

УДК 577.4

М.Г. ТАРУТИНА, Н.М. РАЕВСКАЯ, Т.Е. ШУСТИКОВА*, Л.Е. РЯБЧЕНКО, А.С. ЯНЕНКО*

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: igenetic@yandex.ru
yanenko@genetika.ru

Оценка эффективности промоторов *Corynebacterium glutamicum* и их использование для усиления активности генов у лизин-продуцирующих бактерий

На основе репликативного вектора pNS2 и репортерного гена *cat* из транспозона Tn9, кодирующего хлорамфениколацетилтрансферазу, сконструирован вектор pNS-cat72 для клонирования промоторов разных генов и оценки их силы по устойчивости к хлорамфениколу в клетках штаммов *Corynebacterium glutamicum*. С помощью этого вектора изучена сила промоторов различных генов у штамма *Corynebacterium glutamicum* GEN1-2 (*lys*^{CA279T, S317A}), содержащего аспартокиназу, устойчивую к ретроингибированию лизином и треонином. Обнаружено, что промоторы генов *efu*, *sod*, *cspB* и *leuC* обеспечивают более высокий уровень устойчивости к хлорамфениколу, чем промоторы генов *lysC*, *pus*, *tkl*, *fbp*, вовлеченных в контроль биосинтеза лизина. Показано, что замена собственного промотора гена *ddl* на промотор *sod* увеличивает уровень транскрипции почти в 10 раз, при этом активность фермента диаминопимелатдегидрогеназы усиливается в 3–4 раза, что приводит к увеличению продукции лизина клетками на 9%. Охарактеризованный набор промоторов разной силы является необходимым инструментом для оптимизации работы генов при конструировании штаммов-продуцентов клеточных метаболитов.

Ключевые слова: активность фермента, промоторы, синтез лизина, экспрессия гена, *Corynebacterium glutamicum*.

Бактерии *Corynebacterium glutamicum* более 50 лет широко используют в биотехнологической промышленности для производства аминокислот — глутамата, лизина, аргинина, аланина, изолейцина, метионина, серина и валина. В последние годы с помощью этих бактерий осуществляют биосинтез новых продуктов — α, ω -аминокислот, α, ω -диаминов, α -кетокислот, изобутанола, каротиноидов и терпенов [1].

Промышленное производство основано на микробной ферментации сахаров с помощью му-

тантных штаммов *C. glutamicum*. Для получения штаммов-продуцентов используются различные селекционные и генетические подходы, включая мутагенез и направленное конструирование штаммов с помощью методов генной и метаболической инженерии.

Одним из широко используемых подходов, применяемых при конструировании штаммов-продуцентов, является изменение экспрессии некоторых значимых генов путем замены их промоторов на более сильные. К настоящему времени описано

Тарутина Марина Геннадьевна, Раевская Наталья Михайловна, Шустикова Татьяна Евгеньевна, Рябченко Людмила Евгеньевна, Яненко Александр Степанович.

Список сокращений: ДАПД — диаминопимелатдегидрогеназа; КЖ — культуральная жидкость; ОП — оптическая плотность; ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда LB — среда Лурия-Бертани; т.п.н. — тысяч пар нуклеотидов; NADPH — никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный.

* Авторы для переписки.

более 50 промоторов *C. glutamicum*, но только промоторы генов *tuf (eftu)*, *sod* и *cspB* были охарактеризованы как сильные и использовались для повышения уровня экспрессии значимых генов [2—5]. В то же время следует отметить, что для создания высокопродуктивных штаммов требуется не просто увеличение активности определенных генов, а обеспечение координированного уровня активности разных ферментов. Решение этой задачи может быть достигнуто путем использования промоторов разной силы.

Целью данной работы была экспериментальная проверка силы нескольких промоторов *C. glutamicum* (по устойчивости клеток к хлорамфе-

никулу) для их дальнейшего использования, направленного на повышение продукции лизина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Бактериальные штаммы и плазмиды приведены в табл. 1. Штаммы *C. glutamicum* GEN1-2, GEN2-1, GEN4-28 — производные штамма *C. glutamicum* ATCC13032 — были получены путем замещения нативного аллеля генов *lysC*, *hom* и *leuC* на мутантные аллели *lysC*^{A279TS317A}, *hom*^{V59A} и *leuC*^{G456D} с помощью гомологичной рекомбинации [6].

