

УДК 579.6

## Сравнение моно- и бифункциональной хоризматсинтаз в клетках *Escherichia coli*, не продуцирующих и продуцирующих фенилаланин

© 2017 г. А.Е. СЛЕСАРЕВА, Л.Г. КУН, В.Г. ДОРОШЕНКО\*

ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО АГРИ), Москва, 117545

\*e-mail: Vera\_Doroshenko@agri.ru

Поступила в редакцию 04.10.2016

Принята в печать 03.11.2016

Хоризматсинтаза, последний фермент общего ароматического пути, активность которого имеет абсолютную зависимость от восстановленного флавинонуклеотида. Бифункциональная хоризматсинтаза *Saccharomyces cerevisiae* (продукт гена *ARO2*) способна восстанавливать флавин с использованием NADPH в отличие от монофункциональной хоризматсинтазы *Escherichia coli* (продукт гена *aroC*), которая этой способностью не обладает и активность которой зависит от флавинредуктазной функции клетки. Для сравнения *in vivo* двух типов хоризматсинтаз структурная часть гена *ARO2* была химически синтезирована с заменой редких для *E. coli* кодонов. После проверки экспрессии *ARO2* в T7-системе были получены изогенные штаммы *E. coli* TG1Δ*aroC*P<sub>tac</sub>-*ARO2* и TG1Δ*aroC*P<sub>tac</sub>-*aroC*. Сравнительный анализ белков клеточных экстрактов этих штаммов, а также определение эффективности продукции гибридных RBS *in silico* показали, что синтез белка AroC в TG1Δ*aroC*P<sub>tac</sub>-*aroC* был выше, чем ARO2 в клетках TG1Δ*aroC*P<sub>tac</sub>-*ARO2*. Введение модификаций P<sub>tac</sub>-*ARO2* и P<sub>tac</sub>-*aroC* полностью восстанавливало рост ароматического ауксотрофа TG1Δ*aroC* на минимальной солевой среде с глюкозой, а также продукцию фенилаланина у штамма *E. coli* DV1017Δ*aroC* с инактивированной хоризматсинтазой. Одинаковый положительный эффект P<sub>tac</sub>-*aroC* и P<sub>tac</sub>-*ARO2* на биосинтез фенилаланина у штамма ΔV1017*DtyrR*, хоризматсинтаза которого оказалась «узким местом», позволил сделать вывод об отсутствии лимитирования восстановленным флавином монофункциональной хоризматсинтазы при ее сверхпродукции в клетках *E. coli*.

**Ключевые слова:** восстановленный флавинонуклеотид, продуцент фенилаланина, хоризматсинтаза, *Escherichia coli*.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2017-33-2-48-55

Хоризматсинтаза (КФ 4.2.3.5) катализирует последнюю седьмую реакцию общего ароматического пути, трансформацию 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфата в хоризмовую кислоту с отщеплением неорганического фосфата [1]. Эта реакция не сопровождается изменением окислительно-восстановительного статуса ее компонентов, но сам фермент имеет абсолютную зависимость от восстановленного флавинонуклеотида (FMNH<sub>2</sub>), являющегося крайне нестабильным соединением [2, 3]. В зависимости от источника FMNH<sub>2</sub> хоризматсинтазы разделяют на моно- и бифункциональные. Последние, обладающие еще и флавинредуктазной активностью,

были впервые обнаружены в грибах [3] и сравнительно недавно в *Mycobacterium tuberculosis* [4]; они способны восстанавливать флавин за счет восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида: NADPH – у грибов и NADH – у *M. tuberculosis*. Монофункциональные ферменты присутствуют в клетках бактерий, растений и простейших [5]. Характерной особенностью монофункциональных хоризматсинтаз является то, что их активность *in vitro* детектируется только в отсутствие кислорода, тогда как активность бифункциональных ферментов определяется в аэробных условиях и зависит от наличия NADPH или NADH [3, 4].

**Список сокращений:** ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; ОП – оптическая плотность; ПААГ – полиакриламидный гель; ПЦР – полимеразная цепная реакция; среда LB – среда Луриа–Бертани; FMNH<sub>2</sub> – восстановленная форма флавинонуклеотида; MALDI-TOF – времяпролетная спектрометрия с использованием матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации; NADH – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида; NADPH – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата; RBS – сайт связывания рибосом; последовательность SD – последовательность Шайна–Дальгарно; SDS – додецилсульфат Na.

