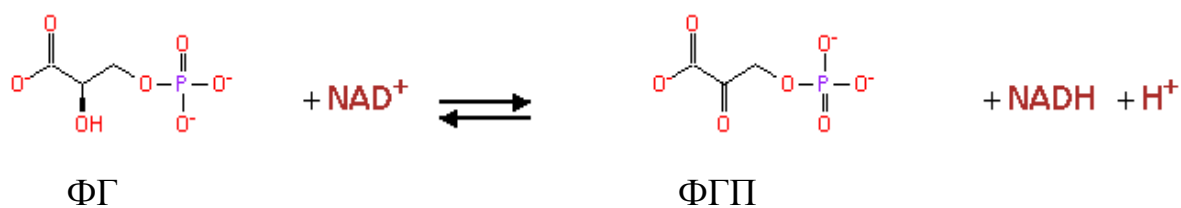
Степень доступности восстановленной формы серы (S^{2-}) также влияет на интенсивность рассматриваемого потока углерода. При её дефиците транскрипционный регулятор CysB (Рис. 51) индуцирует экспрессию генов *cysK* и *cysM*, кодирующих изоферментные цистеинсинтазы (этап включения S^{2-} или

тиосульфат-иона) в углеродный скелет цистеина. Сигналом служит накопление в клетке *O*-ацетилсерина и, особенно, *N*-ацетилсерина (продукт спонтанной необратимой изомеризации *O*-ацетилсерина) в отсутствие сульфида или тиосульфат-иона. CysB связывается с одним из своих индукторов (*O*- или *N*-ацетилсерином) и переходит в активное состояние для связывания с промоторными областями генов *cysK* и *cysM* и индуцирует экспрессию этих генов [292, 293].

При избыточном уровне восстановленной серы в клетке прекращается индукция экспрессии генов *cysK* и *cysM*, и, кроме того, цистеин ингибирует превращение серина в *O*-ацетилсерин, подавляя ОАС (ген *cysE*), весьма чувствительной к ретроингибированию цистеином.

3.6.1. Регуляция активности 3-фосфоглицератдегидрогеназы *E.coli*

3-Фосфоглицератдегидрогеназа (ФГД, ЕС 2.6.1.52) катализирует первую реакцию в пути биосинтеза серина из интермедиата гликолиза, 3-фосфоглицерата (ФГ), NAD^+ -зависимое окисление ФГ с образованием ФГП:



Активность ФГД ингибируется серином и частично глицином, тогда как ингибирования цистеином не обнаружено [289, 294 – 297]. Аллостерические свойства ФГД из кишечной палочки изучаются с 60-х годов по настоящее время. Возможно, это самый изученный аллостерический фермент, во многом модельный при изучении аллостерического ингибирования других ферментов. Очищенный препарат фермента ингибируется L-серином ($I_{50} = 0,044\text{мМ}$) неконкурентно по отношению к субстрату, ингибирование типа V_{max} (подавляется каталитическая активность при сохранении K_m). При низких концентрациях серина проявляется положительная кооперативность, но при

больших концентрациях серина обнаруживается уже негативная кооперативность по ингибитору [294, 298].

ФГД представляет собой тетрамер из идентичных субъединиц, каждая из которых содержит по одному каталитическому и аллостерическому сайту (Рис. 52). Мономер состоит из трех доменов: субстрат-связывающий (S), нуклеотид-связывающий (N) и регуляторный серин-связывающий домен (R) (в направлении от N- к С-концу мономера) [299-301].

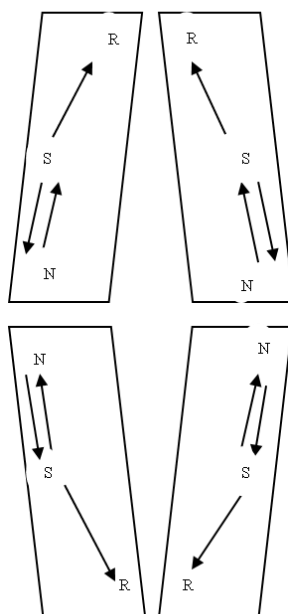


Рис.52. Схема структуры тетрамера ФГД по Г. Гранту, 2012 [301]

Как показало рентгеноструктурное исследование, связывание серина приводит к изменению конформации в районе аллостерического центра, которое передается каталитическому центру [302-303]. Сочетание сайт-специфического мутагенеза с рентгеноструктурным анализом пролило свет на механизм передачи сигнала от аллостерического центра к каталитическому и на природу кооперативности ингибирования серином [304-305]. Связывание серина субъединицей тетрамера, вызывает полную утрату каталитической активности этой субъединицы и

одновременно снижает на треть каталитическую активность остальных трех субъединиц, не связавших серин.

3.6.2. Каталитические свойства 3-фосфоглицератдегидрогеназы *E.coli*.

Равновесие реакции, катализируемой ФГД и определяющей интенсивность всего потока превращения ФГ в направлении серина, сильно смещено влево [294-296]. Скорость прямой реакции в 70 раз ниже скорости обратной реакции. Константа равновесия в условиях, максимально приближенных к физиологическим (рН, температура, ионная сила, конц. иона магния), представляющая собой

$$K_{\text{равн.}} = \frac{[\sum \Phi Г П] \times [\sum NADH]}{[\sum \Phi Г] \times [\sum NAD^+]},$$

приблизительно равна 3×10^{-6} (38°C, рН 7,0), что соответствует изменению стандартной свободной энергии $\Delta G^{\circ} = +74,2$ кДж/моль (знак Σ означает здесь сумму всех форм данного вещества в растворе) [306]. Равновесие следующей реакции в сериновом пути - трансаминирование ФГП с участием глутаминовой кислоты как донора аминогрупп, смещено вправо ($K_{\text{равн.}} = 133$, $\Delta G^{\circ} = -12,5$ кДж/моль). Тем не менее сумма ΔG° двух этих реакций остается положительной. Очевидно, что протекание всей последовательности превращений от ФГ до серина возможно лишь за счет практически необратимой третьей реакции, на которой происходит освобождение фосфата с участием фосфатазы (продукт гена *serB*).

В связи с низкой скоростью прямой реакции и близостью равновесия каталитические свойства ФГД изучают по обратной реакции с использованием 2-КГ в качестве субстрата вместо ФГП. Чтобы продемонстрировать реакцию в прямом направлении в реакционную смесь вносят гидразин для того, чтобы

связать продукт прямой реакции, ФГП, для торможения реакции восстановления ФГП обратно в ФГ [294, 301].

К удивлению исследователей случайно выяснилось, что ФГД может не только окислять ФГ, восстанавливая при этом NAD^+ до NADH , но и восстанавливать 2-КГ до двух стереоизомерных гидроксикислот (L-2- и D-2-гидроксиглутаровой, далее L-2-ГГ и D-2-ГГ или 2-ГГ, имея в виду оба изомера), окисляя NADH до NAD^+ [298]. Оказалось, что L-серин, аллостерический ингибитор ФГД в равной степени ингибирует как главную биосинтетическую реакцию, так и «нефизиологическую» (NADH -зависимое восстановление 2-КГ). Позднее обнаружилось, что оба субстрата связываются одним и тем же активным центром [303]. В связи с этим представлялось, что чем выше концентрация 2-КГ в клетке, тем большая доля молекул ФГД должна быть загружена этим субстратом в ущерб биосинтетической «главной» реакции окисления ФГ, а 2-КГ рассматривался как конкурентный ингибитор [307].

В чем же физиологический смысл этой «вторичной» каталитической активности, которая, как полагают, не благоприятствует протеканию реакции в биосинтетическом направлении, принимая во внимание также тот факт, что равновесие «главной» реакции сильно смещено влево?

Считая 2-КГ «нефизиологическим» субстратом, единственный физиологический смысл в восстановлении 2-КГ находят в том, что образующийся при этом NAD^+ полезен клеткам кишечной палочки при дефиците кислорода [298]. В целом же роль второй ферментативной активности ФГД остается неясной и до сих пор, как и не ясна судьба образующихся в ходе реакции двух изомерных гидроксикислот, 2-ГГ. Уже в ранних исследованиях ФГД отмечалось, что препараты ФГД из *E.coli*, даже после трехкратной кристаллизации содержат пиридиновые нуклеотиды [295]. Диализованные препараты фермента содержат приблизительно по две молекулы связанного с белком NADH , и каждая молекула фермента в виде тетрамера могла связать дополнительно еще две молекулы NADH [308]. Оказалось, что сродство фермента к NADH настолько велико, что

определить K_m для NADH (в обратной реакции) не удалось в обычных экспериментах в стационарных условиях эксперимента, поскольку необходимо настолько снизить концентрацию NADH, что изменения концентрации NADH не регистрируются оптическими методами (OP_{340}). Есть лишь оценка этой величины – менее 10 нМ, но реальная цифра, вероятно, гораздо меньше [301]. Связывание NADH с чистым препаратом ФГД можно наблюдать по изменению флюоресценции, вызванного взаимодействием одного из триптофановых остатков белка ФГД с NADH, который приходит в тесный контакт после связывания NADH. Этим методом (FRET) удалось оценить константу диссоциации ферментного комплекса E-NADH. Показано, что после связывания NADH происходит медленное изменение конформации белка, которое и определяет скорость всей реакции [309]. Изменение конформации занимает около трети времени всей реакции. Механизм реакции упорядоченный: вначале связывается NADH, затем – второй субстрат. В данном случае речь идет об обратной реакции, а в качестве второго субстрата использовался 2-КГ, а не ФГП из соображений большей доступности и стабильности.

Тщательный анализ кинетики реакции, катализируемой ФГД, проведенной в экспериментах *in vitro* и описанный в серии работ Грегори Гранта с соавт. позволяет сделать предположение о механизме действия этого фермента в *E.coli* и о роли вторичной «нефизиологичной» ферментативной активности. Учитывая необычно высокое сродство фермента к NADH, очевидно, что после окисления ФГ и восстановления NAD^+ до NADH, диссоциации E-NADH происходит крайне редко. Комплекс E-NADH может связать один из двух его субстратов: либо ФГП, либо 2-КГ. В первом случае произойдет обратная реакция с образованием ФГ, во втором – образование 2-ГГ. Как видно из Таблицы 19, концентрация 2-КГ в клеточном пуле кишечной палочки, растущей на глюкозе, в 5 раз превышает K_m для 2-КГ, и, таким образом, связывание 2-КГ более вероятно, и это препятствует обратному превращению ФГП ввиду их конкуренции за общий активный центр.

Внутриклеточная концентрация ФГП не известна, но она ниже 0,001 мМ, так как концентрация ФГП ниже чувствительности метода при определении концентраций всех метаболитов *E.coli*, концентрация которых превышает 0,001 мМ при росте на глюкозе [310]. Есть также грубая расчетная оценка концентрации ФГП равная 0.003 мМ [298]. Эти значения ниже или равны K_m для ФГП, равной 0,0032 мМ. Таким образом, 2-КГ, связываясь с E-NADH и превращаясь в 2-ГГ, предотвращает реакцию, обратную биосинтетической и, тем самым, сдвигает равновесие в пользу прямой реакции.

Таблица.19.

Концентрации субстратов для 3-фосфоглицератдегидрогеназы в клетках *E.coli* и соответствующие им K_m .

Направление реакции	Субстрат реакции	Внутриклеточная концентрация, мМ	K_m , мМ	Степень насыщения субстратом, конц./ K_m
Прямое	NAD ⁺	2,6	0,0078	330
	3-фосфоглицерат (ФГ)	1,5	1,2	1.2
	D-2-гидроксиглутарат (D-2-ГГ)	Нет данных (<0.001мМ)	0,37	<0.0027
	L-2-гидроксиглутарат (L-2-ГГ)	Нет данных (<0.001мМ)	2,9	<0.0003
Обратное	NADH	0,083	0,0005*	160
	2-кетоглутарат (2КГ)	0,44	0,088	5
	3-фосфогидроксипироват (ФГП)	Нет данных (<0,001 мМ)	0,0032	0.3

* K_d комплекса E-NADH оценивается в величину ниже 10 нМ [301].

В прямой реакции, которая гораздо меньше изучена из-за ее обратимости *in vitro* и быстрого замедления по этой причине, ФГД в виде комплекса E-NAD⁺ имеет два конкурирующих субстрата: D-2-ГГ (K_m – 0.37) и «истинный» субстрат, ФГ (K_m – 1.2 мМ) (рис. 53). L-2-ГГ обладает на порядок меньшим сродством к

ФГД и тем более не может конкурировать с ФГ. Концентрация D-2-ГГ при росте на глюкозе не выше 0,001мМ и не менее чем на два порядка ниже K_m для этого субстрата, тогда концентрация истинного субстрата приблизительно равна K_m для него. Таким образом, вероятность связывания истинного субстрата (ФГ) более, чем на два порядка превышает таковую связывания D-2-ГГ.

Вновь синтезированный свободный фермент может образовывать два вида комплексов: $E-NAD^+$ или $E-NADH$ (рис. 53). Комплекс $E-NAD^+$ преимущественно связывает истинный субстрат, ФГ, поскольку насыщение этим субстратом на 2

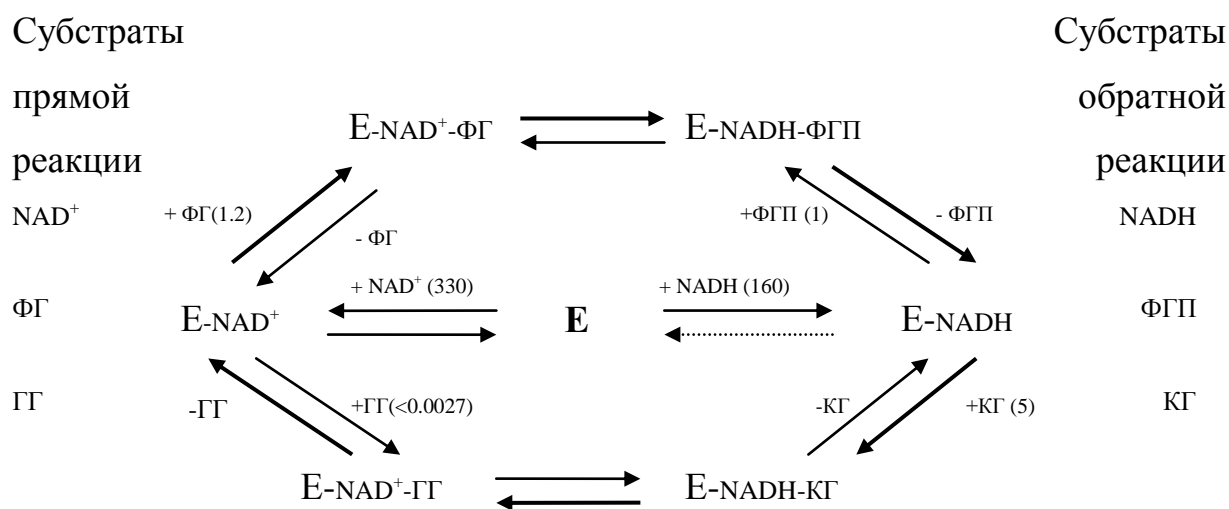


Рис. 53. Схема превращений фермент-субстратных комплексов 3-фосфоглицератдегидрогеназы из кишечной палочки.

Жирными стрелками указаны преимущественные направления реакций. В скобках приведены степени насыщения субстратами из таблицы 19.

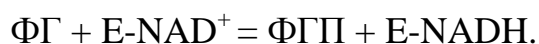
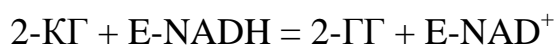
порядка выше, чем насыщение конкурирующими субстратами – изомерными 2-ГГ. Далее следует собственно окислительно-восстановительная реакция с образованием комплекса $E-NADH-ФГП$, а затем диссоциация ФГП (целевой продукт реакции) с образованием $E-NADH$. Этот комплекс далее не диссоциирует ($K_d=10$ нМ) и способен связать 2-КГ или вновь присоединить ФГП. Шансы связать 2-КГ значительно выше, чем ФГП (Табл.19). Восстановление 2-КГ приводит к образованию 2-ГГ и $E-NAD^+$. $E-NAD^+$ способен совершить

следующий цикл реакций (по часовой стрелке на рис. 53) или диссоциировать с образованием E и NAD^+ , что маловероятно, учитывая степень насыщения NAD^+ (Таблица 19). Если свободный фермент E вначале связывает NADH, образуя чрезвычайно устойчивый комплекс E-NADH, то вступает в описанный цикл, начиная со связывания 2-КГ и далее по часовой стрелке.

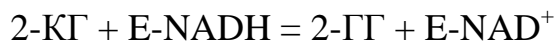
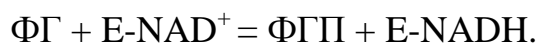
Течение преимущественных (направление по часовой стрелки на рис. 53) реакции в клетках можно представить следующим образом (начиная от свободного фермента).

Инициация цепи реакций: $\text{E} + \text{NADH} = \text{E-NADH}$ или $\text{E} + \text{NAD}^+ = \text{E-NAD}^+$.

Затем следует челночный механизм, чередующихся реакций окисления и восстановления NAD, постоянно связанного с белком ФГД:



Если фермент вначале связывает NAD^+ , то порядок реакций обратный:



В уравнение суммарной реакции ($2\text{-КГ} + \text{ФГ} = 2\text{-ГГ} + \text{ФГП}$) не входят ни окисленная, ни восстановленная формы NAD, то есть не расходуется ни того, ни другого вещества. Естественно, что минимальное количество НАД в любой из его форм должно присутствовать в пуле, чтобы инициировать запуск реакции. Скорость прямой реакции зависит от присутствия двух интермедиатов центрального метаболизма (ФГ и 2-КГ), концентрации которых высоки, тогда как концентрации продуктов реакции (2-ГГ и ФГП) малы (менее 0,001 мМ каждого). Каждая из двух реакций (окисления ФГ и восстановления 2-КГ) являются мономолекулярными. Их скорость определяется доступностью ФГ и 2-КГ, синтез которых постоянно происходит при росте на обычных субстратах в гликолизе и в ЦТК, соответственно. Отметим, что во второй реакции серинового пути происходит образование 2-КГ из глутамата (рис. 51) в количестве, практически эквимолярном количеству 2-КГ, расходуемого в первой реакции,

катализируемой ФГД, как показано выше. Потребление эквимольного количества 2-КГ в первой реакции снижает общий уровень пула этого вещества, ускоряя вторую реакцию и увеличивая общий поток углерода в направлении серина. Это означает также, что значительная доля глутамата, которая участвует в аминировании ФГП (вторая реакция на рис. 51), превращается сначала в 2-КГ, а затем в две изомерные гидроксикислоты: *D*-2-ГГ и *L*-2-ГГ.

Особенностью ФГД из *E.coli* является необычно прочное связывание NADH. K_m для NAD⁺ значительно выше, что обуславливает большую вероятность диссоциации E-NAD⁺. Когда диссоциация происходит, то свободный фермент может связывать не только NAD⁺, но и NADH, образуя E-NADH, который способен катализировать реакцию восстановления в первую очередь 2-КГ по причинам, указанным выше. В результате этого число актов восстановления 2-КГ может превышать число актов прямой реакции (окисление ФГ), что сопровождается освобождением соответствующего количества NAD⁺.

В биосинтетическом направлении реакция представляет собой окисление ФГ за счет восстановления 2-КГ. НАД, конечно, участвует в процессе окисления-восстановления, попеременно являясь то донором гидрид-иона, то – акцептором. По сути эта реакция не является дегидрогеназной реакцией в обычном понимании (перенос водорода на NAD⁺), а скорее – трансгидрогеназной (перенос водорода от ФГ к КГ).