Таблица 1

Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник получения
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Дикий тип	ВКПМ* (ГосНИИгенетика)
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC14067	Дикий тип	ВКПМ
<i>B. lactofermentum</i> ATCC13869	Дикий тип	DSM, Германия
<i>B. lactofermentum</i> В-10945	Продуцент лизина	ВКПМ
<i>E. coli</i> XLI Blue	<i>supE44hsdR17recA1endA1 gyrA96 thi relA1 lac-F</i> ⁺ [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15Tn10]	ВКПМ
<i>C. glutamicum</i> GEN1-2	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 (<i>lysC</i> ^{A279TS317A})	Данная работа
<i>C. glutamicum</i> GEN2-1	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 (<i>lysC</i> ^{A279TS317A} , <i>hom</i> ^{V59A})	То же
<i>C. glutamicum</i> GEN4-28	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 (<i>lysC</i> ^{A279TS317A} , <i>hom</i> ^{V59A} , <i>leuC</i> ^{G456D})	—”—
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Дикий тип	ВКПМ
pNS2	8,05 т.п.н. Ap ^R Km ^R <i>E.coli-C.glutamicum</i> вектор	Ростова и др., 1993 [7]
pACYC184	4,2 т.п.н. Cm ^R Tc ^R	GenBank/EMBL Accession Number: X06403
pNS-cat72	8,87 т.п.н. Ap ^R Km ^R , получен из pNS2, <i>cat</i> из pACYC184	Данная работа
pIKA-sac13	pUC19 + Km ^R из pUC4K+ <i>sacB</i> из <i>B. subtilis</i> 168	То же
pIKA-sod-ddh	pIKA-sac13 + (<i>psod-ddh</i>)	—”—
pIKA-leu-ddh	pIKA-sac13 + (<i>pleu-ddh</i>)	—”—
pIKA-2xddh	pIKA-sac13 + 2 <i>xddh</i>	—”—

*ВКПМ — Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов.

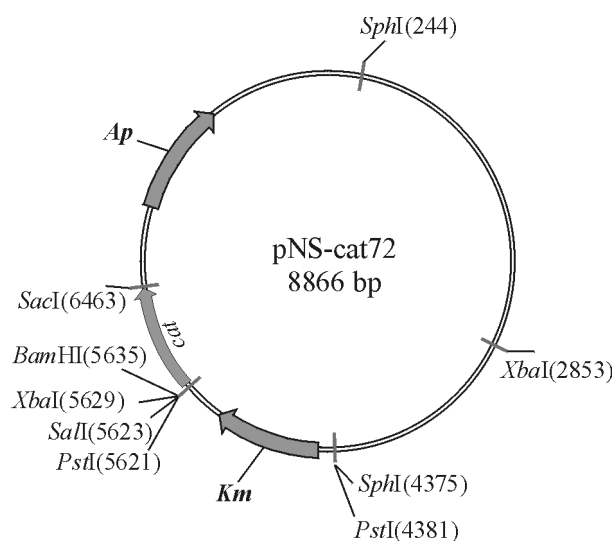


Рис.1. Карта плазмиды pNS-cat72 для оценки силы промоторов. Перед структурной частью гена *cat* отсутствуют стартовый кодон и промоторная область. *Ap* и *Km* — гены устойчивости к ампициллину и канамицину, *cat* — ген устойчивости к хлорамфениколу

Для оценки силы промоторов была сконструирована плазмида pNS-cat72, которая кроме стандартных структурных элементов содержала репортерный ген *cat* устойчивости к хлорамфениколу без промоторной области и старт-кодона (рис. 1).

Плазмида pNS-cat72 является производной репликативного вектора pNS2 [7], содержащей в качестве репортерного гена *cat* из транспозона Tn9, клонированного в виде *Bam*HI—*Sac*I-фрагмента. Полученный вектор pNS-cat72 размером 8,87 т.п.н. содержит уникальные сайты *Sal*I и *Bam*HI перед репортерным геном *cat*, которые могут быть использованы для клонирования последовательностей различных промоторов из генома *C. glutamicum*.

Производные плазмиды pNS-cat72 с разными промоторами были получены путем клонирования *Bam*HI—*Sal*I ПЦР-фрагментов, полученных с использованием праймеров и матрицы, представленных в табл. 1 и 2.

Таблица 2

Сайт-специфические праймеры, использованные в работе

Название праймера	Ген	Последовательность праймера
1	2	3
catforw	<i>cat</i>	GGGGATCCGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCG
catrev	<i>cat</i>	GCGAGCTCCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGC
pcspBforw	<i>cspB</i>	CGGTTCGACGATATCCTGTGAATTAGCTGATTTAGT
pcspBrev	<i>cspB</i>	CCGGATCCACCGGTCATAGAGGGCGAAGGCTCCTTG
Km20seqforw	<i>Km</i>	CTACCTTCTTCACGAGGCAGACCTC
catseqrev	<i>cat</i>	GCATGTTCTTTACGATGCCATTGGG
sodforw	<i>sod</i>	GGGTTCGACGATATCTAGCTGCCAATTATCCGGG
sodrev	<i>sod</i>	GCGGATCCACCGGTCATGGGTAAAAAATCCTTTTCGTAGG
eftuforw	<i>eftu</i>	GGGTTCGACGATATCTGGCCGTTACCCTGCGAATG
efturev	<i>eftu</i>	CGGGATCCACCGGTCATTGTATGTCCTCCTGGACTTC
plysCforw	<i>lysC</i>	GGGTTCGACGATATCATTGTAAATGCCGATGCTAGG
plysCrev	<i>lysC</i>	CGGGATCCACCGGTCACCTTTGTGCACCTTTTCGATC
prpysCforw	<i>pysC</i>	GTGTTCGACCATATCGTTAAACTTGGCCAAATGTG
prpysCrev	<i>pysC</i>	TCCGGATCCACCGGTCAGTAGAGTAATTATCCTTTCAAC
prtkforw	<i>tkl</i>	GGGTTCGACGATATCGACGCTTGATTGGCGGACGG
prtkrev	<i>tkl</i>	TCCGGATCCACCGGTCATCCTTCCTGGGTAAACCGGG