Анализ филогенетического родства моно- и бифункциональных хоризматсинтаз позволил предположить, что они имели одного предшественника, который, по-видимому, обладал флавинредуктазной активностью [6]. Бифункциональность, вероятно, была утрачена в отсутствие селективного давления в клетках организмов с высокой неспецифической флавинредуктазной активностью, примером которых может служить *Escherichia coli* [7].

Утрата бифункциональности хоризматсинтазой могла привести к появлению еще одного регуляторного уровня – зависимости синтеза ароматических аминокислот от наличия FMN<sub>2</sub> в клетке. Для выявления такой зависимости было проведено сравнение бифункциональной хоризматсинтазы из *Saccharomyces cerevisiae* с монофункциональным ферментом *E. coli* в клетках, не продуцирующих и продуцирующих фенилаланин.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Бактериальные штаммы и плазмиды

В работе использовали известные лабораторные штаммы [8]: *E. coli* K-12 TG1 (*supE*hsdΔ5*thi*Δ(*lac-proAB*)F'(*tra*Δ36*proAB*<sup>+</sup>*lacI*<sup>q</sup>*lacZ*ΔM15)); *E. coli* В BL21(DE3) (F<sup>-</sup>*dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)*gal*λ (DE3)) (из коллекции ЗАО «АГРИ»), а также продуцент фенилаланина DV1017 (MG1655P<sub>L</sub>-*yddGMUDGAL*(*pheA*<sup>fb</sup>*aroG4aroL*)Δ*pheA**tyrA-LAA*) [9], который депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ФГУП ГосНИИгенетика, Москва) под номером В-12750.

Плазмиду pET-22b(+) (Novagen, США) использовали в качестве вектора для клонирования целевого гена за промотором, узнаваемым РНК-полимеразой фага T7.

В работе был применен инструментарий рекомбинационной инженерии, разработанный и доступный в ЗАО АГРИ. Штамм *E. coli* CC118 (*λpir*<sup>+</sup>) использовали для клонирования генов *aroC* и *ARO2* в интегративном векторе pAN162-*lattL*-Tc<sup>R</sup>-*lattR* (oriR<sub>γ</sub>, Tc<sup>R</sup>) по методу интеграции Dual in/out [10]. Плазмида pAN123(φ80Int, Ap<sup>R</sup>) была источником интегразы фага φ80 в этой методике. Плазмиды pMW-Int-Xis (pMW118ts, Ap<sup>R</sup>, *int*, *xis*(λ)) и pKD46 (oriR101, *repA101*(ts), *araBp-gam-bet-exo*-Ap<sup>R</sup>) использовали в качестве источников Int/Xis-зависимой системы сайт-специфической рекомбинации фага λ и λRed-зависимой общей рекомбинации, соответственно [11].

## Среды

Штаммы выращивали на средах известного состава: LB, SOB, минимальной среде M9 с глюкозой (0,4%) (Sigma-Aldrich, США) [8]. Антибиотики добавляли в следующих концентрациях, мкг/мл: ампициллин («Биосинтез», РФ) – 200, тетрациклин («Фарма», РФ) – 12,5, хлорамфеникол (Panacea, Испания) – 25. Среда для культивирования штаммов-продуцентов в ферментерах была следующего состава, г/л: глюкоза («Новосибхимфарм», РФ) – 50; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> («Химмед», РФ) – 0,6; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> («Диа-М» РФ) – 0,6; FeSO<sub>4</sub> («Реахим», РФ) – 0,01; MnSO<sub>4</sub> («Реахим») – 0,01; дрожжевой экстракт – 2 («Диа-М»).

## Рост культур *E. coli*

Ночную культуру, выращенную в среде M9 (37°C; 240 об/мин), разводили до ОП<sub>660</sub> 0,05 средой того же состава и культивировали в инкубаторе TVS062CA (Advantec Toyo Co. Ltd., Япония) при 37°C (70 об/мин). ОП<sub>660</sub> культуры определялась в автоматическом режиме.