ФГД из клеток *Mycobacterium tuberculosis*, свойства которой также хорошо изучены и определена структура белка, не способна восстанавливать 2-КГ, то есть не обладает второй ферментативной активностью. Интересно, что этот фермент одновременно не обладает высоким сродством к NADH [301, 311, 312] и имеет неупорядоченный механизм связывания субстратов в отличие от фермента из кишечной палочки.

3.6.3. Сходные механизмы катализа у других организмов

Известны примеры ферментов, образующих прочные нековалентные связи с НАД. Так, уроканаза из *Pseudomonas putida*, катализирующая присоединение молекулы воды по двойной связи молекулы урокановой кислоты, содержит в своем составе NAD^+ , который удаляется при денатурации белка [313-315]. Полагают, что молекула NAD^+ включается в состав белка уже во время синтеза полипептида с последующим формированием его конформации (фолдинг) и находится в запертом состоянии, но без образования ковалентных связей с белком. Хотя уроканазная реакция не является окислительно-восстановительной, тем не менее ее механизм включает промежуточные реакции окисления за счет NAD^+ с последующим восстановлением с помощью NADH и, соответственно, с регенерацией NAD^+ .

Второй пример – УДП-галактозо-4-эпимераза (GALE), катализирующий обратимую изомеризацию (эпимеризация) УДФ-галактозы в УДФ-глюкозу. В *E.coli* кодирующий его ген *galE* является частью галактозного оперона. Выделенный и очищенный белок содержит прочно связанный NAD^+ , но для проявления его активности добавления NAD^+ в реакционную смесь не требуется [316]. Только при обработки перхлоратом происходит освобождение NAD^+ в эквимолярном количестве по отношению к числу молекул белка. Исследования GALE определили роль NAD^+ в этой реакции, промежуточные стадии которой включают перенос гидрид-иона с УДФ-галактозы на молекулу NAD^+ с образованием NADH и окисленной формы субстрата в виде интермедиата, который далее разворачивается в активном центре и затем получает обратно гидрид-ион от NADH , возвращая в NAD^+ [317 – 319].

Механизм реакции, катализируемой ФГД кишечной палочки, сходен с механизмом малат-лактат-трансгидрогеназы (МЛТГ), обнаруженной в бактерии *Veillonella alcalescens* [320, 321]. Реакцию, катализируемую МЛТГ (L -лактат + оксалоацетат = пируват + L -малат), можно представить как сумму двух реакций,

катализируемых отдельно малатдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой, в которых, соответственно, используется в качестве вторых субстратов NAD^+ и NADH . Однако, в реакции, катализируемой МЛТГ, эти кофакторы не являются субстратами реакции, и белок содержит прочно, но нековалентно связанный НАД в качестве по сути дела простетической группы. НАД не отделяется при очистке фермента, но отделяется при денатурации мочевиной или додецилсульфатом натрия. Интересно, что оксалоацетат может служить окислителем ФГ вместо 2-КГ в реакции, катализируемой ФГД из *E.coli*, хотя и менее эффективно [298].

Источником *D*-2-ГГ у млекопитающих и человека является трансгидрогеназа гидроксикислот-кетокислот (НОТ), известная также как *D*-2-гидроксиглутаратдегидрогеназа [322–324]. НОТ участвует в пути превращения известного нейромедиатора, гамма-аминомасляной кислоты, катализируя окисление гамма-гидроксимасляной кислоты в гамма-полуальдегид янтарной кислоты, сопряженное со стехеометрическим восстановлением 2-КГ до *D*-2-ГГ. Для проявления ферментативной активности НОТ не требуется присутствия ни NAD , ни NADP , хотя ее пептид содержит НАД-связывающий домен [324]. По аналогии с другими дегидрогеназами со сходной аминокислотной последовательностью полагают, что НОТ является металлопротеином, так как содержит два консервативных гистидиновых остатка (обычно их три), которые участвуют в образовании связей с металлом [323]. Считается, что металл очень прочно связан с белком, однако при попытке стимулировать активность НОТ ионами многих металлов никакого эффекта не обнаружено [323]. НОТ человека обладает довольно широкой субстратной специфичностью, окисляя некоторые гидроксикислоты за счет восстановления 2-КГ [324], но фосфорилированные гидроксикислоты, как например, ФГ не испытывались в качестве возможных субстратов для НОТ. По совокупности свойств НОТ обладает сходством как с МЛТГ, так и с ФГД кишечной палочки, отличаясь от них тем, что у последних установлено использование НАД в качестве акцептора гидрид-иона, тогда как у НОТ таковым является на основе данных биоинформатики металл, хотя по тем

же данным белок содержит и НАД-связывающий домен. По-видимому, дальнейшие исследования покажут, является ли этот домен консервативным рудиментом в эволюции этого белка, или же он реально участвует в трансгидрогеназной реакции, катализируемой НОТ.

С точки зрения создания продуцентов аминокислот (серина, цистеина, глицина, триптофана) на основе *E.coli* или *P. ananatis* возможны два подхода для снижения побочной продукции ГГ. Во-первых, в зависимости от законодательства страны, в которой предполагается производство, можно использовать чужеродные гены, кодирующие ФГД. Например, ФГД из *S. glutamicum*, которая не продуцирует ГГ. Во-вторых, клетки *E. coli* и *P. ananatis* обладают некоторой способностью устранять ГГ, превращая это вещество либо обратно в 2-КГ, либо в какой-то другой метаболит, который может быть использован как источник углерода. Необходимо найти соответствующий метаболитический путь и усилить его современными методами генной инженерии. В настоящее время этот путь не обнаружен.

3.6.4. Десенсбилизация О-серинацетилтрансферазы *E.coli* к ретроингибированию цистеином для создания продуцента цистеина

Методы получения цистеина путем микробного синтеза до настоящего времени являются недостаточно эффективными, и основная масса этой аминокислоты производится путем гидролиза некоторых белков. Цистеином богаты белки из перьев птиц (кур, уток), из которых эту аминокислоту извлекают после гидролиза белков. Цистеин используется в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности и, в частности, в хлебопечении.

Есть несколько особенностей в продукции цистеина с помощью бактерий. Во-первых, цистеин не может накапливаться в клетках в повышенных концентрациях в виду высокой реакционной способности его тиоловой группы. Цистеин образует комплексы со многими микроэлементами, которые входят в

состав металлопротеинов, инактивируя такого рода ферменты. Токсичность цистеина для бактерий достаточно хорошо изучена, однако остается много неясных моментов. Для эффективной продукции цистенина необходимо не только обеспечить на высоком уровне поток углерода, азота и восстановленной серы, но также обязательно усилить скорость экскреции цистеина из клеток, чтобы ослабить ингибирование роста клеток продуцентов цистеином.

Во-вторых, в пути биосинтеза цистеина есть два фермента, подверженных ретроингибированию: первый – это 3-фосфоглицератдегидрогеназа (ФГД), ингибируемая серином, второй – О-ацетилсеринсинтаза (ОАС), ингибируемая цистеином (Рис.51). Если десенсбилизации к ингибированию первого фермента, ФГД, достигается либо делецией С-концевого фрагмента, в котором расположен специальный домен АСТ, необходимый для аллостерического ингибирования серином, либо точечными мутациями, затрагивающими этот домен, то механизм ингибирования ОАС цистеином носит иной характер. Низкий уровень продукции цистеина обусловлен неполным освобождением этого фермента от ингибирования цистеином. Как правило, освобождение от ретроингибирования цистеином приводило к одновременному снижению ферментативной активности.

Была поставлена цель получить такие мутации, устраняющие ретроингибирование цистеином, при которых в полной мере сохранялась бы каталитическая активность.

ОАС катализирует первую реакцию превращения серина в цистеин: $\text{серин} + \text{ацетил-КоА} = \text{О-ацетилсерин} + \text{КоА}$. В этой бимолекулярной реакции, как было известно [262, 325], цистеин конкурентно по отношению к серину ингибирует активность, а второй субстрат, ацетил-КоА, не конкурирует с цистеином. Очевидно, цистеин связывается тем же активным центром, что и серин. Эти две аминокислоты являются аналогами, отличаясь тем, что в молекуле цистеина вместо атома кислорода находится атом серы. Присутствие цистеина в активном центре приводит к снижению способности связывать второй субстрат – ацетил-КоА. Использовалась трехмерная структура ОАС из кишечной палочки,

полученная при рентгеноструктурном кристаллографическом исследовании с разрешением 2,2 ангстрема [262]. Фермент представляет собой пирамиду, построенную из трех мономеров, причем каждая из пирамид своими N-концами (основаниями пирамид) прикрепляется к такой же пирамиде, что означает, что ОАС – это димер тримеров. Поскольку фермент был кристаллизован в присутствии цистеина, то было установлено, что цистеин находится в щели между мономерами и связан водородными связями одновременно с двумя мономерами. Очевидно, цистеин занял место серина в центре его связывания.

Для создания объемного центра связывания серина была проведено компьютерное моделирование связывания серина активным центром ОАС с помощью программы Affinity, являющейся модулем InsightII (Molecular simulation Inc., San Diego, USA). Эта программа предназначена для автоматического связывания лигандов с рецепторами (в данном случае с активным центром ОАС) на основании расчета энергии связывания лигандов с

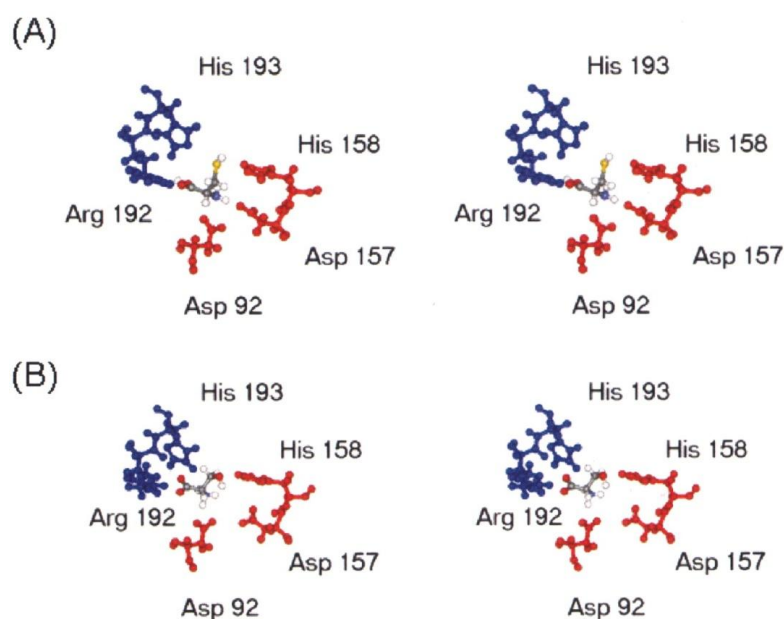


Рис. 54. Объемные модели связывания цистеина (А) и серина (В) в активном центре О-ацетилсеринсинтазы *E.coli*, полученные на основании компьютерного моделирования.

окружающими аминокислотными остатками. Полученная модель связывания серина была сравнена с аналогичной структурой, в которой присутствовал

цистеин вместо серина, пользуясь другим модулем (Superimpose) этой же программы Insight.

На рис. 54 А изображена объемная модель сайта связывания цистеина, где видно, что атом серы, кислород карбоксильной группы и атом азота образуют водородные связи с His158 и His193, с Arg192, с Asp92 и Asp157, соответственно. Отметим, что Asp92, Asp157 и His158 принадлежат к одному мономеру, а Arg192 и His193 – к другому. В случае присутствия серина (Рис. 54 В) в окружении тех же аминокислотных остатков расстояние между Asp92 и лигандом увеличилось, что указывает на то, что Asp92 более существенен для связывания цистеина, чем серина. Поэтому предположили, что смещение Asp92 должно ослабить связи с ингибитором, цистеином, и не изменит эффективность связывания истинного субстрата, серина. Asp92 находится в середине короткой петли из восьми аминокислотных остатков (Рис. 55, петля выделена черным). Чтобы произвести небольшое смещение Asp92, было решено не удалять этот аминокислотный остаток, а произвести случайные изменения окружающей его последовательности аминокислот.

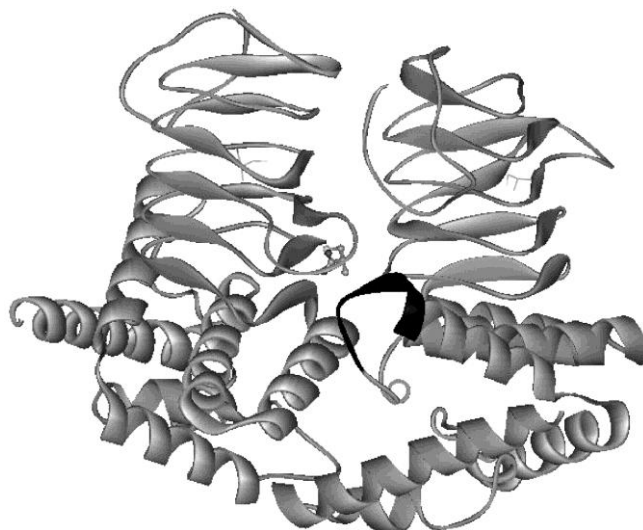


Рис. 55. Ленточная модель О-ацетилсеринсинтазы *E.coli*. Черным выделена петля из 8-ми аминокислотных остатков, подвергшаяся рандомизированному мутагенезу.

С этой целью вначале был клонирован на векторной плазмиде pMW118 ген *cysE* из штамма *E.coli* MG1655, а затем из него был выделен и субклонирован фрагмент этого гена, кодирующий последовательность с 1-ой по 102 аминокислотного остатка. Этот фрагмент послужил матрицей для амплификации мутантных фрагментов, используя для этого праймеры ДНК с рандомизированной последовательностью из 6-ти нуклеотидов (начиная от позиции, соответствующей Val95). Смесь полученных фрагментов (0,3 тпн) выделялась и использовалась в качестве «праймеров» для получения и амплификации полноразмерного гена *cysE*, содержащего рандомизированные последовательности, который затем был включен в состав экспрессионной плазмиды pMW-PompC под контроль промотора гена *ompC*. В качестве контроля с помощью обычного сайт-специфического мутагенеза были получены ранее известные мутация в гене *cysE*, вызывающие освобождение ОАС от ретроингибирования цистеином (замена Met256Ile) [326].

Чтобы подтвердить функциональность мутантных генов, полученные плазмиды вводились в штамм *E.coli*, дефектный по гену *cysE* (инсерция гена устойчивости к канамицину), и отбирали прототрофные по цистеину колонии, которые далее проверяли на способность подкармливать на агаре газон цистеин-недостаточной культуры. В клетках таких клонов изучали активность ОАС и чувствительность этого фермента к ингибированию цистеином. Определяли также нуклеотидную последовательность района рандомизации.

Как видно из данных таблицы 20, у всех полученных мутантов сохранилась высокая ферментативная активность ОАС. При этом у некоторых из них (*cysE5*, *cysE15*, *cysE1*, *cysE11-2*) резистентность к ингибированию увеличилась на три порядка, что позволяет использовать эти мутации для создания продуцентов цистеина. Действительно, на основе полученных мутантов сконструированы на основе кишечной палочки эффективные продуценты цистеина, защищенные патентом Российской Федерации № 2279477, а также зарубежными патентами (EP1650296, патент США 7312058).

Таблица 20

Сравнение активности ОАС и чувствительности к ингибированию цистеином у полученных мутантов

Ген cysE на плазмиде	Рандомизированная последовательность белка ОАС (позиции 89-96)	Удельная активность, мкмоль/мин/мг*	IC ₅₀ , мкМ**	K _i , мкМ***
Дикий тип CysE 256 [326]	Arg Thr Arg Asp Pro Ala Val Asp Met256Ile	1680 1067	0,8 18,0	0,6 14,5
cysE5	Arg Thr Arg Asp Pro Ala Arg Pro	715	1100	950
cysE12	Arg Thr Arg Asp Pro Ala Gly Gly	1440	125	114
cysE15	Arg Thr Arg Asp Pro Ala Leu Pro	1470	550	510
cysE1	Pro Thr Arg Asp Pro Ala Val Asp	1600	460	420
cysE142	Ser Leu Arg Asp Pro Ala Val Asp	1220	20	15
cysE10	Arg Thr Arg Asp Pro Thr Val Asp	2692	4,7	3,4
cysE11-2	His Val Arg Asp Pro Ala Val Asp	1900	410	395
cysE15-2	ThrArg Arg Asp Pro Ala Val Asp	1100	6,0	4,5

* Метод определения ферментативной активности описан в разделе Материалы и методы, ** IC₅₀, - концентрация цистеина, ингибирующая активность на 50%, *** K_i – константа ингибирования активности ОАС цистеином, рассчитанная с помощью графика двойных обратных величин (1/V против 1/[S]).

Наиболее эффективные замены, введенные методом рандомизации, отстоят на некотором удалении от Asp92, тогда как ближайшие к данной позиции замены не были обнаружены среди устойчивых к ингибированию вариантов. Видимо, обнаруженные эффективные замены лишь незначительно искажают структуру альфа-спирали в которой находится Asp92, но все же смещают этот аминокислотный остаток на расстояние, при котором водородная связь с ингибиторной молекулой цистеина не образуется. Полученные результаты подтверждают правильность первоначального вывода о целесообразности смещения Asp92 для снятия ретроингибирования ОАС цистеином.

3.6.5. Ассимиляция тиосульфата в биосинтезе цистеина клетками E.coli

Для микробиологического получения цистеина в качестве источника серы можно использовать либо сульфат (SO₄²⁻), либо тиосульфат (S₂O₃²⁻).

Использование сульфатов более выгодно с точки зрения экономики процесса, так сульфаты чаще всего натрия относительно дешевы. Однако при использовании сульфатов микроорганизм должен восстановить серу от степени окисления +6 до -2, затратив для этого как минимум 4 молекулы NAD(P)H. Для их регенерации из окисленной формы NAD(P)⁺ требуется окислить значительное количество углеводов. В результате повышенного расходования глюкозы не на конструктивный обмен, а на генерацию восстановительных эквивалентов в виде NAD(P)H расчетный (теоретический) выход цистеина значительно ниже, чем при использовании тиосульфата в качестве источника серы, в котором степень окисления серы +2.

При изучении продукции цистеина, созданными нами продуцентами цистеина на основе *E.coli* и *P.ananatis*, обнаружилось, что в ферментационной среде происходит не только накопление цистеина (и его окисленной формы в виде цистина), но также и S-сульфоцистеина COOH-HCNH₂-H₂C-S-SO₃H, что снижало выход целевого продукта – цистеина.