1	2	3
prfbpforw	<i>fbp</i>	GGGTCGACGATATCTCAGCCACCCGCCTAGTATG
prfbprev	<i>fbp</i>	GCGGATCCACCGGTCATCTGAAGGGCCTCCTGGG
pr1315forw	<i>leuC</i>	CCGTCGACCATATCGTCCCACATCCTTGAATTTAGC
pr1315rev	<i>leuC</i>	CCGGATCCACCGGTCATGGAACCTCACCGTCCTTTA
pr0284forw	<i>Cgl0284</i>	GCGTCGACCATATCGATCCACAAAGGTGCAGCTAAG
pr0284rev	<i>Cgl0284</i>	CGGGATCCACCGGTCATTCTCCTTTGTGCTTTAGATC
pr2628forw	<i>Cgl2628</i>	GGGTCGACGATATCTGTAGGCGTTGGACACTGTG
pr2628rev	<i>Cgl2628</i>	TCCGATCCACCGGTCATACCTGCCATTATATGCTTATTG
P5	<i>ddh</i>	CGATTAGAGCTCTGAACGGCAACGGATCAAAA
P6	<i>ddh</i>	TTTCTAGAATTATTTTCTAGATTCCCTTTGGTCCAGCGAAG
P7	<i>ddh</i>	TTTCTAGAATTATTTTCTAGATGAACGGCAACGGATCAAAAA
P8	<i>ddh</i>	GTCAGTCTGACTTCCTCTTGGTCCAGCGAAG
F-up-ddh	<i>ddh</i>	GTCGACTGTTCTTGTAATCCTCCAAAATTGTGGTGG
R-up-ddh	<i>ddh</i>	TCTAGATCGCTCAAGGCTGCTGCTGACCTGGTCA
Fddh-2787716	<i>ddh</i>	AGGACGGTGAGTTCATGACCAACATCCGCGTAGCTATC
Fddh	<i>ddh</i>	AATCCAGATTTTTGTACGCCTGTCT
Rddh	<i>ddh</i>	ACCGCGCATCATTCCAATGCTGATCC
R-sod-ddh	<i>sod-ddh</i>	CGCGGATGTTGGTCATGGGTAAAAAATCCTTTCGTAGG
R-leuC-pr	<i>leuC-ddh</i>	CGCGGATGTTGGTCATGGAACCTCACCGTCCTTTA
RleuC-456	<i>leuC</i>	CCAGGTGGGTGCGGTCCTCCTGGTCTTGGCGTCTT
FleuC-456	<i>leuC</i>	CAACCGAAACTTCGAAGGACGCCAAGGACCAGGAGACCGCACCCACC
FleuC-1381281	<i>leuC</i>	TTTGGATCCTGCCAACCGACGAAGGCGCAACCTTT
FleuC-1381301	<i>leuC</i>	TTTGGATCCACCTTTGACAAGGTCGTAGAAATCGAT
RleuC-1382350	<i>leuC</i>	TTTGGATCCACGTCGCCTGCGGTGACGATCTGCTT
RleuC-1382324	<i>leuC</i>	TTTGGATCCTTCCAGGTTACGGTCAGTTCGAG
F leu-mut	<i>leuC</i>	CCGAAACTTCGAAGGACGCCAAGGACCAGGAGA

Примечание: курсивом в последовательностях выделены сайты рестрикции.

Штаммы *E. coli* растили на среде LB (Difco) при 37°. При необходимости в среду добавляли антибиотики: канамицин (ОАО «Синтез», Россия) — до концентрации 50 мкг/мл, ампициллин (ОАО «Синтез») — 100 мкг/мл и хлорамфеникол (ОАО «Синтез») — 25 мкг/мл. Штаммы *C. glutamicum* выращивали на среде 2×LB с 1% мальтозы при 30°. Для трансформации *C. glutamicum* использовали среду ВНИС следующего состава: сердечномозговой настой (brain heart infusion, ВНИ, Difco) — 37 г/л, сорбит — 95 г/л с добавлением 15 г/л бак-

тоагара для получения твердой среды. Селекцию трансформантов осуществляли добавлением канамицина до концентрации 17 мкг/мл.