## Ферментация штаммов-продуцентов фенилаланина

Клетки культивировали в аэробных условиях при 37°C, pH 6,7 поддерживали с помощью NH<sub>4</sub>OH («Химмед»). Культуры, выросшие на чашках, инокулировали в колбы (0,75 л) со средой LB (0,03 л), выращивали на качалке при 240 об/мин и 37°C, а затем в ферментационных аппаратах. Ферментацию проводили в аппаратах Biostat Q (BBI, Germany) с общим объемом 1 л и рабочим объемом 0,3 л.

Количество фенилаланина и тирозина в культуральной среде определяли методом ВЭЖХ (HPLC Shimadzu series 10 with UV detector, Япония) с использованием колонки Separon CGC×150mm SG CN 5 μm (Tessek Ltd., Praha, Czech Republic).

## Конструирование штаммов

Делеции генов *aroC* и *pgi*, интеграцию промотора P<sub>tac</sub> проводили с помощью комбинированного метода, основанного на сочетании Red-зависимой системы общей рекомбинации с Int/Xis-зависимой системой сайт-специфической рекомбинации фага λ, как было описано ранее [9]. Интеграцию генов *aroC* и *ARO2* в природный сайт *attB* фага φ80 в хромосоме *E. coli* осуществляли по методике Dual in/out [10]. Маркированные хромосомные модификации переносили из одного штамма в другой при помощи T4GT7-трансдукции [12].

## Генно-инженерные методики, ферменты, праймеры

Получение рекомбинантных плазмид осуществляли по известным протоколам [8] с использованием ферментов производства Thermo Scientific (Литва). ПЦР проводили с применением *Taq*-полимеразы («Евроген», Москва) в соответствии с инструкциями производителя. Химический синтез олигонуклеотидов осуществлялся ЗАО «Синтол» (Москва). Последовательности олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров в ПЦР для получения модификаций хромосомы *E. coli*, представлены в табл. 1.

Фрагмент ДНК, содержащий маркированный промотор  $P_{tac}$ , получали с помощью двух последовательных ПЦР. Фрагмент ДНК  $\lambda attR-Cm^R-\lambda attL-P_{tac}$  амплифицировали с хромосомы штамма MG1655  $\lambda attR-Cm^R-\lambda attL-P_{tac}$  [11], а затем удлиняли с помощью ПЦР и олигонуклеотида, содержащего последовательность RBS<sub>10T7</sub>. Удаляемый *in vivo* маркер устойчивости к хлорамфениколу, используемый для получения делеций, амплифицировали с плазмиды pMW- $\lambda attL-Cm^R-\lambda attR$  [11]. Полученные генетические модификации проверяли секвенированием с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing

Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на автоматическом секвенаторе (ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer; Applied Biosystems, США).

## Получение оптимизированного для *E. coli* гена *ARO2*, кодирующего хоризматсинтазу *S. cerevisiae*

Для оптимизации экспрессии гена *ARO2* в клетках *E. coli* его структурная часть (GenBank NM\_001181013.1) была химически синтезирована (Sloning BioTechnology GmbH, Германия) с заменой 42 редких для *E. coli* кодонов (преимущественно для Arg и Leu, а также Gly и Pro), наличие которых могло влиять на образование полноразмерного пептида [13]. Химически синтезированный ген был получен в виде плазмиды pSlo1.1.ARO2. Для проверки экспрессии гена *ARO2* в *E. coli* он был переклонирован в плазмиду pET-22b(+) по рестрикционным сайтам *HindIII* и *NdeI*.

## Получение плазмид pAH162- $\lambda attL-Tc^R-\lambda attR-aroC$ и pAH162- $\lambda attL-Tc^R-\lambda attR-ARO2$

Плазмиду, содержащую структурную часть гена *aroC*, конструировали с помощью клонирования по сайтам *PstI* и *EcoRI* фрагмента ДНК,