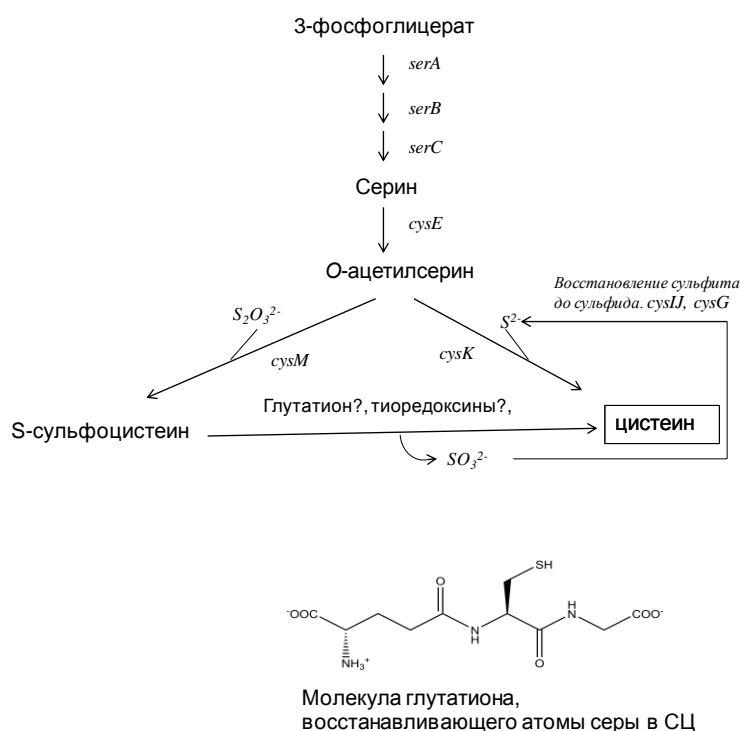
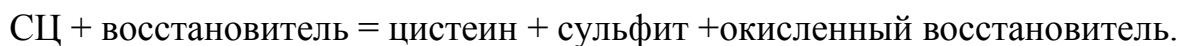


Рис.56. Ассимиляция серы тиосульфата в синтезе цистеина.

О том, что S-сульфоцистеин (далее СЦ) является промежуточным продуктом превращения O-ацетилсерина в цистеин при использовании тиосульфат-иона в качестве источника серы было известно на основании исследований на *Salmonella typhimurium*. Известно также, что при ассимиляции тиосульфата путем замещения O-ацетильной группы O-ацетилсерина образуется молекула СЦ, которая далее восстанавливается до цистеина с освобождением второго атома серы в виде сульфит-иона (Рис.56). Сульфит может быть восстановлен до сульфида сульфат-редуцирующей системой, который также служит источником серы в синтезе цистеина из O-ацетилсерина. Эту реакцию катализирует одна из сульфгидрилаз, кодируемая геном *cysK*, тогда как за ассимиляцию иона-тиосульфата ответственна другая сульфгидрилаза (CysM). Предполагалось, что восстановителем атома серы в составе ЦС служит белок тиоредоксин в NADPH зависимых реакциях. Роль глутаредоксинов и глутатиона (восстановителя глутаредоксина) считалась слишком малой, чтобы иметь физиологическое значение. Очевидно, что при сверхсинтезе цистеина способность клеток восстанавливать СЦ до цистеина была недостаточной, что и приводило к экскреции СЦ в среду.

Нашей задачей было понять механизм превращения СЦ в цистеин и усилить способность клеток осуществлять это превращение.

Известно, что происходит следующая реакция:



Образующийся сульфит может быть восстановлен и быть использован в виде сульфид-иона для синтеза цистеина под действием O-ацетилсерин(тиол)-лиазой А (ген *cysK*). Необходимо было выявить природу восстановителя сульфоцистеина и определить, является ли эта реакция ферментативной. В роли восстановителей СЦ могут использоваться либо белки тиоредоксины, либо глутаредоксины. Разница между ними непринципиальна: если тиоредоксины переходят в восстановленную (рабочую) форму за счет NAD(P)H, то для восстановления глутаредоксинов требуется глутатион (GSH). Для устранения

побочной продукции ЦС необходимо было определить роль и значения каждого из этих путей восстановления ЦС.

Для этого исследования был использован недостаточный по цистеину штамм, у которого блокирована активность гена *cysE* (штамм *E.coli cysE::km^R*), который мог усваивать СЦ вместо цистеина. Этот штамм обрабатывали мутагеном (нитрозогуанидин) и после обработки пенициллином в присутствии СЦ (пенициллиновое обогащение) отбирали клоны, утратившие способность усваивать СЦ в качестве источника цистеина на агаре, лишенном других аминокислот. Таким способом было найдено 18 мутантов, которые не усваивали ЦС, но были способны к росту в присутствии цистеина или его предшественника О-ацетилсерина. Клетки всех полученных мутантов трансформировались плазмидой pBR322, содержащей произвольные вставки хромосомы штамма дикого типа *E.coli K12*. Те плазмиды, которые сообщали клеткам мутантов способность усваивать ЦС, анализировались далее: определялась нуклеотидная последовательность вставок хромосомной ДНК. Как оказалось, 5 плазмид содержали ген *gshA* (глутамат-цистеинлигаза, участвующая в синтезе глутатиона); 4 – *gshB* (глутатионсинтаза); 9 – неаннотированную рамку считывания *udjN* (кодирует трансмембранный белок). Чтобы убедиться, что именно эти гены, которые присутствовали в вставках хромосомной ДНК, имеют отношение к усвоению ЦС, они были клонированы с помощью метода ПЦР, используя в качестве матрицы хромосому *E.coli K12* дикого типа и, будучи включенными в состав вектора pMW118, введены в клетки полученных мутантов. В результате предварительные данные были подтверждены.

Таким образом, мы показали, что в процессе восстановления СЦ участвует глутатион, что подтверждалось также тем, что те полученные мутанты, рост на ЦС которых восстанавливался в присутствии генов биосинтеза глутатиона, нормально усваивали ЦС при внесении глутатиона в среду. Необходим ли специальный фермент, катализирующий восстановление СЦ в присутствии глутатиона, было определено далее.

Как оказалось, в бесклеточной системе в присутствии глутатиона, а также глутатионредуцирующего фермента и NADPH восстановления СЦ до цистеина не происходило, тогда как добавление экстракта клеток штамма *E.coli* дикого типа приводило к образованию цистеина особенно в присутствии глутатиона. Это указывало на участие глутаредоксинов, использующих GSH в качестве кофактора, в процессе образования цистеина из СЦ. С другой стороны, если бы восстановителем СЦ служили бы тиоредоксины, то в присутствии бесклеточного экстракта и NADPH происходило бы восстановление СЦ до цистеина и в отсутствие GSH. Этого однако не наблюдалось, что говорит о незначительной эффективности восстановления СЦ тиоредоксинами или даже о полной неспособности тиоредоксинов восстанавливать СЦ.

Таблица 21

Влияние белков *E.coli* на восстановление S-сульфоцистеина с образованием цистеина в присутствии глутатиона

Глутатион, 12 мМ	Глутатион-редуктаза (1 ед. мл), NADPH, 0,1 мМ	Бесклеточный экстракт <i>E.coli</i> , 0,1 мг белка в мл	Скорость образования цистеина, нмол/мин
–	–	–	<0,5
–	+		<0,5
+	–		<0,5
+	+		<0,5
–	–	+	2,4
+	–		3,9
–	+		1,1
+	+		38

В геноме *E.coli* известны 3 гена, кодирующие различные глутаредоксины: *grxA*, *grxB* и *grxC*. Кроме того предполагается существование еще 2-х видов глутаредоксинов и соответствующих генов. Функции этих глутаредоксинов пока не изучены [327]. Множественность генов для глутаредоксинов и, вероятно, их перекрывающиеся функции объясняют причину, по которой мутанты по этим

генам не были обнаружены в наших исследованиях (см. выше), как неспособные к усвоению СЦ в качестве источника цистеина.

Чтобы оценить вклад 3-х известных глутаредоксинов в процесс восстановления ЦС были получены делеции всех трех генов и затем перенесены в штамм LE392 *cysE::Km*, нуждающийся в цистеине. Как оказалось, делеции индивидуальных генов для глутаредоксинов не влияют на способность клеток расти на СЦ в качестве источника цистеина, что свидетельствует о том, что не один вид глутаредоксина участвует в восстановлении этого предшественника цистеина. После того, как делеции всех трех генов были перенесены в хромосому одного и того же штамма, то способность к росту на ЦС утратилась, что еще раз подтверждает главную роль именно глутаредоксинов, а не тиоредоксинов в изучаемом процессе. Измерения активности S-сульфоцистеинредуктаз в полученных делеционных вариантах показало, что делеция только одного гена *grxC* существенно (на 50%) снижает измеряемую активность, тогда как делеция двух остальных генов вообще не влияет на суммарную активность. Отметим, что при делеции всех трех генов сохраняется около 40% от активности в штамме дикого типа, что однозначно указывает на наличие в клетках *E. coli* неустановленных изоферментных глутаредоксинов, которые участвуют в глутатион-зависимом восстановлении СЦ.

Плазмидная амплификация генов для глутаредоксинов подтверждает важность глутаредоксина С (*grxC*) в реакции восстановления СЦ (таблица 22).

Амплификация гена *grxC* не приводит к повышению способности клеток восстанавливать ЦС, и лишь незначительное повышение этой способности наблюдается при амплификации гена *grxB*. В то же время, амплификация гена *grxC* вызывает многократное возрастание скорости восстановления СЦ. Таким образом, только изофермент, кодируемый геном *grxC*, является существенным для данного процесса. Повышенная экспрессия только этого гена могла бы улучшить продукцию цистеина и сократить выброс СЦ во внешнюю среду.

Таблица 22

Влияние делеций или амплификации генов, кодирующих глутаредоксины на активность фермента, катализирующего восстановление S-сульфоцистеина до цистеина, S-сульфоцистеинредуктазы.

Делетированные гены для глутаредоксинов	Амплифицированный ген для глутаредоксинов*	Активность S-сульфоцистеинредуктазы в клетках, нмол/мин/мг белка
Нет (дикий тип MG1655)	Нет**	26,1
Δ grxA	Нет	28,3
Δ grxB	Нет	20,1
Δ grxC	Нет	13,7
Δ grxA Δ grxB Δ grxC	Нет	11,2
Δ grxA Δ grxB Δ grxC	grxA	12,1
Δ grxA Δ grxB Δ grxC	grxB	39,2
Δ grxA Δ grxB Δ grxC	grxC	201,9

Способность глутаредоксина GrxC восстанавливать ЦС до цистеина нашла свое применение при создании продуцентов цистеина, использующих тиосульфат натрия в качестве источника серы [Зиятдинов М.Х., Самсонов В.В. Гусятинер М.М. Способ получения L-цистеина с использованием бактерии семейства Enterobacteriaceae. 2012. Патент России №2458981]. Для демонстрации эффекта повышенной экспрессии гена grxC на продукцию цистеина и накопление СЦ на основе штамма *Pantoea ananatis* (семейство Enterobacteriaceae) были сконструированы продуценты цистеина, имеющие мутации, вызывающие сверхпродукцию цистеина (устранено ретроингибирование двух ключевых ферментов биосинтеза цистеина, усилена экспрессия некоторых генов биосинтеза и экскреции цистеина из клеток). В продуцент цистеина *P. ananatis* вводили плазмиды на основе вектора pMIV-118, несущие ген grxC из хромосом штаммов

дикого типа *P. ananatis* или *E. coli*. Кроме того был клонирован ген *gorA*, кодирующий глутатионредуктазу, чтобы избежать дефицита глутатиона – субстрата для глутаредоксинов. Вначале было подтверждено повышение ферментативной активности обоих ферментов, при введении соответствующих плазмид в штамм дикого типа *P. ananatis* SC17.

Таблица 23.

Повышение активности S-сульфоцистеинредуктазы и глутатионредуктазы при плазмидной амплификации генов *grxC* и *gorA* в клетках штамма *Pantoe ananatis* SC17 дикого типа

Штамм/плазида	Активность S-сульфоцистеинредуктазы, нмоль/мин/мг белка	Активность глутатионредуктазы, мкмоль/мин/мг белка
SC17	19	40
SC17/pMIV- <i>grxC</i>	169	38
SC17/pMIV- <i>gorA</i>	18	315

Затем эти гены и ряд других были амплифицированы в клетках продуцента цистеина EYPSGint1M2. Определяли продукции цистеина и накопление СЦ при ферментации в пробирках на ферментационной среде, помещенной в лабораторный ферментер Marubishi. Культивировали в 450 мл среды в течение 2-х суток при 32°C при поддержании pH 7,4 раствора аммиака.

Таблица 24

Влияние амплификации генов, кодирующих S-сульфоцистеинредуктазу (*grxC*) и глутатионредуктазу (*gorA*) на продукцию цистеина и накопление S-сульфоцистеина, продуцентом цистеина EYPSGint1M2

Амплифицированные гены на векторе pMIV-118	Происхождение клонированных генов	Продукция цистеина, г/л	Накопление S-сульфоцистеина, г/л
Бесплазмидный продуцент	-	2,16	0,79
<i>grxC</i>	<i>P. ananatis</i>	2,80	0,27
<i>gorA</i>	<i>P. ananatis</i>	2,29	0,73
<i>gorA+grxC</i>	<i>P. ananatis</i>	2,95	0,17
<i>grxC</i>	<i>E. coli</i>	2,41	0,32

Как показано в таблице 24, усиление ферментативной активности СЦ-редуктазы приводит к увеличению продукции цистеина при одновременном снижении уровня накопления СЦ. Наиболее значительный эффект снижения СЦ наблюдался у штамма, в котором были одновременно амплифицированы два гена: *grxC* и *gorA*. Снижение накопления СЦ происходило также при использовании гена *grxC* из хромосомы кишечной палочки.

Очевидно, увеличение способности клеток восстанавливать СЦ в глутатион-зависимом процессе способствует продукции цистеина. Эта повышенная способность обусловлена немедленным восстановлением СЦ после его образования из О-ацетилсерина и тиосульфата. Кроме того, возможно, что часть СЦ все же экскретируется из клеток и затем вновь поглощается клетками с участием экспортера *YdjN*, и после этого происходит процесс восстановления СЦ. Имеющиеся у нас данные не позволяют сделать выбор между этой альтернативой. Выглядит вероятным, что обе возможности реализуются в той или иной степени.

3.6.6. Исследование роли гена *udjN* в усвоении S-сульфоцистеина

Как показано выше, делеции генов, кодирующих ферменты биосинтеза глутатиона (*gshA*, *gshB*), а также гена *udjN*, кодирующего неаннотированный белок, обуславливают неспособность клеток *E.coli* усваивать экзогенный СЦ в качестве источника цистеина. В проведенных экспериментах (Таблица 25) показано, что делеция гена *udjN* не влияла на превращение предшественника цистеина, О-ацетилсерина, в цистеин при использовании как сульфида, так и тиосульфата в отличие от штаммом, который не способен к синтезу глутатиона. То есть, *YdjN* клетки были способны восстанавливать внутриклеточный СЦ в цистеин, когда СЦ образовывался при добавлении сульфида или тиосульфата. Отсюда следует, что делеция гена *udjN* приводит к неспособности клеток поглощать СЦ из среды.

Таблица 25.

Рост производных цистеин-недостаточного штамма *E.coli* LE392 Δ cysE на минимальном агаре в присутствии S-сульфоцистеина и предшественника цистеина – O-ацетилсерина

Генотип	S-сульфоцистеин, (0.3 mM)	O-ацетилсерин (1 mM) + сульфид натрия (0.4 mM)	O-ацетилсерин (1 mM) + тиосульфат натрия (0.4 mM)
Δ cysE	+	+	+
Δ cysE Δ gshA	-	+	-
Δ cysE Δ gshB	-	+	-
Δ cysE Δ ydjN	-	+	+

Действительно, белок YdjN содержит в своей структуре от 8 до 10 трансмембранных сегментов, предсказываемых различными общедоступными программами. В частности, сервер EMVnet (программа TMpred) обнаруживает 8 трансмембранных доменов, причем N- и C-концы белка с большей вероятностью находятся с внешней стороны цитоплазматической мембраны.

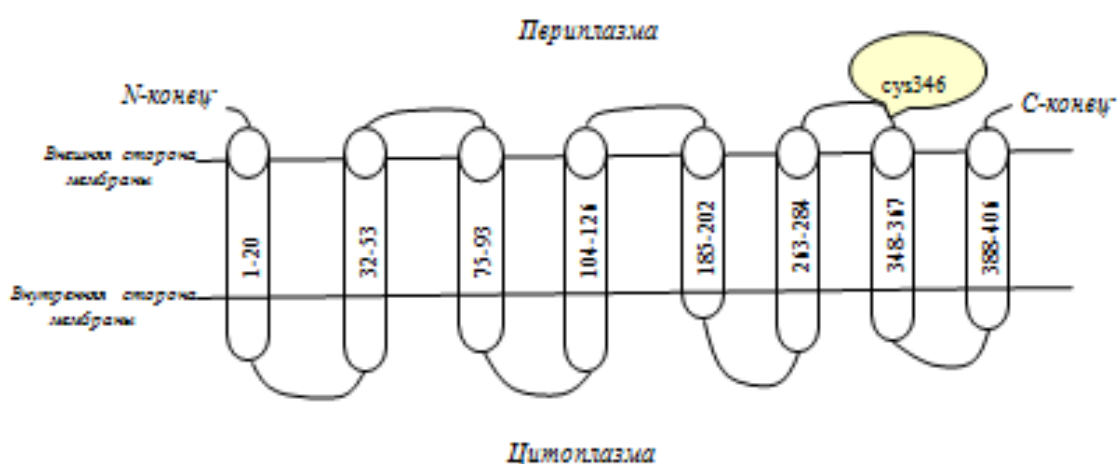


Рис.57. Строение трансмембранного белка YdjN на основе компьютерной модели программы TMpred

Интересно, что белок содержит лишь один остаток цистеина, что указывает на то, что этот белок (его экспрессия) важен именно при дефиците соединений серы.

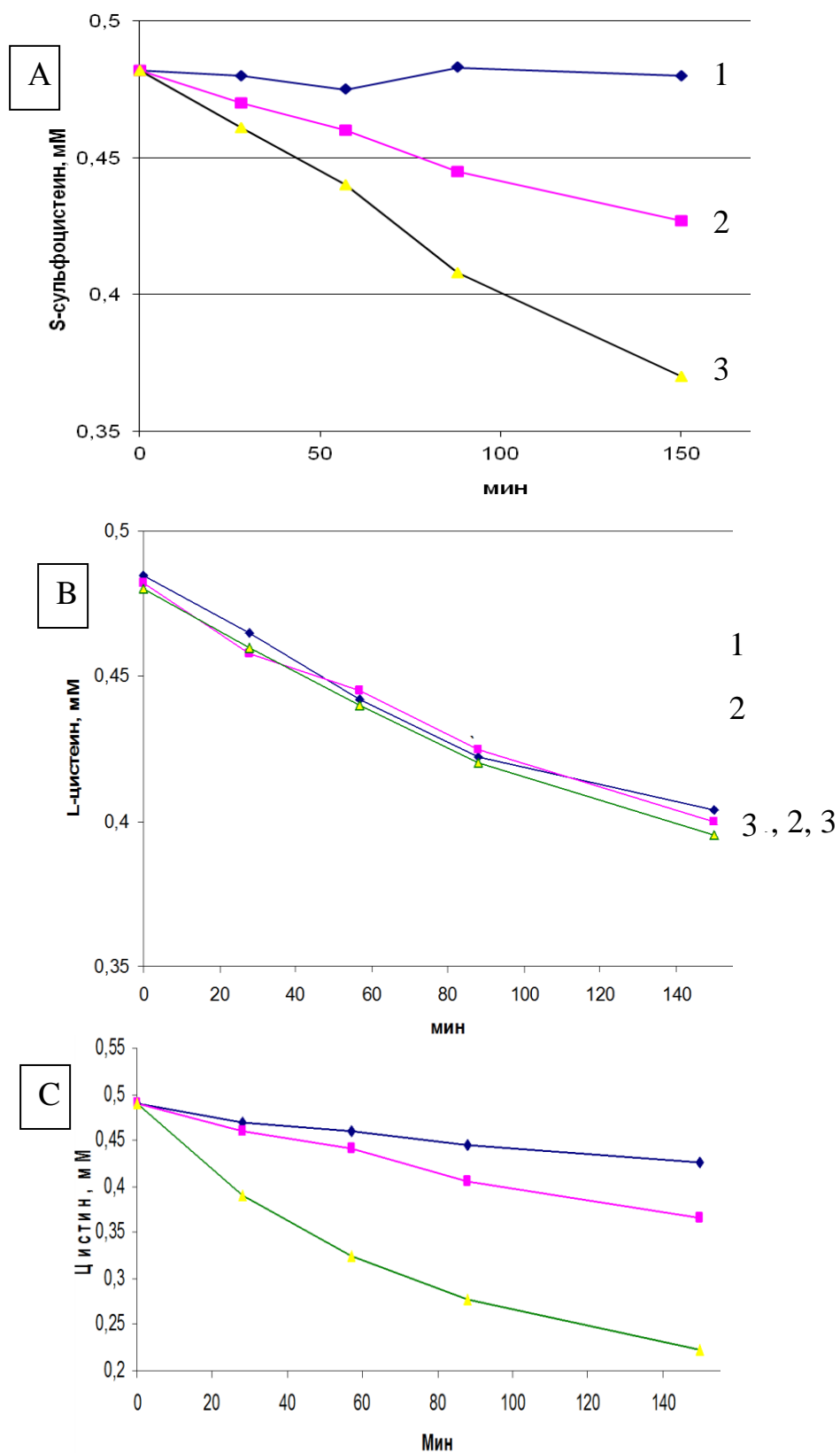


Рис.58. Влияние гена *udjN* на потребление S-сульфоцистеина (А), цистеина (В) и цистина (С) клетками *E.coli* K12.