Оценку силы промоторов в клетках *C. glutamicum* GEN1-2 проводили по уровню устойчивости к возрастающим концентрациям хлорамфеникола. С этой целью ночные культуры штаммов, содержащих плазмиду с геном устойчивости к хлорамфениколу под контролем разных промоторов, в различных разведениях наносили репликатором на чашки с различными concentra-

циями хлорамфеникола (2 мкг/мл, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20 и 25 мкг/мл). В качестве контроля использовали культуру штамма *C. glutamicum* GEN1-2 (pNS-cat72), который содержал плазмиду с репортерным геном *cat* без промотора. Рост культур оценивали после инкубации чашек в течение 2 сут при 30°.

Генно-инженерные методы. Выделение плазмид и трансформацию *E. coli* проводили по стандартным методикам [8]. Рестриктию и лигирование ДНК осуществляли в условиях, рекомендованных изготовителем (Thermo Scientific). Амплификацию проводили с использованием Mastercycler Gradient (Eppendorf) при следующих условиях: 94° — 30 с; 53° — 30 с; 68° — 1—2 мин; число циклов 25. Амплифицировали с помощью смеси полимераз *Pfu* (#EP0502) и *Taq* (#EP0404) (Fermentas, Литва), взятых в соотношении 1:9. Хромосомную ДНК из штаммов *C. glutamicum* выделяли согласно методу [9].

Приготовление компетентной культуры *C. glutamicum* и электропорацию проводили в соответствии с методом Van der Rest, *et al.* [10]. Условия электропорации были следующие: 2500 В, 25 мкФ, 200 Ом. Длительность электроимпульса составляла 4,5—5,5 мс в зависимости от свойств клеток и чистоты ДНК. Частота трансформации клеток *C. glutamicum* ATCC13032 составляла $1 \cdot 10^4$ трансформантов/мкг ДНК плазмиды pNS2 и $1 \cdot 10^{-2}$ трансформантов/мкг ДНК плазмид на основе вектора pКА-sac13.

Измерение уровня экспрессии гена *ddh* методом ПЦР в реальном времени. Для выделения тотальной бактериальной РНК клетки из 50 мл выросшей культуры *C. glutamicum* с оптической плотностью $OP_{600} = 15—25$ осаждали при 4000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R в течение 10 мин при 4°. Супернатант отбрасывали, а 100 мкл осадка ресуспендировали в 0,8 мл реагента TRIzol (Invitrogen, США) с добавлением 0,1 г стеклянных шариков размером 0,1 мм, и смесь гомогенизировали на высокоскоростном вортексе (Heidolph, Германия) в течение 5 мин. Дальнейшее выделение проводили согласно протоколу производителя реагента TRIzol. После выделения РНК для удаления ДНК образцы обрабатывали ДНКазой I (ThermoScientific) в течение 30 мин.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов «MMLV RT kit» («Евроген», Россия) согласно прилагаемой инструкции с использованием случайного декануклеотидного праймера. Полученная кДНК может храниться 1 мес при –20°.

ПЦР осуществляли на приборе ABI 7500 PCR System Fast (Applied Biosystems, США) с помощью набора реагентов «HS Taq-ДНК-полимераза» («Евроген»). Условия амплификации фрагмента кДНК были следующие: 95°, 2 мин — первый цикл; 94°, 10 с и 60°, 60 с — 40 циклов. ПЦР проводили с помощью следующих праймеров и зондов:

— ген эндогенного контроля 16S:

16S-*FJ*, CAGCAGTGGGGAATATG,

16S-*RJ*, GTGCTTCTTCTCCAGGTA,

16S-FAM, FAM- CGTCACCATAAGGCTTC-GTCC -BHQ-1;

— ген *ddh*:

Ddh-*FJ*, CGTGGGAATACATCCTCAA,

Ddh-*RJ*, CAGGTATGGAGCAACTTC,

Ddh-FAM, FAM- TCACCGCTTCCTCACA-GATCG -BHQ-1.

Анализ уровня экспрессии осуществляли средствами программного обеспечения SDS 1.4 по методу ddCt.

Определение активности диаминопимелатдегидрогеназы (ДАПД) проводили на бесклеточных экстрактах в соответствии с методикой [11]. Удельную активность ДАПД выражали в нмоль NADPH, образующегося за 1 мин под действием 1 мг ферментного препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование производных плазмиды pNS-cat72, содержащих различные промоторы *C. glutamicum*