Таблица 1

## Олигонуклеотиды, использованные в работе

### Oligonucleotides used in this work

| №  | Последовательность (5'→3')  | Применение   |
|----|---|--|
| 1  | Ataacctgcagtgatggctggaac  | ДНК <i>aroC</i><br>для клонирования  |
| 2  | tattgaattctaccagcgtggaatcag   |  |
| 3  | Atgtatatctccttctaaagttaatcctgtgtgaaatgttatccgct                           | Фрагменты ДНК<br>$\lambda attL-Cm^R-\lambda attR-P_{tac}$ -<br>RBS <sub>10T7</sub> для интеграции<br>перед <i>ARO2</i><br>(олигонуклеотиды № 3–5)<br>и <i>aroC</i> (№ 3, 4, 6) |
| 4  | acggatggccttttgcgtttctacaactcttttcgctcaagttagataaaaaagctgaac              |  |
| 5  | gggtgtgacgcggaacagtttgccaacgcttgacatatgtatatctccttctaaagtaat              |  |
| 6  | tacgcgaaagagttgtccaattgtgttccagccatatgtatatctccttctaaagtaat               |  |
| 7  | Gatggctggaacacaattggacaactcttcgcctcctcaagttagataaaaaagctgaacgagaacg       | Фрагмент ДНК<br>для получения делеции<br>гена <i>aroC</i>  |
| 8  | Ttaccagcgtggaatcagcttctcacatcgccattgaaagcctgctttttataactaagttggcattataa   |  |
| 9  | Catgctgtggaagtcttttgaagaccgactcggcgtcaagttagataaaaaagctgaacgagaacg        | Фрагмент ДНК<br>для получения делеции<br>гена <i>tyrR</i>  |
| 10 | Aatgaaaacatcaatccaacgcagaccgctgctcgcctcaagttagataaaaaagctgaacgagaacg      |  |
| 11 | Ttaaccgcgccacgctttatagcggttaatcagaccctgaagcctgctttttataactaagttggcattataa | Фрагмент ДНК<br>для получения делеции<br>гена <i>pgi</i>   |
| 12 | Ttaaccgcgccacgctttatagcggttaatcagaccctgaagcctgctttttataactaagttggcattataa |  |

полученного с помощью амплификации (см. табл. 1). Плазмиду, содержащую структурную часть гена *ARO2*, получали переклонированием из плазмиды pSlo1.1.*ARO2* по сайтам *Bam*HI и *Eco*RI.

### Экспрессия гена *ARO2* в T7-системе и SDS-ПААГ-электрофорез клеточных белков

Клетки BL23(DE3)/pET-*ARO2* инокулировали в 5 мл среды LB, содержащей ампициллин, и выращивали при 37°C (240 об/мин) до ОП<sub>600</sub> ~ 0,3. Для индукции экспрессии добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали инкубацию в течение 3 ч. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 20 мкл воды, добавляли 20 мкл буфера для образцов (50 мМ трис-НСl, рН 6,8; 5%-ный SDS; 1,4 М 2-меркаптоэтанол; 10%-ный глицерин; 0,05%-ный бромфенол синий) и разрушали кипячением на водяной бане в течение 15 мин. Анализ бактериальных белков осуществляли с помощью электрофореза в 12%-ном ПААГ с 0,1%-ным SDS [8]. Все использованные компоненты были производства фирмы Sigma-Aldrich.

### Масс-спектрометрический анализ

Пробы белков осуществлялись в Протеомном исследовательском центре Института биомедицинской химии РАН (Москва) с использованием времяпролетной спектрометрии и метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF). Белки идентифицировали по наборам масс протеолитических пептидов с использованием опции пептидного фингерпринта программы Mascot (Matrix Science, США, <http://www.matrixscience.com>). Поиск проводили по белковой базе данных Национального центра информации по биотехнологии (NCBI, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

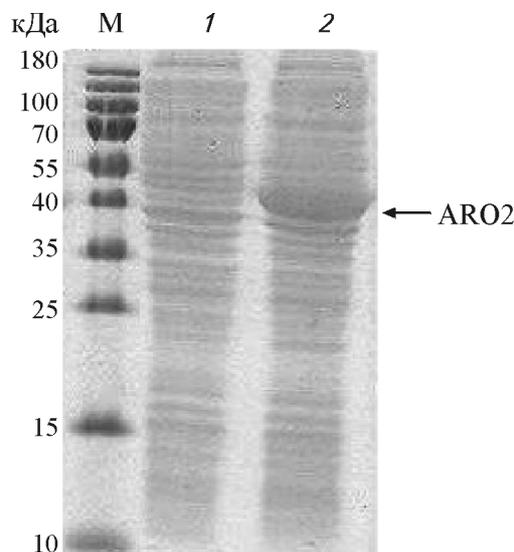
#### Экспрессия гена *ARO2* в системе транскрипции бактериофага T7