1. Делеция гена *udjN*; 2. Штамм дикого типа *YdjN+*; 3. Ген *udjN* амплифицирован на плазмиде в штамме дикого типа *YdjN+*

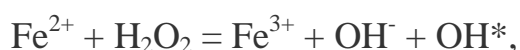
Таким образом, структура данного белка свидетельствует в пользу того, что он является импортером серусодержащих соединений. Чтобы более детально охарактеризовать функцию белка YdjN, соответствующий ген был амплифицирован на плазмиде pMW118, и измерялась скорость потребления из среды СЦ, цистеина и цистина клетками полученных трансформантов. Как показано на рис. 58 А, поглощение СЦ из среды роста клетками с делецией гена ydjN отсутствовало и резко усиливалось при амплификации этого гена. То же наблюдалось при поглощении цистина из среды (рис.58 С). В то же время, ни делеция гена ydjN, ни его амплификация не сказывались на скорости поглощения цистеина (рис. 58 В), который, очевидно, импортируется другими транспортерами без участия YdjN. Вероятно, белок YdjN использует в качестве субстрата соединения, содержащие два ковалентно связанные атома серы.

Недавно было опубликовано исследование, касающееся данного транспортера [328]. Оно подтверждает наши данные и дополняет их. В частности, показано, что YdjN транспортирует только молекулы, содержащие S-S связи, причем как L-, так и D-стереоизомеры. Например, транспортируют L-цистин и D-цистин с одинаковой эффективностью, но не цистеин в обеих стереоформах. YdjN транспортирует, например, GSSG (содержит дисульфидный мостик), но не его восстановленную форму GSH, которая уже не содержит S-S связь. К сожалению, они не изучали транспорт в клетку S-сульфоцистеина, транспорт в клетку которого осуществляется именно этим транспортером, как это доказало наше исследование. Показано, что транспортер YdjN является основным переносчиком такого рода веществ (дисульфидов), тогда как другой известный транспортер цистина Fly-YecSC (АТФ-зависимый ABC типа) обладает малой эффективностью и чрезвычайно высоким сродством к транспортируемым субстратам. Судя по нашим данным, второй транспортер цистина либо вообще не участвует в поглощении СЦ, либо его вклад настолько мал, что не обеспечивает роста на среде с СЦ в качестве источника цистеина. Учитывая значительное сходство белка YdjN с изофункциональным белком в *Bac. subtilis*, обозначаемым как TcyP,

предлагается переименовать ген *udjN* в *tsyP*. Под этим новым наименованием ген *udjN* в настоящее время присутствует в базе данных интернет-сервера BioCys.

Экспрессия генов для обоих транспортеров индуцируется продуктом гена *cysB* при отсутствии в среде восстановленных соединений серы и, соответственно, при появлении в клетке *O*-ацетилсерина и, в особенности, *N*-ацетилсерина (см. выше в данном разделе). В опытах, проведенных нами, использовались цистеин-недостаточные штаммы с делецией в гене *cysE*. Продуктом реакции, контролируемой этим геном, является *O*-ацетилсерин и, следовательно, это вещество не могло накапливаться и активировать регулятор *cysM*. Тем не менее, транспорт *СЦ* все же происходил достаточно эффективно, что говорит о неабсолютной потребности индукции белком *CysM* экспрессии гена *udjN*.

Авторы отмечают, что в присутствии цистина в среде многократно усиливается чувствительность клеток *E.coli* к перекиси водорода. Этот феномен они объясняют следующим: накачиваемый в клетки транспортером *udjN* цистин восстанавливается до цистеина (с участием *GSH*). Постоянный приток цистеина в клетках усиливает реакцию Фентона, которая производит кислород-содержащие радикалы (OH^*), повреждающие клеточные структуры (ДНК, белки и прочее):



тогда как цистеин, привносимый в клетку в виде цистина, постоянно восстанавливает ион Fe^{3+} до Fe^{2+} , препятствуя исчерпанию двухвалентного железа и запуская заново реакцию Фентона с образованием токсичных радикалов. Приток цистеина в клетку превосходит потребности для биосинтеза в 70 раз, и она вынуждена экскретировать избыточное количество цистеина. Эта потребность экскретировать цистеин, видимо, объясняет причину существования специализированного экспортера цистеина *YdeD*, используемого в некоторых продуцентах цистеина.

Что касается наличия цистеинового остатка в составе белка *YdjN* (*cys346*), то известно, что замена его на сериновый полностью приводит к полной

неспособности транспортировать цистин. Отсюда возникает предположение, что *cys346* непосредственно участвует в восстановительном процессе цистина, образуя временные связи с дисульфидами. Транспорт и восстановление дисульфидов, видимо, сопряженные процессы.

Учитывая имеющиеся данные, полученные нами и другими исследователями, касающиеся белка YdjN, можно представить роль этого транспортера при продукции цистеина с использованием тиосульфата в качестве источника серы. Во-первых, при продукции цистеина наблюдается побочная продукция СЦ. Во-вторых, в культуральной жидкости после экскреции цистеина в присутствии кислорода происходит окисление цистеина до цистина и выпадение последнего в осадок. Однако часть цистина несмотря на малую растворимость остается в культуральной жидкости (около 1 г/л). Таким образом, в культуральной жидкости присутствуют одновременно два вещества (СЦ и цистин), которые должны конкурировать между собой за транспортер YdjN для возврата в клетки. Оба эти вещества, попав в клетки восстанавливаются с участием глутатиона до цистеина, а также до сульфита в случае СЦ (рис.56). Образованный цистеин вновь экскретируется из клеток, окисляется кислородом, выпадает в осадок в виде цистина и частично засасывается транспортером YdjN вновь в клетки.

Очевидно, чтобы минимализировать описанный холостой цикл, требующий дополнительной энергии, желательно снизить концентрацию цистина в культуральной жидкости, чтобы, во-первых, не препятствовать возврату СЦ в клетки из-за конкуренции за общий для них транспортер YdjN, а, во-вторых, избежать возврата цистина в клетки и последующего его восстановления и экскреции. Все эти процессы энергозависимые и поэтому снижают выход конечного продукта на массу израсходованного углевода. Сказанное выше иллюстрирует рис. 59, на котором появление СЦ в культуральной жидкости не связано с каким-либо конкретным экспортером, поскольку это пока неизвестно.

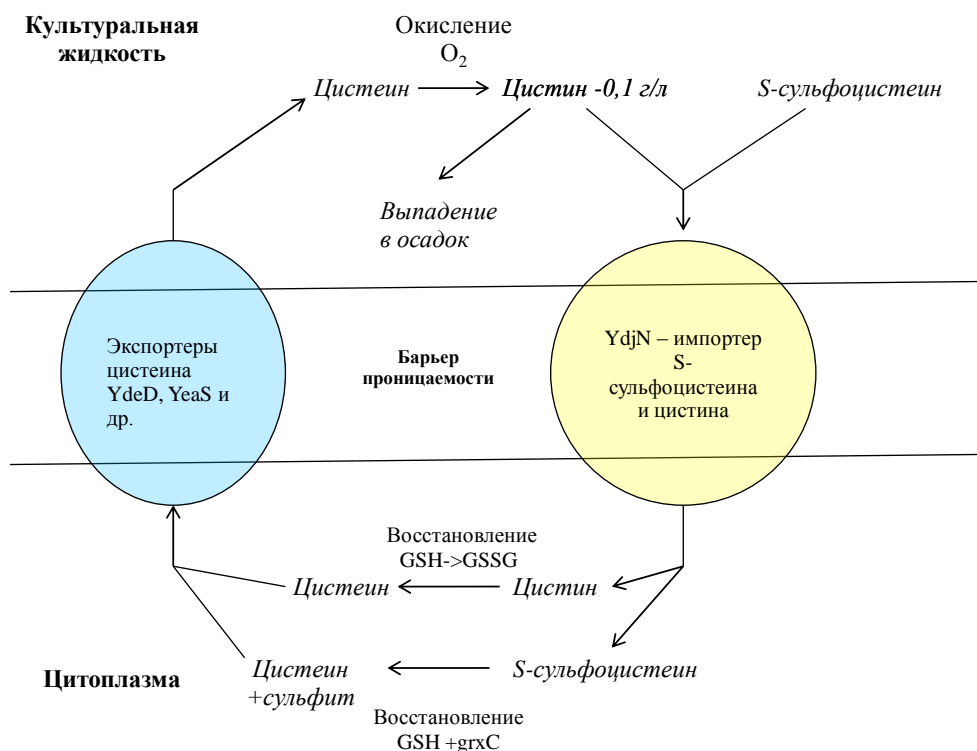


Рис.59. Участие транспортеров цистеина и его серусодержащих производных в круговороте этих веществ, осуществляемого клетками *E.coli*, продуцирующими цистеин.

Не известно также насколько сильна конкуренция СЦ и цистина за общий для них транспортер YdjN, однако надо иметь в виду, что K_m для цистина составляет 2 мкМ, что значительно ниже концентрации цистина в культуральной жидкости (порядка 100 мг/л, или около 400 мкМ), и поэтому транспортер должен работать с максимальной скоростью даже при низких концентрация цистина (ввиду малой растворимости).

3.6.7. Исследование роли гена *ydgR* в усвоении О-ацетилсерина

В культуральных жидкостях продуцентов цистеина на основе *E. coli* и *P.ananatis* наряду с целевым продуктом, цистеином, происходит накопление гидроксиглутаровой кислоты (см. раздел 3.6.2.), а также двух предшественников

цистеина – O-ацетилсерина (АС) и, при использовании тиосульфата в качестве источника серы, – S-сульфоцистеина (СЦ) (см. 3.6.6). В данном разделе рассматривает проблема побочной продукции АС – непосредственного предшественника цистеина при использовании сульфата и тиосульфата в качестве источников серы (см. Рис.51).

Накопление АС, очевидно, является результатом несогласованности скорости синтеза углеродного скелета цистеина и скорости ассимиляции серы и ее восстановление до сульфида (при использовании сульфата). При использовании тиосульфата появление в среде роста АС обуславливается недостаточным количеством тиосульфата или недостаточной активностью цистеинсинтазы CysM. Отметим, что АС с той или иной скоростью в зависимости от рН способен неферментативно необратимо изомеризоваться с образованием N-ацетилсерина. Это вещество уже не может быть использовано для синтеза цистеина и просто накапливается в среде.

Чтобы уменьшить потери в связи с накоплением в среде АС и N-ацетилсерина, было целесообразно не только улучшить баланс между потоком углерода и серы на синтез цистеина, но также изучить возможность усиления поглощения O-ацетилсерина клетками из культуральной жидкости. В литературе отсутствуют какие-либо данные об импортерах O-ацетилсерина, однако известно, что это вещество поглощается из среды мутантами по гену *cysE*, что обеспечивает рост этих недостаточных по цистеину мутантов. Этот факт указывает на существование таких белков-импортеров.

Чтобы найти гены, контролирующие поглощение АС культуру штамма *E. coli* MG1655 Δ *cysE*, недостаточного по цистеину за счет делеции гена *cysE*, подвергали процедуре мутагенеза с использованием инсерции гена устойчивости к канамицину. Использовали набор фирмы Illumina (EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit Cat. No. TSM99K2) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные канамицин-резистентные клетки высевали на жидкую среду, содержащую АС (вместо цистеина) и двукратно проводили

обработку пенициллином. После двух циклов пенициллинового обогащения и высева на агаризованную среду удалось отобрать 26 клонов (из 1200), не растущих на АС в присутствии сульфида натрия, чтобы исключить мутантов по восстановлению серы, но растущих на цистеине. В хромосомах 26 полученных клонов были определены локализации инсерций гена устойчивости к канамицину путем секвенирования примыкающих фрагментов хромосом, используя для этого праймеры, включенные в состав инсертированной последовательности ДНК. Как показало сопоставление полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностью хромосомы *E.coli*, большинство посадок транспозона (22 из 26) произошли в ген *cysB*, (позитивный регулятор экспрессии генов *Cys*-регулона, включая ген *cysK*, кодирующий цистеинсинтазу, без которой невозможен синтез цистеина из АС. В остальных 4-х клонх обнаружены инсерционные инактивации генов *cysK* и *cysM*, кодирующие цистеинсинтазы. В одном из этих клонов произошла двойная инсерция одновременно в гены *cysK* и *cysM* с частотой около 10^{-12} от общего количества инсерций транспозона. Повидимому, данный метод не позволяет отобрать мутанты по транспорту АС, что связано, вероятно, с множественностью систем, способных импортировать это вещество. Тем не менее, представляет интерес обнаруженный факт об абсолютной необходимости регуляторного белка *CysB* для экспрессии генов для цистеинсинтаз *CysK* и *CysM*. Наблюдается полное «молчание» этих генов в отсутствие продукта гена *cysB*.

Другой подход, использованным нами, оказался более успешным. Он был основан на предположении, что АС транспортируется в клетки одной из систем транспорта протеиногенных аминокислот, учитывая тот факт, что АС также является аминокислотой (непротеиногенной). Аминокислота, транспортируемая такой системой, должна конкурировать с АС за транспорт в клетки. Действительно, смесь всех аминокислот (за исключением, естественно, цистеина) подавляла рост штамма *E. coli* MG1655 Δ *cysE* на среде с АС в качестве источника цистеина.

Для дальнейшего поиска транспортеров АС мы предположили, что, возможно, АС транспортируется в клетки одной из систем транспорта канонических аминокислот, учитывая тот факт, что АС также является аминокислотой (неканонической). Аминокислота, транспортируемая такой системой, должна конкурировать с АС за транспорт в клетки. Действительно, смесь всех канонических аминокислот (за исключением, естественно, цистеина) подавляла рост штамма *E. coli* MG1655 Δ cysE на среде с АС в качестве источника цистеина. Более детальный анализ сузил круг ингибирующих аминокислот до трех: метионина, лейцина и глутамин. Каждая из этих аминокислот в отдельности незначительно ингибировали рост на АС, однако смесь этих аминокислот действовала достаточно эффективно.

В поисках транспортера АС, предположительно ингибируемого данной смесью аминокислот, штамм *E. coli* MG1655 Δ cysE был трансформирован плазмидным банком хромосомы штамма MG1655 дикого типа и высеян на агар, содержащий АС и смесь ингибирующих аминокислот. Клоны, способные к росту в этих условиях, были отобраны, и вставки хромосомы в составе плазмид были секвенированы. В ставках были обнаружены гены *marC*, *uchE*, *yhgN*, *sdsRQP*. Все эти гены кодируют не импортеры, а, наоборот, экспортеры из группы трансмембранных белков – факторов множественной лекарственной устойчивости. Основываясь на этом, мы предположили, что амплификация данных генов приводила лишь к ослаблению ингибирующего действия аминокислот на транспорт АС. То есть, эти помпы откачивали поглощаемые клетками аминокислоты, снижая их внутриклеточную концентрацию. Этот факт указывает также на то, что ингибирующие рост на среде с АС эти три аминокислоты, не являются конкурентами АС за транспорт внутрь клеток, а, возможно, способствуют репрессии гена (-ов), контролирующего транспорт АС.

В связи с этим предположением из хромосомы штамма *E. coli* MG1655 Δ 5 MG1655 Δ cysE гены *marC*, *uchE*, *yhgN*, *sdsRQP* были делетированы. Полученный штамм, (делетированы 5 генов, включая *cysE*) был трансформирован плазмидами,

содержащими банк генов (вектор pSTV24) этого же штамма, для отбора трансформантов, растущих на среде с АС в присутствии ингибирующей смеси аминокислот. В полученных усваивающих АС трансформантах обнаружены плазмиды со вставками нескольких генов, однако наше внимание привлек ген *ydgR*, поскольку он кодировал белок, содержащий трансмембранные домены (12 или 13) и, как известно из литературы, является протон-зависимым транспортером ди- и трипептидов [329]

Ген *ydgR* был клонирован на векторе pMIW118 под контролем промотора гена *nlpD* кишечной палочки и полученная плазида была введена в уже упомянутый штамм MG1655 Δ 5. Штамм, с плазмидой pMIW118-PnlpD8-*ydgR* приобрел способность к усвоению АС в присутствии всех 19 аминокислот. Кроме того, этот штамм с большей скоростью потреблял АС из жидкой среды, чем его бесплазмидный вариант (Рис. 60).

Белок YdgR (новое название - DtpA) является прокариотическим пептидным транспортером, использующий симпорт протонов внешней стороны цитоплазматической мембраны [330 - 332].

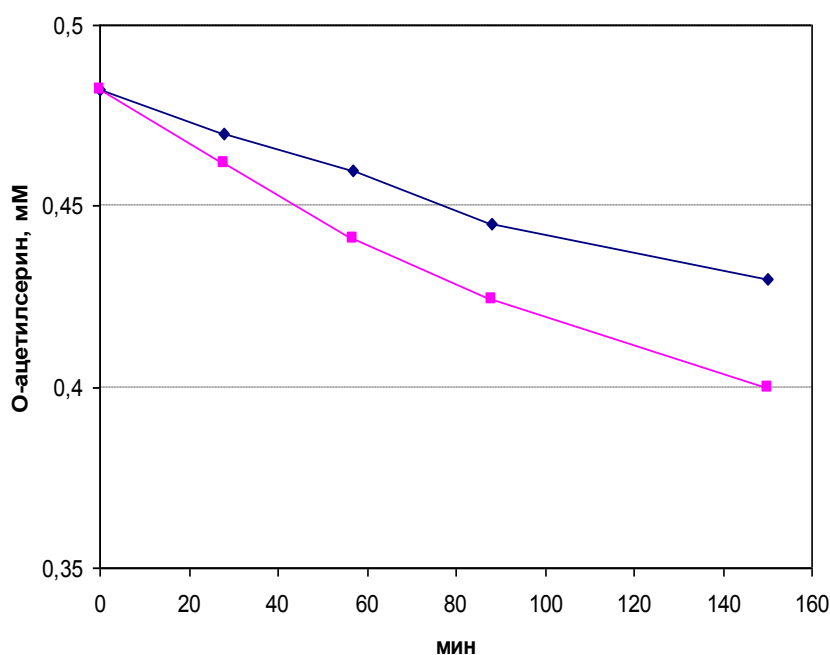


Рис.60. Поглощение О-ацетилсерина из среды в присутствии клеток штаммов MG1655 Δ 5 (верхняя кривая) и MG1655 Δ 5/pMIW118-PnlpD8-*ydgR* (нижняя кривая).