Для сравнительной оценки силы промоторов были сконструированы производные плазмиды pNS-cat72, содержащие репортерный ген *cat* под контролем различных промоторов. Всего для этой цели было использовано 10 промоторов, включая промоторы генов *eftu* (фактор элонгации TU), *sod* (супероксиддисмутазы), *lysC* (аспараткиназа), *pus* (пируваткарбоксилаза), *tkt* (транскетотлаза), *fbp* (фруктозо-1,6-бисфосфатаза), *leuC Cgl1315* (большая субъединица 3-изопропилмалатдегидратазы), *Cgl0284* (АМР-связывающий белок, относящийся к ацил-СоА-синтетазам (АМР-forming)/АМР-acid ligases II"), *Cgl2628* (периплазматический компонент, транспортер АВС-типа) и *cspB* (PS2 белок S-слоя клеточной стенки) (табл. 3). В качестве источника промоторов были использованы природные штаммы *C. glutamicum* ATCC13032 (промоторы генов *tkt*, *Cgl0284*, *fbp*, *Cgl2628*, *pus*, *lysC*, *sod*, *Cgl1315-leuC*, *eftu*), *B. flavum* ATCC14067

Оценка силы промоторов *C. glutamicum* в клетках штамма GEN1-2 (*lysC*^{A279TS317A})

Плазмида	Промотор	Сила промотора	Источник промотора
pNS-cat72	–	–	Промотор отсутствует
ptkcat1	tkf	±	Из штамма ATCC13032
p0284cat6	Cgl0284	±	Из штамма ATCC13032
pfbpcat1	fbp	±	Из штамма ATCC13032
p2628cat1	Cgl2628	+	Из штамма ATCC13032
plysCcat57	lysC	+	Из штамма В-10945
pcsp1cat	cspB	+	Из штамма ATCC14067
ppycat3	pyc	++	Из штамма ATCC13032
pcsp44cat	cspB	++	Из штамма В-10945
plysCcat3	lysC	+++	Из штамма ATCC13032
psodcat5	sod	++++	Из штамма ATCC13032
p1315cat72	Cgl1315(<i>leuC</i>)	+++++	Из штамма ATCC13032
pcsp*40cat	cspB	+++++	Из штамма В-10945
peftucat5	eftu	+++++	Из штамма ATCC13032

Примечание: сила промоторов имеет следующее соответствие с устойчивостью клеток к хлорамфениколу: ± — устойчивость к антибиотику в концентрации до 2 мкг/мл; + — до 4 мкг/мл; ++ — до 8 мкг/мл; +++ — до 10 мкг/мл; ++++ — до 12 мкг/мл; +++++ — до 14 мкг/мл; ++++++ — до 20 мкг/мл.

(промотор гена *cspB*) и продуцент лизина *B. lactofermentum* ВКПМ В-10945 (промоторы генов *cspB* и *lysC*).

Структура фрагментов, содержащих разные промоторы, во всех случаях была идентична (рис. 2). Для их получения использовали праймеры, комплементарные 5'- и 3'-концам промоторных областей, при этом в состав праймеров с 5'-конца включали сайты *SalGI* и *EcoRV*, а с 3'-конца — сайты *AgeI* и *BamHI*. Промоторные области содержали стартовый кодон, характерный для каждого из промоторов, который находился перед *AgeI*-сайтом и совпадал с рамкой считывания *cat* гена из вектора

pNS-cat72. Исключение составлял промотор гена *eftu*, в котором собственный старт-кодон GTG был заменен на ATG. В результате такого конструирования белок Cat дополнительно содержал на N-конце четыре аминокислоты — ThrGlyGlySer, кодируемые последовательностями *AgeI*- и *BamHI*-сайтов (см.рис. 2).

Всего было сконструировано 13 плазмид, содержащих разные промоторы из 3 штаммов (см. табл.3). Дополнительное секвенирование с праймеров Km20seqforw и catseqrev (см.табл. 2) подтвердило структуру всех сконструированных плазмид за исключением плазмиды, содержащей про-

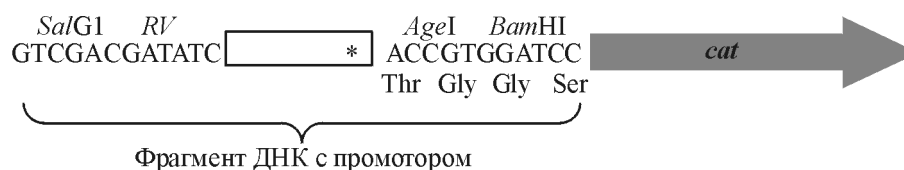


Рис. 2. Структура фрагмента ДНК, содержащего промоторную область в составе плазмиды pNS-cat72: *SalGI*, *RV*, *AgeI* и *BamHI* — сайты рестрикции соответствующих эндонуклеаз; старт-кодон обозначен*