Родственные белки (PEPT1) обнаружены у млекопитающих и в том числе у человека. Они транспортируют практически все ди- и трипептиды, а также многие молекулы их напоминающие, например, бета-лактамы антибиотики и многие лекарственные препараты.

YdgR из *E.coli* имеет сходную субстратную специфичность. Способность поглощать из среды АС не изучалась ранее ни в отношении белка YdgR, ни PEPT1. Однако учитывая широкий спектр транспортируемых молекул, показанный для этих белков, способность транспортировать АС, который является сложным эфиром серина и уксусной кислоты является вполне ожидаемой. Естественно, YdgR не является специализированным транспортером АС – этот субстрат соответствует уже изученным транспортным способностям этого мембранного белка. Тем не менее, сверх-экспрессия гена *udgR* может использоваться для уменьшения потери углеродного предшественника цистеина при его выделении в ферментационную среду. Этот подход к снижению примесного накопления АС пока не нашел практического применения.

Результаты исследования, описанного в разделе 3.6 опубликованы:

- Гусятинер М.М., Зиятдинов М.Х. Продукция 2-гидроксиглутаровой кислоты – необходимый процесс при протекании катализируемых 3-фосфоглицератдгидрогеназой реакций в клетках *Escherichia coli* // Обзорный журнал по химии. 2015. т.5. №1. с. 25-36
- Kai Y., Kashiwagi T., Ishikawa K., et al. Engineering of *Escherichia coli* L-serine O-acetyltransferase on the basis of crystal structure: desensitization to feedback inhibition by L-cysteine // *Protein Eng Des Sel*. 2006. V.19. №4.pp. 163-7
- Касиваги Т., Каи Ю. Исикава К, Сузуки Э., Такаги Х., Зиятдинов М.Х., Редькина Е.И., Гусятинер М.М. Мутантная серинацетилтрансфераза... Патент России 2279477 (2003). Патент США 7312058. Европейский патент EP 1650296
- Зиятдинов М.Х., Самсонов В.В., Гусятинер М.М. Способ получения цистеина, цистина, S-сульфоцистеина или тиазолидинового производного цистеина, или их смеси с использованием бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Патент России 2458982 (2012)

- Зиятдинов М.Х., Самсонов В.В., Гусятинер М.М. Способ получения цистеина с использованием бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Патент России 2458981 (2010).
- Зиятдинов М.Х. Исследование метаболизма цистеина у *Escherichia coli* // автореф. дис. канд. биол. наук : 03.01.04. М. 2013. 23 С.

Заключение

1. **Метод обогащения мутантами ГПКБ.** Селекция мутантов ГПКБ, дефектных по биосинтезу необходимых метаболитов (аминокислот, нуклеиновых оснований, витаминов и др.), а также по усвоению внешних источников углерода, азота, серы была весьма трудоемкой из-за отсутствия методов обогащения такого рода мутантами. Нами показано, что пенициллин подавляет рост ГПКБ, не вызывая их гибели, что не позволяет обычную методику пенициллинового обогащения негативными мутантами. Последующее воздействие лизоцимом вызывает гибель ранее обработанных пенициллином растущих клеток. Последовательная обработка пенициллином и затем лизоцимом позволяет обогащать культуру негативными мутантами в сотни раз. Этим методом получены мутанты недостаточные по различным аминокислотам, неспособные усваивать аминокислоты в качестве источника углерода, мутанты по генам центрального метаболизма.

2. **Методы пермеабиллизации клеток ГПКБ и *Escherichia coli*.** Для разрушения клеток ГПКБ ультразвуком требуется длительная обработка (до 30 мин), сопровождающаяся нагреванием, что приводит к частичной денатурации ферментов и часто дает ошибочные результаты, в особенности касающиеся аллостерических свойств. Испытав ряд мембранотропных агентов, мы нашли, что наиболее эффективным и простым способом пермеабиллизации клеток является обработка антибиотиком грамицидином С. Пермеабиллизация происходит практически мгновенно, при этом ферменты полностью сохраняют свойства, что важно при определении их чувствительности к аллостерическим ингибиторам.

Эффективный метод пермеабиллизации клеток *E.coli* с целью их использования в качестве катализатора в реакциях биотрансформации предложен и апробирован при трансформации глутамата в гамма-аминомасляную кислоту под действием глутаматдекарбоксилазы. Метод основан на нарушении барьера проницаемости (лизис) клеток *E.coli* при их нагревании до 50 – 60⁰С. Этот прием

используется только в том случае, если целевой фермент достаточно термостабилен. Метод применен при разработке способа получения гамма-аминомасляной кислоты, в котором использовались клетки, эффективно экспрессирующие ген *gadA*, кодирующий глутаматдекарбоксилазу. Выращенные клетки хранились в замороженном виде, а перед проведением биотрансформации клетки оттаивались и прогревались при 53⁰С, затем помещались в среду, содержащую глутамат. 1 г сырого веса клеток продуцировал 23 г ГАМК с выходом 99% теоретического. Статья с описанием данного метода цитирована в более 70-ти последующих исследованиях.

3. Механизм продукции фенилаланина ГПКБ ауксотрофными по тирозину мутантами. Ранее описаны нуждающиеся в тирозине мутанты ГПКБ продуцирующие фенилаланин, хотя механизм его продукции не имел непротиворечивого объяснения, поскольку не учитывался особый, присущий ГПКБ, арогенатный путь биосинтеза. Полученные нами тирозиновые ауксотрофы также накапливали фенилаланин в периодической культуре без поддержания рН, однако при поддержании рН ферментационной среды выше 7 происходило накопление не фенилаланина, а непосредственного предшественника тирозина – арогената и общего предшественника фенилаланина и тирозина - префената. Арогенат при снижении рН превращался в фенилаланин, а префенат – в фенилпируват, предшественник фенилаланина. Этим объясняется кажущуюся продукцию фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами в периодической культуре при естественном подкислении среды роста. Продукция арогената вызвана освобождением ДАГФ-синтазы от ретроингибирования в условиях голодания по тирозину, что усиливает поток углерода в направлении префената и арогената. Последний не может превратиться в тирозин (блокирована стадия превращения арогената в тирозин) и выделяется в среду. Таким образом, продукция фенилаланина происходит без участия ферментов пути биосинтеза фенилаланина из префената.

4. Механизм продукции фенилаланина ауксотрофными мутантами, нуждающимися одновременно в тирозине и фенилаланине. Несмотря на блокирование фермента, необходимого для превращения префената в фенилаланин, эти двойные мутанты накапливали фенилаланин в периодической культуре, но при поддержании рН среды (7,0 – 7,5) происходит накопление арогената. Голодание по тирозину и фенилаланину освобождает ДАГФ-синтазу от ингибирования, усиливая поток углерода в направлении арогенату, который экскретируется. Последний неферментивно превращается в фенилаланин при подкислении среды.

5. Механизм продукции фенилаланина прототрофными мутантами, устойчивые к аналогу фенилаланина (мета-фторфенилаланин). Механизм продукции аналогичен таковому у двойных $\text{Tyr}^- \text{Phe}^-$ мутантов. Но в отличие от них освобождение ДАГФ-синтазы от ингибирования конечными продуктами обусловлено мутацией в гене, кодирующем этот фермент.

6. Механизм продукции фенилаланина тирозин-недостаточными мутантами, устойчивые к аналогу фенилаланина (мета-фторфенилаланин). Среди таких мутантов, наибольшая продукция фенилаланина обнаружена у штамм 6-27, у которого выявлена десенсбилизация двух ферментов: ДАГФ-синтазы и первого фермента в пути превращения префената в фенилаланин – префенатдегидратазы. Продукция фенилаланина этим штаммом происходит чисто ферментативно и внутриклеточно без накопления арогената. Десенсбилизированная префенатдегидратаза перенаправляет пул префената на синтез фенилаланина, препятствуя превращению префената в арогенат. Мутация, вызвавшая десенсбилизацию префенатдегидратазы (ген *pheA*) к ингибированию фенилаланином (*Ser235Pro*), находится в выявленном нами регуляторном домене АСТ, который ранее обнаружен в некоторых белках, чувствительных к ретроингибированию.

7. Деградация фенилаланина клетками *S. glutamicum* ATCC 13032. С помощью меченого изотопом ^{14}C фенилаланина обнаружена способность клеток

C. glutamicum деградировать фенилаланин с образованием ароматического вещества неустановленной природы. Для деградации фенилаланина необходима арогенатдегидратаза, поскольку блокирование этого фермента приводит к неспособности к деградации фенилаланина. Учитывая, что арогенатдегидратаза обладает декарбоксилазной активностью в отношении арогената, то вероятным продуктом деградации фенилаланина клетками *C. glutamicum* под действием этого фермента является фенилэтиламин.

8. Возможное использование результатов исследования механизмов продукции фенилаланина ГПКБ. Полученные данные указывают на новую возможность создания продуцентов фенилаланина на основе ГПКБ с использованием арогенатного пути биосинтеза тирозина. Блокирование арогенатдегидратазы приводит к прекращению деградации фенилаланина и накоплению арогената. При рН-статировании среды в нейтральной области, чтобы избежать превращения арогената в фенилаланин, можно ожидать высокого уровня накопления арогената, который не вызывает торможения реакций пути биосинтеза ароматических аминокислот, не являясь конечным продуктом, и поэтому можно использовать неизмененные ферменты дикого типа, увеличив экспрессию соответствующих генов. После окончания процесса накопления арогената следует снизить рН среды для ферментативного превращения арогената в фенилаланин.

9. Устранение деградации треонина с участием треониндегидрогеназы у продуцентов треонина на основе *E. coli*. После создания с участием автора высокоэффективных продуцентов треонина с использованием методов генной инженерии, в ферментационных средах обнаружен в значительных концентрациях продукт деградации треонина – аминокетон. Это свидетельствовало о функционировании пути деградации треонина, в котором первую реакцию катализирует фермент треониндегидрогеназа. Для блокирования этого фермента был создан штамм, нуждающийся в глицине, способный к росту на треонине вместо глицина, который является одним из конечных продуктов

деградации треонина. С использованием транспозонного мутагенеза (транспозон Tn5) с последующим пенициллиновым обогащением получен мутант, не способный усваивать треонин как источник глицина, у которого отсутствовала активность треониндегидрогеназы в результате инсерции Tn5 в ген, ее кодирующий. Генетический перенос этой инсерции в хромосому продуцентов треонина обусловил повышение уровня продукции треонина на 30%. Штаммы-продуценты треонина с инактивацией гена, кодирующего треониндегидрогеназу, защищены патентами в России и за рубежом и используются в промышленном производстве треонина.

10. Установлено положение гена *tdh* (конъюгация, общая трансдукция), кодирующего треониндегидрогеназу, на генетической карте *E.coli* K12 (81-ая минута карты).

11. Участие серинтрансгидроксиметилазы в деградации треонина. Установлено, что серинтрансгидроксиметилаза (ген *glyA*) катализирует треонинальдолазную реакцию с образованием глицина и уксусного альдегида.

12. Оценка роли ферментов, участвующих в деградации треонина клетками *E.coli*. Показано участие трех ферментов – треониндезаминазы (*ilvA*), треониндегидрогеназы (*tdh*) и серинтрансгидроксиметилазы (*glyA*) в поглощении треонина из среды роста. Наибольший вклад в этот процесс вносит треониндезаминаза, метаболизируя треонин в количестве, значительно превышающем необходимое для синтеза изолейцина, что указывает на нецелевое превращение предшественника изолейцина, альфа-кетобутирата. Вклад треониндегидрогеназного и серинтрансгидроксиметила пути в потребление треонина приблизительно равный.

13. Возможное использование результатов исследования деградации треонина клетками *E.coli*.

- Если результаты исследования по деградации треонина с участием треониндегидрогеназы немедленно нашли применение при конструировании продуцентов треонина, то данные об участии серинтрансгидроксиметилазы в этом

процессе пока не используются на практике. Это связано с тем, что блокирование активности этого фермента приводит к необходимости введение в среду роста глицина, а также снижает уровень образования C1-соединений, замедляющее скорость роста клеток и процесс биосинтеза треонина. Тем не менее, представляется перспективным снижение активности данного фермента до уровня, при котором сохраняется достаточный синтез C1-соединений при снижении уровня деградации треонина.

- У современных продуцентов треонина отсутствует мутация в гене *ilvA*, блокирующая треониндезаминазу. Учитывая наши данные об относительно высоком вкладе треониндезаминазы в деградацию треонина, что однако не приводит к сверхсинтезу изолейцина, считаем целесообразным исследование возможности снижения избыточной активности треониндезаминазы до уровня, при котором сохраняется достаточная активность для синтеза изолейцина.

13. Механизм продукции альфа-гидроксиглутаровой (2-ГГ) кислоты в качестве примеси при продукции цистеина продуцентами на основе E.coli. В культуральной жидкости продуцентов цистеина нами обнаружено накопление значительного количества альфа-гидроксиглутаровой кислоты (2-ГГ), которая по литературным данным образуется из альфа-кетоглутаровой (2-КГ) в побочной реакции, катализируемой первым ферментом пути биосинтеза серина 3-фосфоглицератдегидрогеназы (серин синтезируется из серина). Сопоставление констант Михаэлиса для субстратов и продуктов реакции с их внутриклеточными концентрациями привело к следующему выводу. Поскольку фермент обладает необычайно высоким сродством к восстановленной форме кофактора NADH (K_m менее 10 нМ), то вместо диссоциации комплекса E-NADH происходит восстановление 2-КГ до 2-ГГ за счет окисления NADH до NAD^+ . После этого комплекс E- NAD^+ способен окислить свой главный субстрат, 3-фосфоглицерат, с образованием интермедиата серинового пути, 3-фосфогидроксипирувата. В результате вновь образуется недиссоциирующий комплекс E-NADH, и цикл повторяется. Таким образом, окисление главного

субстрата происходит за счет восстановления 2-КГ с образованием 2-ГГ, и продукция 2-ГГ происходит эквимольно по отношению к потоку молекул-предшественников серина и цистеина. По этому механизму 3-фосфоглицератдегидрогеназа в *E.coli* является не дегидрогеназой, а трансгидрогеназой, переносящей гидрид-ион от субстрата прямой реакции на 2-КГ. NAD выполняет роль переносчика гидрид-иона, будучи постоянно связанным с белком-ферментом.

14.Рекомендации, вытекающие из анализа механизма реакции 3-фосфоглицератдегидрогеназы в *E.coli*. При создании продуцентов серина, а также цистеина, триптофана, нуклеиновых оснований на основе кишечной палочки и, видимо, других энтеробактерий побочная продукция 2-ГГ неизбежна. Для её устранения целесообразно использовать чужеродные бактериальные гены *serA*, кодирующие данный фермент, не продуцирующий 2-ГГ. К таковым относится, ген *serA* из, например, *S.glutamicum*. Альтернативой этому подходу является обнаружение и усиление метаболического пути усвоения 2-ГГ в клетках самой *E.coli*.

15.Десенсбилизация О-серинацетилтрансферазы (ОАС) к ингибированию цистеином для создания продуцента цистеина на основе *E.coli*. Для введения мутаций, нарушающих конкурентное ингибирование цистеином, на основании рентгеноструктурного исследования ОАС с помощью компьютерного моделирования получена модель сайта фермента, связывающего серин (субстрат) и цистеин (ингибитор). Найден аминокислотный остаток белка (Asp92), образующий водородную связь с цистеином, но не с серином. В петлю, его содержащую, с помощью сайт-специфического мутагенеза введены случайные аминокислотные замены, меняющие расстояние от Asp92 до цистеина. Отобраны мутанты, сохранившие каталитическую активность, но утратившие чувствительность к ингибированию цистеином. Наиболее эффективные замены лишь незначительно искажают структуру альфа-спирали в которой находится Asp92, но смещают его на расстояние, при котором

водородная связь с ингибиторной молекулой цистеина не образуется. На основе полученных мутантов сконструированы эффективные продуценты цистеина, нашедшие применение в производстве цистеина, защищенные патентом Российской Федерации, а также зарубежными патентами.

16. Механизм восстановления S-сульфоцистеин до цистеина в E.coli.

Обнаружено, что продуценты цистеина при использовании тиосульфата в качестве источника серы помимо целевых продуктов (цистин, цистеин) накапливают S-сульфоцистеин (предшественник цистеина в пути превращения O-ацетилсерина в цистеин). С помощью мутанта, неспособного усваивать S-сульфоцистеин, показано, что восстановление этого вещества до цистеина происходит с помощью глутатиона. Процесс восстановления протекает ферментативно с участием нескольких глутаредоксинов, причем наибольший вклад (около 60%) вносит глутаредоксин C (ген *gtxC*). Повышенная экспрессия гена *gtxC*, помещенного под контроль сильного промотора, снижает накопление S-сульфоцистеина и повышает уровень продукции цистеина продуцентами этой аминокислоты. Усиление экспрессии гена *gorA*, кодирующего глутатионредуктазу, приводит к дальнейшему увеличению продукции (патент РФ 2458981).

17. Транспорт S-сульфоцистеина в клетки E.coli. Показано, что делеция неаннотированной рамки считывания *udjN* приводит к неспособности *E.coli cysE* расти на S-сульфоцистеине в качестве источника цистеина. Соответствующий белок содержит 8 трансмембранных доменов и, по-видимому, является белком-транспортером серусодержащих соединений. Плазмидная амплификация гена *udjN* приводит к усилению поглощения клетками экзогенного цистина и S-сульфоцистеина (но не цистеина), тогда как делеция этого гена наоборот резко снижает транспорт этих аминокислот в клетки. Обсуждается участие транспортера *YdjN* в процессе продукции цистеина.

18. Транспорт O-ацетилсерина в клетки E.coli. Непосредственный предшественник цистеина – O-ацетилсерин накапливается в среде при продукции

цистеина. Исследование, направленное на поиск импортеров О-ацетилсерина с целью их использования для снижения побочной продукции этого вещества, привело к обнаружению белка YdgR, способствующего поглощению О-ацетилсерина клетками *E.coli*. Белок в своей структуре содержит 12-13 трансмембранных доменов и является родственным широко распространенным в про- и эукариотах протон-зависимым транспортером ди- и трипептидов. Однако способность такого рода транспортеров импортировать О-ацетилсерина ранее не отмечалась.

Литература

1. Ikeda K. New seasoning // J. Of Chemical Society of Tokyo. 1909. V. 30. pp. 820 – 836 (1909). Цит. по переводу на англ. Chem. Senses. 2002. V.27. pp 847-849.
2. Lindemann B., Ogiwara Y., Ninomiya Y.. Discovery of umami // Chem.Senses. 2002. V. 27. pp 843-844.
3. Chaudhari N., Landin A.M., Roper S.D. A novel metabotropic glutamate receptor functions as a taste receptor //Nat. Neurosci. 2000. V. 3. pp.113-119.
4. Nelson G., Chandrashekr J., Hoon M.A. et al. An amino-acid taste receptor // Nature 2002 V.416. pp. 199-202.
5. Li X., Staszewski L., Xu H. et al. Human receptors for sweet and umami taste // Proc Natl Acad Sci USA. 2002. V. 99. pp. 4692-4696
6. Sano C. History of glutamate production //Am J Clin Nutr. 2009, V. 90. pp. 728-732.
7. Mizoguchi N., Hara M., Ito K. et al. Separation of racemic substances. US Patent 3266871, 1966
8. Addison A. The monosodium glutamate story // J Chem Education. 2004. V. 81 pp. 347-355.
9. Kinoshita S., Udaka S., Shimamoto M. Studies on amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms // J Gen Appl Microbiol 1957. V. 3. pp. 193-205.
10. Udaka S. Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus* // J Bacteriol. 1960. V. 79. pp.754-5.
11. Shiio I., S. Otsuka, Takahashi M. Effect of biotin on bacterial formation of glutamic acid. Part I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids // J.Biochem. 1962. V. 51. pp. 56-62.

12. Takinami K., Yoshii H., Tsuru H. et al. Biotin-Tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum* // *Agric. Biol. Chem.* 1965. V.29. pp.351-359.
13. Shibui M., Kurima T., Okabe S. et al. Glutamic acid production // *Amino acid and nucleic acid.* 1968. V.17. pp. 61-65
14. Radmacher E., Stansen K., Besra G. et al. Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum* // *Microbiology.* 2005. V. 151. pp.1359-1368.
15. Suzuki M., Nakao Y. Culture conditions for the production of L-glutamic acid from n-paraffins by glycerol auxotroph GL-21 // *Agric. Biol. Chem.* 1972. V. 36 pp.1141-1146.
16. Kitano, K., Sugiyama Y., Kanzaki T. L-Glutamate fermentation with acetic acid by an oleic acid requiring mutant. II. Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate // *J. Ferment. Technol.* 1972. V.50. pp.182-191.
17. Shiio I., Otsuka S., Katsuya N. Cellular permeability and extracellular formation of glutamic acid in *Brevibacterium flavum* // *J. Biochemistry.* 1962 V. 53. No.5. pp. 333-341.
18. Duperray F., Jezequel D., Ghazi A. et al. Excretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum* triggered by surfactants // *Biochem. Biophys. Acta.* 1992. V.1103. pp. 250-8.
19. Shiio, I., Otsuka S., Katsuya M. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. II. Metabolism of glucose // *J. Biochem.* 1962. 52:108-116
20. Demain, A. L., Birnbaum J. Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1968. V.46. pp. 1-25.
21. Bunch, A. W., Harris R.E. The manipulation of microorganisms for the production of secondary metabolites // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 1986. V. 4. pp. 117-144.

22. Shiiro I., Otsuka S., Katsuya N. Effect of Biotin on the Bacterial Formation of Glutamic Acid: II. Metabolism of Glucose // *J. Biochem.* 1962. V. 52. pp.108 – 116.
23. Shiiro I., Otsuka S., Takahachi M. Significance of α -Ketoglutaric Dehydrogenase on the Glutamic Acid Formation in *Brevibacterium flavum* // *J. Biochem.*, 1962. V. 50, 164-165.
24. Shiiro I., Ujigawa-Takeda K. Presence and Regulation of α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex in a Glutamate-Producing Bacterium, *Brevibacterium flavum* // *Agric. Biol. Chem.* 1980. V. 44 pp. 1897- 1904.
25. Kinoshita S., Takayama S., Akita S. Taxonomical study of glutamic acid accumulating bacteria, *Micrococcus glutamicus*, nov. sp. // *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 1958. V. 22. pp. 176-185
26. Abe S., Takayama K., Kinoshita S. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1967. V.13. pp. 279-301.
27. Su, Y., Yamada K. Studies on L-glutamic acid fermentation. Part I. Isolation of a L-glutamic acid producing strain and its taxonomical studies // *Bull. Agric. Chem. SOC. Jpn.* 1960. V. 24. No.1, pp. 69-74.
28. Okumura S., Tsugawa R., Tsunoda T. et al. Studies on the L-glutamic acid fermentation. Part I. The new bacteria of the genus *Brevibacterium* isolated from the nature to produce L-glutamic acid // *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 1962. V. 36. pp. 141-159.
29. Collins M.D., Pirouz T., Goodfellow M. et al. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria // *J Gen Microbiol.* 1977. V.100. No. 2.pp.221-230.
30. Fidler F., Bude A. Occurrence and chemistry of cell wall teichoic acids in the genus *Brevibacterium* // *J. Gen. Microbiol.* 1989. V.135. pp. 2837-2846.
31. Burkovski A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity // *ISRN Microbiol.* 2013. p. 935736

32. Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W. et al. Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns // *Int J Syst Bacteriol.* 1991. V.41. No.2. pp. 255-260.
33. Mateos L.M., del Real G., Aguilar A. et al. Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase (thr A) gene of *Brevibacterium lactofermentum* // *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. No.24 pp.10598.
34. Peoples O.P., Liebl W., Bodis M. et al. Nucleotide sequence and fine structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum* hom-thrB operon // *Mol Microbiol.* 1988. V. 2. pp. 63-72.
35. Collins M.D. Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* (Cooke and Keith) to the genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987. V. 37. pp. 442-443.
36. Ochik K. Phylogenetic Analysis of Mycolic Acid-Containing Actinomycetes and Allied Taxa by Partial of Ribosomal Protein AT-L30 Wall-Chemotype IV Sequencing // *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 1995. V.45. No.4. pp. 653-660.
37. Stackebrandt E., Rainer A., Ward-Rainey F. Proposal for a new hierarchic classification system actinobacteria classis nov. // *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 1997. V.47. pp. 479-491.
38. Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa // *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 . V. 59. No. 3. pp.589-608.
39. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria // *Journal of Clinical Microbiology* 2012. V.50. No 10. pp. 3152–3158.

40. Becker J., Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels—*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory // *Current Opinion in Biotechnology*. 2012. V. 23. No. 4. pp. 631–640.
41. Gao B., Gupta R.S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. No.1. pp. 66-112.
42. Battistuzzi F.U., Feijao A., Hedges S.B. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land // *BMC Evol. Biol.* 2004. V.4, pp.44.
43. Chapman-Smith A., Cronan J.E. Molecular biology of biotin attachment to proteins // *J Nutr.* 1999. V.129. pp. 477-484.
44. Beckett D. Energetic methods to study bifunctional biotin operon repressor // *Methods Enzymol.* 1998. V. 295. pp. 424-450.
45. Rodionov D.A., Mironov A.A., Gelfand M.S. Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in Eubacteria and Archaea // *Genome Res.* 2002, V. 12. No.10. pp.1507-1516.
46. Jager W., Peters-Wendisch P.G., Yoshihara Y., et al. A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins // *Arch Microbiol*, 1996. V. 166. No. 2. pp. 76-82.
47. Peters-Wendisch P., Stansen K.C., Götker S. et al. Biotin protein ligase from *Corynebacterium glutamicum*: role for growth and L-lysine production // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012. V. 93. No. 6. pp. 2493-2502.
48. Lin S., Hanson R.E., Cronan J.E. Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway // *Nat Chem Biol.* 2010. V.6. No.9. pp.682-688.
49. Lin S., Cronan J.E. Closing in on complete pathway of biotin biosynthesis // *Mol. Biosyst.* 2011. V.7. pp. 1811-1821.
50. Hatakeyama K., Hohama K., Vertès A.A. et al. Genomic organization of the biotin biosynthetic genes of coryneform bacteria: cloning and sequencing of the

- bioA-bioD genes from *Brevibacterium flavum*. // DNA Seq. 1993. V. 4. No.3.pp.177-84.
- 51.Hatakeyama K., Kohama K., Vertes A.A. Analysis of the biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria: cloning and sequencing of the bioB gene from *Brevibacterium flavum* // 1993. DNA Seq. V.4. pp.87–93
- 52.Hatakeyama K., Kobayashi M., Yukawa H. Analysis of biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria: *Brevibacterium flavum* // Methods Enzymol. 2003. V. 279. pp. 339–348
- 53.Kalinowski J., Bathe B., Bartels D. et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins // J Biotechnol. 2003. V.104. pp. 5–25.
- 54.Okumura S., Tsugawa R., Morisaki S. Studies on L-glutamate fermentation // J. Agr. Chem. Soc. 1962. V.36. pp. 204-211.
- 55.Jäger W., Peters-Wendisch P.G., Kalinowski J. et al. A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins // Arch Microbiol. 1996. V.166. No.2. pp.76-82.
- 56.Kimura E., Abe C., Kawahara Y. et al. Gene derived from coryneform bacteria and use thereof // United States Patent 5929221, 1999.
- 57.Kimura E., Abe C., Kawahara Y., Nakamatsu, T. Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum* // Biosci Biotechnol Biochem. 1997. V.60. pp. 1565–1570.
- 58.Gande R., Gibson K.J., Brown A.K. et al. Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*), together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacterianae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis* // J Biol Chem. 2004. V.279. No. 43. pp. 44847-57.

59. Gande R., Dover L.G., Krumbach K. et al. The two carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* essential for fatty acid and mycolic acid synthesis // *J Bacteriol.* 2007. V. 189. No. 14. pp. 5257-64.
60. Kimura E., Kimura E., Abe C. et al. A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997. V.234. pp.157-161.
61. Kimura E., Yagoshi C., Kawahara Y. et al. Glutamate Overproduction in *Corynebacterium glutamicum* Triggered by a Decrease in the Level of a Complex Comprising DtsR and a Biotin-containing Subunit // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1999. V. 63. pp. 1274 – 1278.
62. Kataoka M., Hashimoto K., Yoshida M. et al. Gene expression of *Corynebacterium glutamicum* in response to the conditions inducing glutamate overproduction // 2006. *Lett Appl Microbiol.* 2006 . V.42. No.5. pp. 471-6.
63. Wang Y, Ma S. Recent advances in inhibitors of bacterial fatty acid synthesis type II (FASII) system enzymes as potential antibacterial agents // *ChemMedChem.* 2013, V.8. No.10. pp.1589-608.
64. Gerstmeir R., Wendisch V.F., Schnicke S. et al. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. // *J Biotechnol.* 2003 . V. 104. No.3. pp. 99-122
65. Barzantny H., Brune I., Tauch A. Molecular basis of human body odour formation: insights deduced from corynebacterial genome sequences // *Int J Cosmet Sci.* 2012. V.34. pp. 2-11.
66. Radmacher E., Alderwick L.J., Besra G.S. et al.. Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum* // *Microbiology.* 2005 V. 151. pp. 2421-7.
67. Radmacher E., Alderwick L.J., Besra G.S. et al. , Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum* // *Microbiology.* 2005. V.151. pp. 2421-7.

68. Stuible H.P., Wagner C., Andreou I. et al. Identification and functional differentiation of two type I fatty acid synthases in *Brevibacterium ammoniagenes* // *J Bacteriol.* 1996. V.178. No.16. pp.4787-93
69. Meurer G., Biermann G., Schütz A. Molecular structure of the multifunctional fatty acid synthetase gene of *Brevibacterium ammoniagenes*: its sequence of catalytic domains is formally consistent with a head-to-tail fusion of the two yeast genes FAS1 and FAS2 // *Mol Gen Genet.* 1992. V. 232. No. 1. pp.106-16.
70. Stuible H.P., Meurer G., Schweizer E. Heterologous expression and biochemical characterization of two functionally different type I fatty acid synthases from *Brevibacterium ammoniagenes* // *Eur J Biochem.* 1997. V.247. No. 1. pp. 1. pp. 268-73.
71. Schweizer E., Hofmann J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004. V. 68. No. 3. pp. 501-17
72. Elovson, J., Vagelos P.R. Acyl carrier protein. X. Acyl carrier protein synthetase // *J. Biol. Chem.* 1968. V. 243. pp.3603–3611
73. Lennen R.F., Pflieger B.F. Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids // *Trends Biotechnol.* 2012. V.30. pp.659-667
74. Cho H., Cronan J.R. Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis // *J. Biol. Chem.* 1995. V.270. pp.4216-4219
75. Liu X., Brune D., Vermaas W. et al. Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. V.108. pp.6899-6904
76. Steen E.J., Kang Y., Bokinsky G. et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass // *Nature.* 2010. V. 263. pp. 559-562
77. Takeno S., Takasaki M., Urabayashi A. et al. Development of fatty acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strains // *Appl Environ Microbiol.* 2013. V.79. No. 21. pp. 6776-83

78. Davis M.S., Cronan J.E. Inhibition of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein // *J Bacteriol.* 2001. V. 183. No. 4. pp.1499-503.
79. Kawaguchi A., Okuda S. Fatty acid synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*: formation of monounsaturated fatty acids by multienzyme complex // *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.* 1977. V.74. pp.3180-3183.
80. Nickel J., Irzik K., van Ooyen J. et al. The TetR-type transcriptional regulator FasR of *Corynebacterium glutamicum* controls genes of lipid synthesis during growth on acetate // *Mol Microbiol.* 2010. V.78. No. 1. pp. 253-65.
81. Irzik K., van Ooyen J., Gatgens J., et al. Acyl-CoA sensing by FasR to adjust fatty acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum* // *J. Biotechnol.* 2014. V.192. pp. 96-101
82. Takeno S., Takasaki M., Urabayashi A. et al. Development of fatty acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strains // *Appl Environ Microbiol.* 2013. V.79. No. 21. pp. 6776-83.
83. Schujman G.E., Guerin M., Buschiazzo A. et al. Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria // *EMBO journal.* 2006. V.25. pp.4074-4083
84. Ellis J. M., Wolfgang M.J. A genetically encoded metabolite sensor for malonyl-CoA // *Chem. Biol.* 2012. V.19. pp.1333-1339
85. Funabashi H., Kawaguchi A., Tomada H. et al. Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase // *J. Biochem.* 1989. V. 105. pp.751-755
86. Price, A.C., Choi KH, Heath RJ et al. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin. Structure and mechanism // *J Biol Chem*, 2001. V.276. No. 9. pp. 6551-9.
87. Takeno S., Takasaki M., Urabayashi A. Development of fatty acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strains // *Appl Environ Microbiol.* 2013. V.79. No. 21. pp. 6776-83.

88. Heath R.J., Rock C. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. pp. 10996-11000
89. Hoischen, C., Kramer R. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum* // *J Bacteriol* 1990. V.172. No. 6. pp. 3409-16
90. Hashimoto K., Kawasaki H., Akazawa K. et al. Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate-overproducing *C. glutamicum* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006. V. 70. pp. 22-30
91. Stodola F., Lesuk H. Anderson R.J. The chemistry of the lipids of tubercle bacilli. The isolation and properties of mycolic acid // *J. Biol. Chem* 1938. V.126. pp.505-513
92. Brennan P., Nakaido H. The envelope of Mycobacteria // *Ann. Rev. Biochem.* 1995. V. 64. pp.29-36
93. Liebl W. *Corynebacterium* taxonomy // In Eggeling L., Bott M (eds) *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, 2005. pp. 9-34
94. Hong S., Cheng T.Y., Layre E. et al. Ultralong C100 mycolic acids support the assignment of *Segniliparus* as a new bacteria genus. *PLoS One* 2012. V.7. p. 39017
95. Pawelczyk J., Kremer L. The molecular genetics of mycolic acid biosynthesis // *Microbiol. Spectr.* 2014 V. 2. No. 4 pp.1 – 20
96. Brennan P.J., Nikaino H. The envelope of mycobacteria // *Annu Rev Biochem.* 1995. V.64. pp. 29-63
97. Eggeling, L., Sahn H. The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux // *J. Biosci. Bioeng.* 2001.V. 92. pp.201-213
98. Zuber B., Chami M., Houssin C. et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state // *J Bacteriol.* 2008. V. 190. pp.5672-5680

99. Portevin D., De Souza C., Houssin C. et al. A polyketide synthase catalyses the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. V.101. pp.314–319
100. Portevin D., De Souza-D'Auria C., Bardou F., et al. The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth. Identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components // *J Biol Chem*. 2005. V. 280. pp. 8862–8874.
101. Gande R., Gibson K.J., Brown A.K. et al. Acyl-CoA carboxylases (accD2 and accD3), together with a unique polyketide synthase (Cg-pks), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacteriaceae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis* // *J Biol Chem*. 2004. V. 279. No. 43. pp. 44847-57
102. Gande R., Dover L.G., Krumbach K. et al. The two carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* essential for fatty acid and mycolic acid synthesis // *J Bacteriol*. 2007. V.189. No. 14. pp. 5257-64
103. Lea-Smith D.J., Pyke J.S., Tull D. et al. The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan // *J Biol Chem*. 2007. V. 282. No. 15. pp. 11000-11008.
104. Lanéelle M.A., Tropis M., Daffé M. Current knowledge on mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* and their relevance for biotechnological processes // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013. V. 97. No. 23. pp. 9923-30
105. Wolf A., Krämer R., Morbach S. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress // *Mol Microbiol*. 2003. V. 49. No. 4. pp. 1119-34
106. Puzo G., Tissié G., Aurelle H. et al. Occurrence of 3-oxo-acyl groups in the 6,6'-diesters of alpha-D-trehalose. New glycolipids related to cord factor from *Corynebacterium diphtheria* // *Eur J Biochem*. 1979. V. 98. No. 1. pp. 99-105.

107. Marchand C.H., Salmeron C., Bou Raad R. et al. Biochemical disclosure of the mycolate outer membrane of *Corynebacterium glutamicum* // *J Bacteriol.* 2012. V.194. No. 3. pp. 587-97
108. Puech V., Chami M., Lemassu A. et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane // *Microbiology.* 2001. V.147. No. 5. pp. 1365-82
109. Varela C., Rittmann D., Singh A. et al. MmpL Genes Are Associated with Mycolic Acid Metabolism in Mycobacteria and Corynebacteria // *Chem Biol.* 2012. V. 19. No.4. pp. 498–506.
110. Kalscheuer R., Weinrick B., Veeraraghavan U. et al. Trehalose recycling ABC-transporter LpqY-SacA-SacB-SacC is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. V. 107. pp.21761-21766
111. Yamaryo-Botte Y., Rainczuk A.K., Lea-Smith D.J. et al. Acetylation of trehalose mycolates is required for efficient MmpL-mediated membrane transport in *Corynebacterineae* // *ACS Chem Biol.* 2015. V.10. No.3. pp.734-46
112. Belanger A. E., Besra G. S., Ford M. E. et al. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. V. 93. pp. 11919–11924
113. Tropis M., Meniche X., Wolf A. et al. The Crucial Role of Trehalose and Structurally Related Oligosaccharides in the Biosynthesis and Transfer of Mycolic Acids in *Corynebacterineae* // *J. Biol. Chem.* V. 280, No. 28, 26573–26585, 2005
114. Gebhardt H., Meniche X., Tropis M. et al. The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacterineae* // *Microbiology.* 2007. V. 153. No. 5. pp. 1424-34.