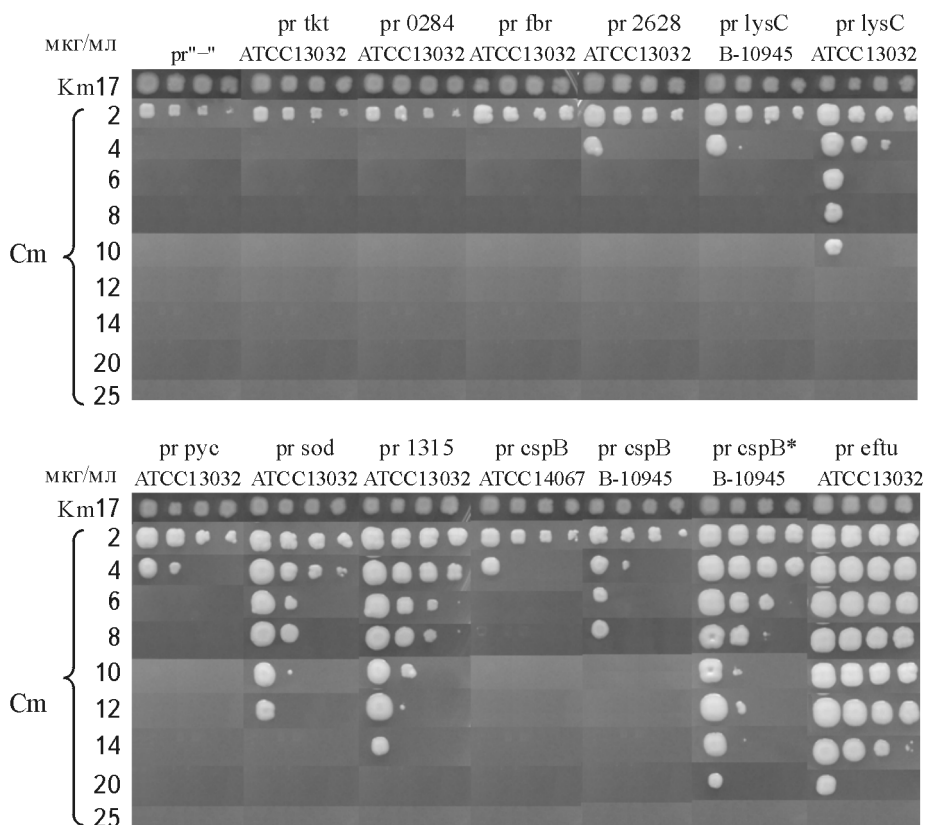


Рис. 3. Оценка силы промоторов у штамма *C. glutamicum* GEN1-2 (*lysC*^{A279TS317A}), в который были введены различные плазмиды (надписи в верхней части рисунка), по устойчивости к различным концентрациям хлорамфеникола (надписи слева). Промотор из штамма *pcsp40cat* обозначен как *pcspB**. Эксперимент проводили в трех повторностях

моторную область гена *cspB* из *Brevibacterium* B-10945. Наряду с плазмидой *pcsp44cat*, имеющей ожидаемую структуру, был обнаружен вариант этой плазмиды, который содержал замену триплета GGT на AGT, что приводило к инактивации сайта *AgeI*. Эта замена локализовалась вне промоторной области сразу за старт-кодоном. Плазмида с такой заменой была обозначена *pcsp*40cat*.

Оценка силы промоторов в клетках штамма *C. glutamicum* GEN1-2 по уровню устойчивости к возрастающим концентрациям хлорамфеникола

Штаммом сравнения при оценке силы промоторов служил *C. glutamicum* GEN1-2, аспартокиназа которого нечувствительна к ретроингибированию лизином и треонином. В этот штамм (GEN1-2 (*lysC*^{A279TS317A})) были введены плазмиды, содержащие ген *cat* под контролем различных промоторов. Клоны, получившие плазмиды, поддерживали на обогащенной среде LB с канамицином (17 мкг/мл). Оценку силы промоторов у штаммов

C. glutamicum GEN1-2, содержащих различные плазмиды, проводили по уровню устойчивости к возрастающим концентрациям хлорамфеникола, как описано в разделе «Условия эксперимента». Результаты экспериментов представлены на рис. 3.

По уровню устойчивости к хлорамфениколу тестируемые промоторы можно расположить в следующем порядке (от слабого к сильному): *tkt* — *Cgl0284* — *fbr* — *Cgl2628* — *lysC*(B10945) — *cspB*(ATCC14067) — *yuc* — *cspB*(B-10945) — *lysC*(ATCC13032) — *sod* — *leuC*(*Cgl1315*) — *cspB**(B-10945) — *eftu*(*tuf*) (см. табл. 3). Наиболее высокий уровень устойчивости (до 20 мкг/мл) обеспечивал промотор гена *eftu*.

В группу сильных промоторов (уровень устойчивости 12—14 мкг/мл) были отнесены промоторы генов *sod* и *leuC*. Наши результаты относительно силы промоторов *tuf* (*eftu*) и *sod* совпадают с полученными ранее [3], что свидетельствует об адекватности используемой нами системы.

Высокий уровень устойчивости (до 20 мкг/мл) также обеспечивала плазмида *pcsp*40cat*, которая в составе клонированного фрагмента содержала точковую замену вне промоторной области, в начале

гена *cat*. Известно, что уровень экспрессии генов определяется не только силой промотора, но и структурой окружающих его последовательностей [11].