115. Hashimoto K, Kawasaki H, Akazawa K. et al. Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum* // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006. V. 70. No.1. pp. 22-30.
116. Marchand C.H. Raad B., Méniche X. et al. Biochemical Disclosure of the Mycolate Outer Membrane of *Corynebacterium glutamicum* // *Bacteriol.* 2012. V.194. No. 3. pp. 587–597.
117. Bansal-Mutalic R., Nikaido H. Quantative lipid composition of cell envelope of *C. glutamicum* elucidated through reverse micelle extraction // *Proc. Natn.Acad. Sci. U.S.A.* 2011. V.108. pp.15360-15363.
118. Niederweis M. Mycobacterial porins—new channel proteins in unique outer membranes // *Mol. Microbiol.* 2003. V.49. pp. 1167–1177.
119. Barth E., Barceló M.A., Kläckta C. et al., Reconstitution Experiments and Gene Deletions Reveal the Existence of Two-Component Major Cell Wall Channels in the Genus *Corynebacterium* // *J Bacteriol.* 2010. V. 192. No. 3. pp. 786–800.
120. Huc E., Meniche X, Benz R. et al. O-Mycoloylated Proteins from *Corynebacterium*: an unprecedented post-translational modification in bacteria // *J Biol Chem.* 2010. V. 285. No. 29. pp. 21908–21912.
121. Meniche X., Labarre C., Sousa-d'Auria C. t al. Identification of a Stress-Induced Factor of *Corynebacterineae* That Is Involved in the Regulation of the Outer Membrane Lipid Composition // *J Bacteriol.* 2009. V. 191. No. 23. pp. 7323–7332.
122. Rath P., Demange P., Saurel O. et al. Functional Expression of the PorAH Channel from *Corynebacterium glutamicum* in Cell-free Expression Systems // *J Biol Chem.* 2011; V.286. No.37. pp. 32525–32532
123. Rath P., Saurel O., Tropis M et al. NMR localization of the O-mycoloylation on PorH, a channel forming peptide from *Corynebacterium glutamicum* // *FEBS Lett.* 2003. V. 587. No. 22. pp. 3687–3691

124. Costa-Riu N., Maier E., Burkovski A. et al. Identification of an anion-specific channel in the cell wall of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 50. pp.1295–1308
125. Marienfeld S., Uhlemann, E.M., Schmid, R. et al. Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1997. V. 72. pp. 291- 297
126. Lederer E., Adam A., Ciorbaru R. et al. Cell walls of mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties // *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1975. V. 7. No. 2. pp. 87–104.
127. Crick D.C., Mahapatra S., Brennan P.J. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis* // *Glycobiology.* 2001. V.11. No. 9 pp.107-118.
128. Seidel M., Alderwick L.J., Sahn H. et al. Topology and mutational analysis of the single Emb arabinofuranosyltransferase of *Corynebacterium glutamicum* as a model of Emb proteins of *Mycobacterium tuberculosis* // *Glycobiology.* 2007. V.17. No.2. pp.210–219.
129. Sleytr U.B., Schuster B., Egelseer E.M. et al. S- layers: principles and applications // *FEMS Microbiol Rev.* 2014, V.38. No. 5. pp. 823-64.
130. Sleytr U.B., Messner P. Crystalline surface layers on bacteria // *Annu Rev Microbiol.* 1983. V. 37. pp. 311-39.
131. Chami M., Bayan N., Peyret J.L. et al. The S-layer protein of *Corynebacterium glutamicum* is anchored to the cell wall by its C-terminal hydrophobic domain // *Mol Microbiol.* 1997. V. 23. No. 3. pp. 483-92.
132. Joliff G., Mathieu L., Hahn V. et al. Cloning and nucleotide sequence of the *csp1* gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of *Corynebacterium glutamicum*: the deduced N-terminal region of PS1 is similar to the *Mycobacterium* antigen 85 complex // *Mol Microbiol.* 1992. V. 6. No. 26. pp. 2349-62.

133. Peyret J.L., Bayan N., Joliff G., et al. Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum* // *Mol Microbiol.* 1993 Jul;9(1):97-109.
134. Scheuring S., Stahlberg H., Chami, M., et al. Charting and unzipping the surface layer of *Corynebacterium glutamicum* with the atomic force microscope // *Mol. Microbiol.* 2002. V.44. pp. 675-684.
135. Bayan N., Houssin C., Chami M., Leblon G. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications // *J Biotechnol.* 2003. V.104. pp. 55-67.
136. Soual-Hoebeke E., de Sousa-D'Auria C., Chami M. et al., S-layer protein production by *Corynebacterium* strains is dependent on the carbon source // *Microbiology.* 1999. V. 145. No. 12. pp.3399-408.
137. Hansmeier N., Albersmeier A., Tauch A. et al. The surface (S)-layer gene *cspB* of *Corynebacterium glutamicum* is transcriptionally activated by a LuxR-type regulator and located on a 6 kb genomic island absent from the type strain ATCC 13032 // *Microbiology.* 2006. V.152. pp. 923-35.
138. Puech V., Chami M., Lemassu A. et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane // *Microbiology.* 2001, V.147. No.5. pp. 1365-82
139. Dupres V., Alsteens D., Pauwels K., Dufrêne Y.F.. In vivo imaging of S-layer nanoarrays on *Corynebacterium glutamicum* // *Langmuir.* 2009. V.25. No.17. pp. 9653-5
140. Matsuda Y., Itaya H., Kitahara Y. et al. Double mutation of cell wall proteins CspB and PBP1a increases secretion of the antibody Fab fragment from *Corynebacterium glutamicum* // *Microb Cell Fact.* 2014. V. 13. No.1. p.56
141. Tateno T., Fukuda H., Kondo A. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis* alpha-

- amylase using cspB promoter and signal sequence // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. V.77. No.3. pp. 533-41.
- 142.Dmitriev B.A., Ehlers S., Rietschel E.T. Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function // *Med Microbiol Immunol.* 1999. V.187. pp. 173–181
- 143.Dmitriev B.A., Toukach F.V., Schaper K.J. et al. Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model. *J Bacteriol.* 2003. V. 185. pp. 3458–3468
- 144.Meroueh S.O., Bencze K.Z., Heseck D. et al. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan // *Proc Natl Acad Sci USA* 2006. V.103. pp.4404–4409.
- 145.Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture // *FEMS Microbiol Rev.* 2008. V. 32. No.2. pp. 149-67.
146. Breukink E., van Heusden H.E., Vollmerhaus P.J. et al. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes // *J. Biol Chem.* 2003. V. 278. No. 22. pp. 19898-903.
- 147.Kramer N.E., Smid E.J., Kok J. et al. Resistance of Gram-positive bacteria to nisin is not determined by lipid II levels // *FEMS Microbiol Lett.* 2004. V. 239. No. 1. pp.157-61.
- 148.de Kruijff B., van Dam V., Breukink E. Lipid II: a central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008. V.79. pp.117-21
- 149.Sham L.T., Butler E.K., Lebar M.D. et al. Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis // *Science.* 2014. V.11. V.345. pp.220-2.
- 150.Meeske A.J., Sham L.T., Kimsey H., et al. MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. V.112. No.20. pp. 6437-42

151. Sieger B., Schubert K., Donovan C., Bramkamp M. The lipid II flippase RodA determines morphology and growth in *Corynebacterium glutamicum* // *Mol. Microbiol.* 2013. V.90. No. 5. pp. 966-82.
152. Donovan C., Bramkamp M. Cell division in *Corynebacterineae* *Front Microbiol.* 2014, V. 5:132. pp.1 – 16.
153. Schleifer K. H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cellwalls and their taxonomic implications // *Bacteriol. Rev.* 1972. V.36. pp.407–477
154. Wehrmann A., Philipp B., Sahm H., Eggeling L. Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: a study with *Corynebacterium glutamicum* // *J Bacteriol.* 1998. V.180. No.12. pp.159-65.
155. Levefaudes M., Patin D., de Sousa-d'Auria C. et al. Diaminopimelic Acid Amidation in *Corynebacteriales* // *J Biol Chem.* 2015. V.290. No.21. pp. 13079-94
156. Bernard E., Rolain T., Courtin P. et al. Identification of the amidotransferase AsnB1 as being responsible for meso-diaminopimelic acid amidation in *Lactobacillus plantarum* peptidoglycan // *J Bacteriol.* 2011, V.193. No. 22. pp.6323-30
157. Hirasawa T., Wachi M., Nagai K. A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *ltsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production // *J Bacteriol.* 2000. V.182. No. 10. pp. 2696-701
158. Hirasawa T., Wachi M., Nagai K. L-glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum* *ltsA* mutant strains // *BMC Biotechnol.* 2001. V.1. p. 9
159. Tipper D.J. Strominger J.L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1965. V.54. pp.1133–1141.
160. Nguyen-Distèche M., Leyh-Bouille M., Ghuysen J.M. Isolation of the membrane-bound 26 000-Mr penicillin-binding protein of *Streptomyces* strain K15 in the

- form of a penicillin-sensitive D-alanyl-D-alanine-cleaving transpeptidase // *Biochem J.* 1982. V.207. No.1. pp.109-15.
- 161.Sauvage E., Kerff F., Terrak M. et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis // *FEMS Microbiol Rev.* 2008. V.32. No.2. pp.234-58.
- 162.Goffin C., Ghuysen J.M. Biochemistry and comparative genomics of SxxK superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent // *Microbiol Mol Biol Rev* 2002. V.66. pp.702–738
- 163.Goffin C., Ghuysen J.M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs // *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998. V.62. pp.1079–1093
- 164.Sauvage E., Kerff F., Terrak M. et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis // *FEMS Microbiol Rev.* 2008. V.32. No.2. pp.234-58.
- 165.Kobayashi M., Asai Y., Hatakeyama K. et al. Cloning, sequencing, and characterization of the *ftsZ* gene from coryneform bacteria // *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. V.236. pp.383–388
- 166.Champika D. W., Wachi M., Nagai K. Isolation of *ftsI* and *murE* genes involved in peptidoglycan synthesis from *Corynebacterium glutamicum* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001. V.55. pp.466–470
- 167.Yeats C., Finn R.D., Bateman A. The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain // *Trends Biochem Sci.* 2002. V.27. No.9. pp.438.
- 168.Jones G., Dyson P. Evolution of Transmembrane Protein Kinases Implicated in Coordinating Remodeling of Gram-Positive Peptidoglycan: Inside versus Outside // *J. Bacteriol.* 2006. V.188. No.21. pp.7470-7476
169. Barthe P., Mukamolova G.V., Roumestand C., Cohen-Gonsaud M. The structure of PknB extracellular PASTA domain from mycobacterium tuberculosis suggests a ligand-dependent kinase activation // *Structure.* 2010 V.18. No.5. pp.606-15

170. Paracuellos P., Ballandras A., Robert X. et al. The extended conformation of the 2.9-Å crystal structure of the three-PASTA domain of a Ser/Thr kinase from the human pathogen *Staphylococcus aureus* // *J Mol Biol.* 2010. V.404. No.5. pp.847-58.
171. Cowley S., Ko M., Pick N. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. // *Mol Microbiol.* 2004. V. 52. pp. 1691–1702.
172. Durocher D., Jackson S. P. The FHA domain // *FEBS Letters.* 2002. V.513. pp.58–66.
173. Ventura M., Rieck B., Boldrin F. et al. GarA is an essential regulator of metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* // *Mol Microbiol.* 2013. V.90. No.2. pp. 356-66
174. Wagner, T., Bellinzoni, M., Wehenkel, A., et al. Functional plasticity and allosteric regulation of alpha-ketoglutarate decarboxylase in central mycobacterial metabolism // *Chem Biol.* 2011. V.18. pp.1011–20
175. Kelkar D.A., Chattopadhyay A. The gramicidin ion channel: a model membrane protein // *Biochim Biophys Acta.* 2007. V.1768. No.9. pp. 2011-25
176. Gause G.F., Brazhnikova M.G. Gramicidin S and its use in the Treatment of Infected Wounds // *Nature.* 1944. V.154. p.703
177. Гаузе Г.Ф., Бражникова М.Г., Белозерский А.Н. et al. Биологическая и химическая характеристика кристаллического грамицидина С // *Бюлл. эксп. биологии и медицины.* 1944. Т.13. №10—11. С.3—6.
178. Prenner E.J., Lewis R.N., McElhaney R.N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V.1462. pp. 201–221
179. Sitaram N., Nagaraj R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V.1462. pp.29–54.

180. Abraham T., Prenner E., Lewis R. et al. Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes // *Biochim Biophys Acta*. 2014. V.1838. No.5. pp. 1420-9
181. Salgado S.L. Grage L.H. Kondejewski R.S. et al. Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial beta-sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state ¹⁹F NMR // *J. Biomol. NMR*. 2001. V.21. pp.191–208
182. Kondejewski L.H., Farmer S.W., Wishart D.S. et al. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria // *Int J Pept Protein Res*. 1996. V.47. No. 6. pp.460-6
183. Bourinbaiar A.S., Coleman C.F. The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 in vitro // *Arch Virol*. 1997. V.142. No.11. pp.2225-35.
184. Hartmann M., Berditsch M., Hawecker J. et al. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy // *Antimicrob Agents Chemother*. 2010. V.54. No.8. pp.3132-42
185. Ashrafuzzaman M., Andersen O., McElhaney R. The antimicrobial peptide gramicidin S permeabilizes phospholipid bilayer membranes without forming discrete ion channels // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V.1778. pp. 2814–22
186. Afonin S., Dürr U., Wadhvani P. et al.. Solid state NMR structure analysis of the antimicrobial peptide gramicidin S in lipid membranes: concentration-dependent re-alignment and selfassembly as a β -barrel // *Top. Curr. Chem*. 2008. V.273. pp.139–154
187. Huang, H.W., Chen F., Lee M. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes // *Phys. Rev. Lett*. 2004. V. 92. No.19. p.198304

188. Grotenbreg, G. M., Timmer M.S., Llamas-Saiz A.L. et al. An unusual reverse turn structure adopted by a furanoid sugar amino acid incorporated in gramicidin S // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V.126. pp. 3444–3446
189. Hartmann M., Berditsch M., Hawecker J. et al. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy // *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. V.54. No.8. pp.3132-42
190. Murphy G.E., Jensen G.J. Electron cryotomography of the E. coli pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes // *Structure.* 2005 V.13. No.12. pp.1765-73
191. Usuda Y., Tujimoto N., Abe C. et al. Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase // *Microbiology.* 1996. V.142 . pp.3347-54.
192. Hoffelder M., Raasch K., Ooyen J. et al., The E2 Domain of *OdhA* of *Corynebacterium glutamicum* Has Succinyltransferase Activity Dependent on Lipoyl Residues of the Acetyltransferase *AceF* // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. No. 19. pp.5203-5211
193. Niebisch A., Kabus A., Schultz C. et al. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the *OdhI* protein // *J. Biol. Chem.* 2006. V.281. pp.12300-12307
194. Kawahara, Y., Takahashi-Fuke K., Shimizu E. et al. Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997. V.61. pp.1109-1112
195. Asakura Y., Kimura E., Usuda Y. et al. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* // *Appl Environ Microbiol.* 2007. V.73. No. 4. pp.1308-19

196. Nakamura J., Hirano S., Ito H., Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 Gene, Encoding a Mechanosensitive Channel Homolog, Induce L-Glutamic Acid Production // *Appl Environ Microbiol.* 2007. V. 73. No.14. pp. 4491–4498.
197. Kim J., Hirasawa T., Sato Y. et al. Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009. V.81. No.6. pp.1097-1106.
198. Barthe P., Roumestand C., Canova M.J. et al. Dynamic and structural characterization of a bacterial FHA protein reveals a new autoinhibition mechanism // *Structure.* 2009. V.17. No. 4. pp. 568-78
199. Durocher D., Jackson S.P. The FHA domain // *FEBS Lett.* 2002, V. 513. No.1. pp.58-66.
200. Schultz C., Niebisch A., Gebel L. et al. Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2007. V.76. No.3. pp.691-700
201. Kim J., Fukuda H., Hirasawa T. et al. Requirement of de novo synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010. V.86. pp.911–920
202. Fiuza M., Canova M.J., Zanella-Cléon I. et al. From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division // *J Biol Chem.* 2008. V.283. No.26. pp.18099-112
203. Krawczyk S., Raasch K., Schultz C. et al. FHA domain of OdhI interacts with the carboxyterminal 2-oxoglutarate dehydrogenase domain of OdhA in *Corynebacterium glutamicum* // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. No. 8. pp.1463-8
204. Schultz C., Niebisch A., Schwaiger A. et al., Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of

- Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases // *Mol Microbiol*. 2009. V.74. No.3. pp.724-41.
- 205.Raasch K., Bocola M., Labahn J. et al. Interaction of 2-oxoglutarate dehydrogenase OdhA with its inhibitor OdhI in *Corynebacterium glutamicum*: Mutants and a model // *J Biotechnol*. 2014. V.191. pp.99-105
- 206.Boulahya K.A., Guedon E., Delaunay S. et al. OdhI dephosphorylation kinetics during different glutamate production processes involving *Corynebacterium glutamicum* // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010, V.87. No.5. pp.1867-74
- 207.Nguyen A., Schneider J., Reddy G., Fermentative production of the diamine putrescine: system metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* // *Metabolites*. 2015. V.5. No.2. pp. 211-31.
- 208.Okai N., Takahashi C., Hatada K. et al. Disruption of *pknG* enhances production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase // *AMB Express*. 2014. V. 4. pp,20.
- 209.Fiuza M., Canova M.J., Patin D. The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum* // *J Biol Chem*. 2008. V. 283. No.52. pp.36553-63
- 210.Kim J., Fukuda H., Hirasawa T. et al. Requirement of de novo synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010. V. 86. pp. 911–920
- 211.Kim J., Hirasawa T., Saito M. et al. Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin- and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum* // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011. V.91. No. 1. pp.143-51
- 212.Mizuno Y., Nagano-Shoji M., Kubo S. et al. Altered acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to conditions inducing glutamate overproduction // *Microbiologyopen*. 2016. V.5. No.1.pp. 152-73.

213. Kataoka M., Hashimoto K., Yoshida M. et al. Gene expression of *Corynebacterium glutamicum* in response to the conditions inducing glutamate overproduction // *Lett Appl Microbiol.* 2006. V.42. pp. 471–476
214. Cao Y, Duan Z, Shi Z. *World J Microbiol Biotechnol.* Effect of biotin on transcription levels of key enzymes and glutamate efflux in glutamate fermentation by *Corynebacterium glutamicum* // *World J Microbiol Biotechnol.* 2014; V.30. No.2. pp.461-8
215. Hirasawa T., Kim J., Shirai T. et al. Molecular mechanisms and metabolic engineering of glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* // *Subcell Biochem.* 2012. V.64. pp.261-81
216. K. M. Nampoothiri · C. Hoischen · B. Bathe B. Möckel · W. Pfefferle · K. Krumbach · H. Sahm L. Eggeling Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002. V.58. pp.89–96
217. Takayama, K., Kilburn, J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989. V.33. pp.1493-1499
218. Alderwick L.J., Radmacher E., Seidel M. et al. Deletion of Cg-emb in corynebacterianae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core // *J Biol Chem.* 2005. V. 280. No.37. pp.32362-71
219. Hoischen C., Kramer R. 1989. Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum* // *Arch. Microbiol.* 1989. V.151. pp.342-347
220. Clement, Y., Escoffier B., Trombe M. Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis // *J. Gen. Microbiol.* 1984. V.130. pp.2589-2594

221. Clement, Y., Laneelle G. Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition // *J. Gen. Microbiol.* 1986. V.132. pp.925-929.
222. Nottebrock D., Meyer U., Kramer R. et al. Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. V.218. pp.305–309
223. Martinac B. Bacterial mechanosensitive channels as a paradigm for mechanosensory transduction // *Cell Physiol Biochem.* 2011. V.28. No.6. pp.1051-60.
224. Börngen K., Battle A.R., Moker N. et al. The properties and contribution of the *Corynebacterium glutamicum* MscS variant to fine-tuning of osmotic adaptation // *Biochim Biophys Acta.* 2010. V.1798. pp.2141-2149
225. Sukharev S. I., Martinac B., Arshavsky V. et al. Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* envelope: Solubilization and functional reconstitution // *Biophys J.* 1993. V.65. pp. 177–183
226. Levina N., Totemeyer S., Stokes N. R. et al. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: Identification of genes required for MscS activity // *EMBO J.* 1999. V.18. pp.1730–1737.
227. Li Y., Moe P.C., Chandrasekaran S. et al. Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from *Escherichia coli* // *EMBO J.* 2002; V.21. No. 20. pp.5323-30
228. Schumann U., Edwards M.D., Rasmussen T. et al. YbdG in *Escherichia coli* is a threshold-setting mechanosensitive channel with MscM activity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010. V.107. No.28. pp.12664-9
229. Edwards M.D., Li Y., Kim S. et al. Pivotal role of the glycine-rich TM3 helix in gating the MscS mechanosensitive channel // *Nat Struct Mol Biol.* 2005. V.12. pp.113–119

230. Stokes N. R., Murray H. D., Subramaniam C. et al. A role for mechanosensitive channels in survival of stationary phase: Regulation of channel expression by RpoS // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. V.100. pp.15959–15964
231. Romantsov T., Battle A. R., Hendel J. L. et al. Protein localization in *Escherichia coli* cells: Comparison of the cytoplasmic membrane proteins ProP, LacY, ProW, AqpZ, MscS, and MscL // *J. Bacteriol.* 2010. V.192. pp.912–924
232. Cox C. D., Nomura T., Ziegler C. S. et al. Selectivity mechanism of the mechanosensitive channel MscS revealed by probing channel subconducting states // *Nat. Commun.* 2013. V.4. p.2137
233. Li Y., Moe P. C., Chandrasekaran S. et al. Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from *Escherichia coli* // *EMBO J.* 2002. V.21. pp. 5323–5330
234. Dorwart M.R., Wray R., Brautigam C.A. et al. *S. aureus* MscL is a pentamer in vivo but of variable stoichiometries in vitro: implications for detergent-solubilized membrane proteins // *PLoS Biol.* 2010. V.8 . No.12. p. 1000555
235. Chang G., Spencer R.H., Lee A.T. et al. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel // *Science* .1998. V. 282. pp.2220-2226
236. Bass R.B., Strop P., Barclay M., Rees D. Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel // *Science*. 2002. V.298. pp.1582-1587
237. Moe P., Blount P. Assessment of potential stimuli for mechano-dependent gating of MscL: effects of pressure, tension, and lipid headgroups // *Biochemistry*. 2005. V.44. pp.12239-12244
238. Perozo E., Rees D.C. Structure and mechanism in prokaryotic mechano-sensitive channels // *Curr Opin Struct Biol.* 2003. V.13. pp.432-442.
239. Wahome P.G., Setlow P. Growth, osmotic downshock resistance and differentiation of *Bacillus subtilis* strains lacking mechanosensitive channels // *Arch Microbiol.* 2008. V.189. No. 1. pp.49-58.

240. Hashimoto K., Nakamura K., Kawasaki H. The protein encoded by NCgl1221 in *Corynebacterium glutamicum* functions as a mechanosensitive channel // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010. V.74. pp.2546–2549.
241. Hashimoto K., Murata J., Konishi T. et al. Glutamate is excreted across the cytoplasmic membrane through the NCgl1221 channel of *Corynebacterium glutamicum* by passive diffusion // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012. V.76. No. 7. pp.1422-4.
242. Börngen K., Battle A.R., Möker N. et al. The properties and contribution of the *Corynebacterium glutamicum* MscS variant to fine-tuning of osmotic adaptation // *Biochim Biophys Acta.* 2010. V.1798. No.11. pp.2141-9
243. Nakayama Y., Yoshimura K., Iida H. A gain-of-function mutation in gating of *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 causes constitutive glutamate secretion // *Appl Environ Microbiol.* 2012. V.78. No.15. pp.5432-4.
244. Yao W., Deng X., Liu M. et al. Expression and localization of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 protein encoding an L-glutamic acid exporter // *Microbiol Res.* 2009. V.164. No.6. pp.680-7.
245. Yao W., Chu C., Deng X. et al. Display of alpha-amylase on the surface of *Corynebacterium glutamicum* cells by using NCgl1221 as the anchoring protein, and production of glutamate from starch // *Arch Microbiol.* 2009. V.191. No.10. pp.751-9
246. Becker M., Börngen K., Nomura T. et al. Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives // *Biochim Biophys Acta.* 2013. V.1828. No.4. pp. 1230-40
247. Becker M., Krämer R. MscCG from *Corynebacterium glutamicum*: functional significance of the C-terminal domain // *Eur Biophys J.* 2015. V.44. No. 7. pp.577-88
248. Nakayama Y., Becker M., Ebrahimian H. et al. The impact of the C-terminal domain on the gating properties of MscCG from *Corynebacterium glutamicum* // *Biochim Biophys Acta.* 2016. V.1858. No.1. pp.130-8.

249. Ozcan N., Ejsing C.S., Shevchenko A. et al. Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter BetP in *Corynebacterium glutamicum* // *J Bacteriol.* 2007. V.189. No.20. pp.7485-96.
250. Kaneko H., Sakaguchi K. Fusion of Protoplasts and Genetic Recombination of *Brevibacterium flavum*, *Agricultural and Biological Chemistry.* 1979. V. 43. №:5. pp.1007-1013
251. Sugimoto S, Shiio I. Purification and properties of bifunctional 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase-chorismate mutase component A from *Brevibacterium flavum*// *J Biochem.* 1980. V. 87,pp. 881-90
252. Cotton R., Gibson F. The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine // *Biochem. Biophys Acta.* 1965. V. 100. pp. 76-88
253. Sugimoto S., Shiio I. Regulation of prephenate dehydratase in *Brevibacterium flavum* // *J Biochem.* 1974. V.76. №5. pp. 1103-11.
254. Fasel A., Jensen R. Obligatory biosynthesis of L-tyrosine via pretyrosine branchlet in coryneform bacteria // *J. Bacteriol.* 1979. V. 138, №3, pp. 805-815
255. Diamondstone T.I. Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde // *Anal Biochem.* 1966. V.16. pp. 395–401
256. Sanger P., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors//*P.N.A.S. USA.*1977. V.53. pp.5463-5467
257. Urata G., Granick S. Biosynthesis of alpha-aminoketones and the metabolism of aminoacetone // *J Biol Chem.* 1963. V.238. pp.811-20
258. Mauzerall D., Granick S. The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine // *J Biol Chem.* 1956 V.219. pp. 435-46.
259. Scrimgeour, K. G., and F. M. Huennekens. Serine hydroxymethylase. Pp. 838-843. In: *Methods in Enzymology V.* Edited by Colowic and Kaplan. 1963.
260. Carlberg I., Manervik B. Glutathion reductase // *Methods enzymology.* 1985. V.113. pp.484-90

261. Kredich N., Tomkins G. The enzymatic synthesis of L-cysteine in *E. coli* and *Salm. typhimurium* // *J. Biol. Chem.* 1966. V.241. № 21. Pp. 4955-65
262. Pye V.E., Tingey A.P., Robson R.L., Moody P.C. The structure and mechanism of serine acetyltransferase from *Escherichia coli* // *J Biol Chem.* 2004. V.279. №39. pp.40729-36
263. Davis B.D. Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin // *J. American Chem. Soc.* 1948. V.70. p.4267
264. Nakayama K., Kitada S., Kinoshita S. Studies of lysine fermentation // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1961. V.7. pp. 145-154
265. Komatsu Y. Complete lysis of glutamic acid producing bacteria by the use of antibiotics which inhibit the biosynthesis of cell walls // *J. Gen. Microbiol.* 1979. V.113. pp.407-408
266. Mori M., Shio I., Production of aspartic acid and enzymatic alteration in pyruvate kinase mutants of *B. flavum* // *Agr.Biol.Chem.* V.481, pp. 1189-1197
267. Vivian A.L., Caceres R.A., Abrego J.R. et al . Structural studies of prephenate dehydratase from *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* by SAXS, ultracentrifugation, and computational analysis // *Proteins.* 2008. V.72. No.4. pp.1352-62
268. Fasel A., Jensen R. Obligatory biosynthesis of L-tyrosine via pretyrosine branchlet in coryneform bacteria // *J. Bacteriol.* 1979. V. 138, №3, pp. 805-815
269. Fazel A.M, Bowen J.R., Jensen R.A. Arogenate (pretyrosine) is an obligatory intermediate of L-tyrosine biosynthesis: confirmation in a microbial mutant // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980.V.77. №3. pp.1270–1273
270. Stenmark S.L. et al. Blue-green bacteria synthesize L-tyrosine by the pretyrosine pathway // *Nature.* 1974. V. 247. pp.290–292
271. Production of Tyrosine and Phenylalanine in *Brevibacterium flavum* // *Agr. Biol. Chem.* 1974. V. 37. №:10. pp. 2327-2336

272. Hagino H., Nakayama K. (1974) Regulatory Properties of Prephenate Dehydrogenase and Prephenate Dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*// Agr. Biol. Chem. 1974.V. 38. №:12. pp. 2367-2376
273. Hagino H., Nakayama K. The Biosynthetic Control in Aromatic Amino Acid Producing Mutants of *Corynebacterium glutamicum* // Agr. Biol. Chem. 1975. V.39. pp. 351-361
274. Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering // Appl Microbiol biotechnol, 2006, v.69. pp. 615-626
275. Patel N., Pierson D., Jensen R. Dual enzymatic routes to L-tyrosine and L-phenylalanine via pretyrosine in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Biol. Chem. 1977. V 25. pp. 5839-5846
276. Zamir L. et al. Enzymatic and nonenzymatic dehydration reaction of L-arogenate // Biochemistry. 1985. V. 24. pp. 1607-1612
277. Zamir L. et al Differential acid-catalyzed aromatization of prephenate, arogenate, and spiro-arogenate // Tetrahedron Letters. 1983. V.24. pp. 2815-2818
278. Shiio I., Sugimoto S., Kawamura K. Breeding of phenylalanine-producing *B. flavum* strains by removing feedback regulation of both the two key enzymes in its biosynthesis// Agr. Biol. Chem. 1988. V.52. pp.2247-2254
279. Shiio I., Sugimoto S. Two component of chorismate mutase in *B. flavum* // J. Biochem. 1979. V.86. pp.17-25
280. Britz M., Best G. Expression of chloramphenicol resistance specified by plasmid pHY416 hosted in *C. glutamicum*// Current Microbiol. 1986. V.14. pp.13-17
281. Ikeda M., Ozaki A., Katsumata R. Phenylalanine production by metabolically engineered *C. glutamicum* with the *pheA* gene of *Escherichia coli* // Appl Microbiol Biotechnol. 1993. V.39. №3. pp.13-17
282. Follettie M., Sinskey A. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *C. glutamicum pheA* gene// J. Bacteriol. 1986. V.167. pp. 697-702

283. Aravind L, Koonin E.V. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches// *J Mol Biol.* 1999.V. 287. №5. pp.1023-40
284. Schuller D.J., Grant G.A., Banaszak L.J. // *Nat Struct Biol.* 1995. V.2. №1. pp. 69-76
285. Grant G.A. The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element// *J Biol Chem.* 2006.V.281.№45 pp.33825-9
286. Tan K., Li H., Zhang R. et al. Structures of open (R) and close (T) states of prephenate dehydratase (PDT)--implication of allosteric regulation by L-phenylalanine// *J Struct Biol.* 2008. V.162 .pp.94-107
287. Naoto T., Kojima H., Matsui H. Патент EP 0 488424
288. Newman E.B., Kapoor V., Potter R. Role of L-threonine dehydrogenase in the catabolism of threonine and synthesis of glycine by *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* 1976. V. 126. pp. 1245–1249
289. Pizer L.I., Potochny M.L. Nutritional and regulatory aspects of serine metabolism in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1964; v. 88. pp. 611–619.
290. Ninfa A.J., Atkinson M.R. PII signal transduction proteins// *Trends Microbiol.* 2000.v. 8. pp.172-9.
291. Ostrowski J., Kredich N.M. Molecular characterization of the *cysJIIH* promoters of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: regulation by *cysB* protein and N-acetyl-L-serine // *J Bacteriol.* 1989. V. 171. №1.pp.130-40.
292. Lochowska A., Iwanicka-Nowicka R., Plochocka D., Hryniewicz M.M. Functional dissection of the LysR-type *CysB* transcriptional regulator. Regions important for DNA binding, inducer response, oligomerization, and positive control // *J Biol Chem.* 2001. V.276. pp.2098-107
293. Sugimoto E., Pizer L.I., Mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis. II Optical studies of phosphoglycerate dehydrogenase // *J.Biol.Chem.* 1968. V.243 №9. pp.2090-98.

294. Sugimoto E., Pizer L.I., Mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis.III. Physical and chemical properties of phosphoglycerate dehydrogenase // *J.Biol. Chem.* 1968. V. 243. №9. pp. 2099-2107
295. Sugimoto E., Pizer LI, Mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis.IV. Subunit structure of phosphoglycerate dehydrogenase and steady state kinetic studies of phosphoglycerate oxidation // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. pp.1348-55.
296. Sugimoto E., Pizer L.I, Mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis.IV. Subunit structure of phosphoglycerate dehydrogenase and steady state kinetic studies of phosphoglycerate oxidation // *J. Biol. Chem.* 1974. V.249.pp.1348-55.
297. Zhao G. Winkler M.E. A Novel α -Ketoglutarate Reductase Activity of the serA-Encoded 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 and Its Possible Implications for Human α -Hydroxyglutaric Aciduria // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. pp. 232–239
298. Schuller D., Grant G.A, Banaszak I. The allosteric ligand site in the Vmax-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase // *Nat.Struct. Biol.* 1995. V. 2. pp. 69-76
299. Grant G.A., Schuller D.J., Banaszak L.J. A model for the regulation of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, a Vmax-type allosteric enzyme // *Protein Sci.* 1996. V. 5. pp.34-41.
300. Grant G.A. Contrasting catalytic and allosteric mechanisms for phosphoglycerate dehydrogenases // *Arch Biochem Biophys.* 2012. V. 519. N2. pp.175-85.
301. Schuller D., Grant G.A., Banaszak I. The allosteric ligand site in the Vmax-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase // *Nat.Struct. Biol.* 1995. V. 2. pp. 69-76
302. Thompson J.R., Bell J.K., Bratt J., et al. Vmax regulation through domain and subunit changes. The active form of phosphoglycerate dehydrogenase // *Biochemistry.* 2005 V. 44. N15. pp.5763-73

303. Grant G.A. The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. *Biol. Chem.* 2006. V. 281 N45. pp.33825-29
304. Grant G.A., Xu X.I., Hu Z. Quantitative relationships of site to site interaction in *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase revealed by asymmetric hybrid tetramers // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. pp. 13452-13460
305. Mertz D.K., McAlexander J.C., Guynn R.W. Equilibrium Constants under Physiological Conditions for the Reactions of 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase and L-Phosphoserine Aminotransferase // *Arch. Biochem. Biophys.* 1981. V. 212. pp. 717-729
306. Doucette C.D. et al. α -Ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition // *Nat Chem Biol.* 2011. V.7. pp.894-901
307. Grant G.A., Hu Z., Xu X.L. Cofactor binding to *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase induces multiple conformations which alter effector binding // *J Biol Chem.* 2002. V.277. N42. pp.39548-53
308. Burton R.L., Hanes J.W., Grant G.A. A stopped flow transient kinetic analysis of substrate binding and catalysis in *Escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase // *J Biol Chem.* 2008. V.283. N44. pp.29706-14
309. Bennett B.D., Kimball E.H., Gao M. et al. Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach // *Nat Chem Biol.* 2009, V.5. pp.593-9.
310. Dey S., Hu Z., Xu X.L. et al. D-3-phosphoglycerate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* is a link between the *Escherichia coli* and mammalian enzymes // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. pp. 14884–91
311. Burton R.L. et al. A novel mechanism for substrate inhibition in *Mycobacterium tuberculosis* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* 2007. V.282. pp.:31517–31524
312. Egan R.M., Phillips A.T. Presence of tightly bound NAD⁺ in urocanase of *Pseudomonas putida* // *J Biol Chem.* 1977. V.252. pp.5701-7.

313. Rétey J. The urocanase story: a novel role of NAD⁺ as electrophile // *Arch Biochem Biophys*. 1994. V.314. pp.1-16.
314. Kessler D., Rétey J., Schulz G.E. Structure and action of urocanase // *J Mol Biol*. 2004. V. 342. pp.183-94.
315. Wilson D.B., Hogness D.S. The enzymes of the galactose operon in *Escherichia coli*. I Purification and characterization of uridine diphosphogalactose 4-epimerase. *J. Biol. Chem*. 1964. V. 239. pp. 2469–81
316. Kang U.G., Nolan L.D., Frey P.A. Uridine diphosphate galactose-4-epimerase. Uridine monophosphate-dependent reduction by alpha- and beta-D-glucose // *J Biol Chem*. 1975. V.250. N18. pp.7099-105.
317. Liu Y. et al. Mechanistic roles of tyrosine 149 and serine 124 in UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* // *Biochemistry*. 1997. V.36. pp.10675-84.
318. Thoden J.B. et al. Structural analysis of UDP-sugar binding to UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* // *Biochemistry*. 1997. V.36. pp.6294-304.
319. Allen S.H, Patil J.R. Studies on the structure and mechanism of action of the malate-lactate transhydrogenase // *J Biol Chem*. 1972. V. 247. pp.909-16.
320. Allen S.H. Molecular weight and subunit structure of the malate-lactate transhydrogenase // *Eur J Biochem*. 1973. V. 35. pp.338-45.
321. Kaufman E.E. et al. Isolation and characterization of a hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase from rat kidney mitochondria // *J Biol Chem*. 1988. V. 263. pp.16872-9
322. Lyon R.C. et al.. Enzymes involved in the metabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y cells: identification of an iron-dependent alcohol dehydrogenase ADHFe1 // *Chem Biol Interact*. 2009. V.178. pp.283-7.
323. Struys E.A. et al. Kinetic characterization of human hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase: relevance to D-2-hydroxyglutaric and gamma-hydroxybutyric acidurias // *Inherit Metab Dis*. 2005. V.28. pp. 921-30.

324. Kardon T. et al. Identification of the gene encoding hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, an enzyme that metabolizes 4-hydroxybutyrate // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. pp.2347-50
325. Hindson V.J. Serine acetyltransferase of *Escherichia coli*: substrate specificity and feedback control by cysteine // *Biochem J.* 2003. V.375. pp. 745–752.
326. Denk D., Böck A. L-cysteine biosynthesis in *Escherichia coli*: nucleotide sequence and expression of the serine acetyltransferase (*cysE*) gene from the wild-type and a cysteine-excreting mutant // *J Gen Microbiol.* 1987. V.133. №3. pp.515-25.
327. Aslund F., Ehn B., Miranda-Vizuete A., et al. Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant//*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994. V.91. №21. pp.9813-7.
328. Imlay K.R., Korshunov S, Imlay J.A. Physiological Roles and Adverse Effects of the Two Cystine Importers of *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* 2015. V.197. №23. pp. 3629-44
329. Paulsen I.T., Skurray R.A. The POT family of transport proteins // *Trends Biochem Sci.* 1994. V.19. №10. p.404 -7
330. Weitz D., Harder D. Casagrande F. et al. Functional and structural characterization of a prokaryotic peptide transporter with features similar to mammalian PEPT1 // *J. Biol. Chem.* 2007. V.28. №5. Pp.2832-39
331. Malle E., Zhou H., Neuhold J. et al. Random mutagenesis of the prokaryotic peptide transporter YdgR identifies potential periplasmic gating residues // *J Biol Chem.* 2011. V. 286. №26. pp. 23121-31
332. Prabhala B., Aduri N., Jensen J. et al. New insights into the substrate specificities of proton-coupled oligopeptide transporters from *E. coli* by a pH sensitive assay // *FEBS Lett.* 2014. V. 588 №4. pp.560-5.