Сравнительный анализ силы промоторов также продемонстрировал, что промоторы генов *lysC*, *fbp* и *pus*, вовлеченных в контроль биосинтеза лизина, являются слабыми (уровень устойчивости к хлорамфениколу 2—4 мкг/мл) и могут служить мишенями для интенсификации работы генов при конструировании штаммов-продуцентов лизина.

Повышение продукции лизина за счет увеличения экспрессии гена *ddh*

Известно, что изменение уровня экспрессии генов, контролируемых лимитирующие стадии синтеза лизина, повышает продукцию аминокислоты клетками *C. glutamicum* [12]. В качестве мишени для усиления продукции лизина нами был выбран ген *ddh*, контролирующий образование диаминопимелатдегидрогеназы, катализирующей синтез D,L-2,6-диаминопимелата — ключевого промежуточного метаболита в синтезе лизина.

С помощью методов генной инженерии были сконструированы производные штамма *C. glutamicum* GEN2-1 (*lysC*^{A279TS317A}, *hom*^{V59A}), которые содержали либо две копии гена *ddh* под контролем собственного промотора, либо ген *ddh* под контролем сильного промотора гена *sod*. Такие штаммы были получены с использованием плазмид pICA-*sod-ddh* и pICA-2*xddh*, обеспечивающих замещение нативного гена на *sod-ddh* или 2*xddh* с помощью гомологичной рекомбинации (см. «Условия эксперимента»). Уровень транскрипции гена *ddh* у полученных штаммов был исследован с использованием технологии ПЦР в реальном времени (рис. 4).

Оказалось, что уровень транскрипции гена *ddh* у штамма с дубликацией гена GEN2-1(2*xddh*) вдвое превышал уровень транскрипции этого гена у исходного штамма GEN2-1. Замена собственно-

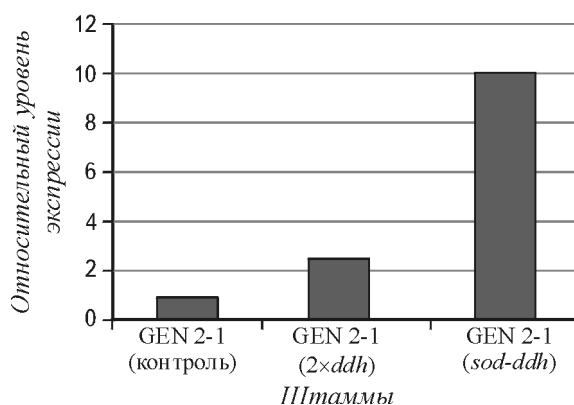


Рис. 4. Уровень транскрипции гена *ddh*, определенный с помощью ПЦР в реальном времени

го промотора на сильный промотор *sod* привела к значительному (почти в 10 раз) повышению уровня транскрипции гена *ddh*.

Уровень активности диаминопимелатдегидрогеназы у сконструированных штаммов также существенно увеличился (табл. 4). Активность фермента у штамма GEN2-1(2*xddh*) с дубликацией гена *ddh* увеличилась в 1,9 раза, а штамма GEN2-1(*sod-ddh*) — в 3,9 раза по сравнению с исходным штаммом.

Производство лизина у полученных штаммов с измененным уровнем активности диаминопимелатдегидрогеназы была исследована в пробирочных тестах (табл. 5).

Как видно из табл. 5, повышение активности диаминопимелатдегидрогеназы за счет дубликации гена *ddh* приводит к увеличению продукции лизина на 9% по сравнению с исходным штаммом. Однако еще большее повышение активности фермента с помощью сильного промотора гена *sod* не привело к дальнейшему увеличению продукции аминокислоты. Следовательно, наивысший уровень накопления лизина в КЖ достигается при оптимальном уровне активности ферментов биосинтеза.

Таблица 4

Активность диаминопимелатдегидрогеназы у штаммов *C. glutamicum*

Штамм	Активность ДАПД, нмоль NADPH/мин/мг белка
GEN2-1 (исходный)	310
GEN2-1(2 <i>xddh</i>)	580
GEN2-1(<i>sod-ddh</i>)	1200

Таблица 5

Производство лизина штаммами *C. glutamicum* с разным уровнем экспрессии гена *ddh*

Штамм <i>C. glutamicum</i>	Накопление лизина в КЖ, г/л
GEN2-1 (исходный)	16,0
GEN2-1(2 <i>xddh</i>)	17,3
GEN2-1(<i>sod-ddh</i>)	17,4

Таким образом, полученный в данной работе набор промоторов разной силы является важным инструментом для оптимизации работы генов при конструировании штаммов-продуцентов лизина. Помимо ранее охарактеризованных промоторов генов *sod* и *eftu* к группе сильных промоторов может быть отнесен промотор гена *leuC*; менее сильным является промотор гена *cspB*. Изученные нами промоторы генов, влияющих на уровень синтеза лизина (*lysC*, *pyc*, *tkt*, *fbp*), являются довольно слабыми, поэтому при дальнейшем конструировании штамма-продуцента целесообразно было бы исследовать действие промоторов разной силы с целью модулировать активность интегральных генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62614X0003) с использованием уникальной научной установки (УНУ) — Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов».

Получено 26.12.15

ЛИТЕРАТУРА

- Heider, S.A.E. Engineering microbial cell factories: Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* with a focus on non-natural products / S.A.E. Heider, V.F. Wendisch // J. Biotechnol. — 2015. — V.10. — P. 1170—1184.
- Patek, M. Promoters of *Corynebacterium glutamicum* / M. Patek, J. Nesvera, A. Guyonvarch, O. Reyes, G. Leblon // J. Biotechnol. — 2003. — V.104. — P. 311—323.
- Becker, J. Amplified Expression of Fructose 1,6-Bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* Increases In Vivo Flux through the Pentose Phosphate Pathway and Lysine Production on Different Carbon Sources / J.Becker, C. Klopprogge, O. Zelder, E. Heinzle, C. Wittmann // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — V.71(12). — P.8587—8596.
- Tateno, T. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis* α -amylase using *cspB* promoter and signal sequence / T. Tateno, H. Fukuda, A. Kondo // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V.77. — P.533—541.
- Becker, J. From zero to hero—Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production / J. .Becker, O. Zelder, S. Hafner, H. Schroderand, C Wittman // Metabolic Eng. — 2011. — V.13. — P.159—168.
- Schrumpf, B. Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum* / B. Schrumpf, L. Eggeling, H. Sahm // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1992. — V.37. — P. 566—571.
- Ростова Ю.Г., Конструирование челночного вектора для коринебактерий и *E. coli*. Клонирование и изучение экспрессии гена *lysC* / Ю.Г. Ростова, М. Ю. Передельчук, А.Л. Окорочков, М.М Гусятинер, В.Г. Дебабов // Биотехнология. — 1993. — № 4. — С. 14—17.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование [Под ред.акад. А.А. Баева и д-ра биол. наук К.Г. Скрыбина]. — М.: Мир, 1984. — 480с.
- Сидорук К.В., Левитин Е.И., Пиксацова О.В. Универсальный метод выделения высокомолекулярной ДНК из микроорганизмов, основанный на предварительной обработке биомассы раствором ацетата аммония. Актуальные вопросы генетики, радиобиологии и радиэкологии: Вторые чтения, посвященные памяти В.И.Корогодина и В.А.Шевченко: Тез. докл. — Дубна: ОИЯИ, 2008. — С. 100.
- Van der Rest, M.E., A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA / M.E. Van der Rest, C. Lange, D. Molenaar // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — V. 52(4). — P.541—545.
- Cremer, J. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* / J. Cremer, C. Treptow, L. Eggeling, H. Sahm // J. Gen. Microbiol. — 1988. — V. 134. — P. 3221—3229.
- Merkamm, M. Superoxide dismutase in cellular viability *Corynebacterium melassecola* and role of cellular viability / M. Merkamm, J. Guyonvarch // J. Bacteriol. — 2001. —V. 183(4). — P. 1284.

M.G. TARUTINA, N.M. RAEVSKAYA, T.E. SHUSTIKOVA*, L.E. RYABCHENKO, and A.S. YANENKO*

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

e-mail: igenetic@yandex.ru
yanenko@genetika.ru

Assessment of Effectiveness of *Corynebacterium glutamicum* Promoters and their Application to Enhancement of Gene Activity in Lysine-Producing Bacteria

A pNS-cat72 vector has been designed on the basis of the replicative vector pNS2 and reporter gene *cat* of Tn9 transposon encoding the chloramphenicol acetyltransferase for cloning of various gene promoters and determining their promoter strength from the chloramphenicol resistance in *Corynebacterium glutamicum* strains. Using that vector, the promoter strengths of various genes in the *Corynebacterium glutamicum* GEN1-2 (*lys*^{CA279T, S317A}) strain containing aspartokinase resistant to the lysine and threonine feedback inhibition were studied. It was found out that the promoters of the *eftu*, *sod*, *cspB* and *leuC* genes show higher level of chloramphenicol resistance than the promoters of the *lysC*, *pyc*, *tkt*, *fbp* genes that are involved in the lysine biosynthesis control. It was shown that the replacement of the natural *ddh* promoter by the *sod* promoter increases the level of transcription almost by 10 times, whereas the diaminopimelate dehydrogenase activity is grown by 3—4 times resulting in the 9% enhancement of the lysine production. The investigated promoters set with different strengths is a necessary tool for the optimization of gene activities and construction of metabolite-producing strains.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*, enzyme activity, gene expression, lysine synthesis, promoters.

*Authors for correspondence.