Для проверки экспрессии синтезированного гена *ARO2* с оптимизированными для *E. coli* кодонами использовали вновь полученную плазмиду pET-22b-*ARO2*, где этот ген был поставлен под контроль промотора  $\phi$ 10, узнаваемого РНК-полимеразой фага T7. Экспрессию *ARO2* в системе T7

тестировали в клетках BL21(DE3), индуцированных ИПТГ. Как видно из электрофореграммы на рис. 1, в клеточном экстракте BL23(DE3)/pET-22b-*ARO2* присутствовал белок, соответствующий по размеру мономеру *ARO2* (40,8 кДа).

#### Получение изогенных производных штамма *E. coli* TG1 $\Delta$ *aroC*, содержащих P<sub>tac</sub>-*ARO2* и P<sub>tac</sub>-*aroC* в хромосоме

Для сравнения двух типов хоризматсинтаз кодирующие области *ARO2* и *aroC* интегрировали независимо в природный сайт *attB* фага  $\phi$ 80 в хромосоме *E. coli*. После этого перед ними интегрировали промотор P<sub>tac</sub>. В результате были получены генетические модификации  $\phi$ 80*attL*-P<sub>tac</sub>-*ARO2*- $\phi$ 80*attR* и  $\phi$ 80*attL*-P<sub>tac</sub>-*aroC*- $\phi$ 80*attR*. В обоих случаях последовательность промотора (с -40-го по +31-й нуклеотид относительно старта мРНК (+1)) была соединена с кодирующей частью генов через 25 нуклеотидов, предшествующих *ARO2* в pET-22b-*ARO2*. Эти 25 нуклеотидов включали SD-последовательность гена *l0* фага T7 и так называемый трансляционный энхансер [14].



**Рис. 1.** Электрофоретический анализ в 12,5%-ном SDS-ПААГ клеточных экстрактов штаммов *E. coli* BL23(DE3)/pET-22b (1) и BL23(DE3)/pET-22b-*ARO2* (2), выращенных с добавлением 1 мМ ИПТГ (Thermo Scientific). М-маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific)

**Fig. 1.** Electrophoresis in 12.5% SDS-PAGE of cell extracts of *E. coli* strains BL23(DE3)/pET-22b (1) and BL23(DE3)/pET-22b-*ARO2* (2) grown with 1 mM IPTG (Thermo Scientific). M, markers of molecular masses (Thermo Scientific)

### Рост штаммов TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 и TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC на минимальной среде M9

Штаммы TG1 $\Delta$ aroC $\phi$ 80attL-ARO2- $\phi$ 80attR и TG1 $\Delta$ aroC $\phi$ 80attL-aroC- $\phi$ 80attR, содержащие интегрированные гены ARO2 и aroC без промоторов, не росли на минимальной среде M9 без добавления ароматических аминокислот и витаминов так же, как и исходный штамм TG1 $\Delta$ aroC (рис. 2, кривая 2). После интеграции промотора  $P_{tac}$  штаммы TG1 $\Delta$ aroC $\phi$ 80attL- $P_{tac}$ -ARO2- $\phi$ 80attR (обозначенный ниже, как TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2) и TG1 $\Delta$ aroC $\phi$ 80attL- $P_{tac}$ -aroC- $\phi$ 80attR (обозначенный ниже, как TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC) демонстрировали рост в этих условиях (рис. 2, кривые 3, 4). Таким образом, обе конструкции комплементировали функцию AroC без добавления ИПТГ. Штамм TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 имел более высокую скорость роста ( $\mu \sim 0,28 \text{ ч}^{-1}$ ) и достигал более высокой конечной ОП<sub>660</sub> ( $\sim 2$ ) по сравнению со штаммом TG1 ( $\mu \sim 0,25 \text{ ч}^{-1}$ ; ОП<sub>660</sub>  $\sim 1,7-1,8$ ) и TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC ( $\mu \sim 0,23 \text{ ч}^{-1}$ ; ОП<sub>660</sub>  $\sim 1,7-1,8$ ) (см. рис. 2). Небольшое преимущество в росте штамма TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 могло определяться как свойствами ARO2, так и различием в экспрессии генов ARO2 и aroC в клетках TG1 $\Delta$ aroC.

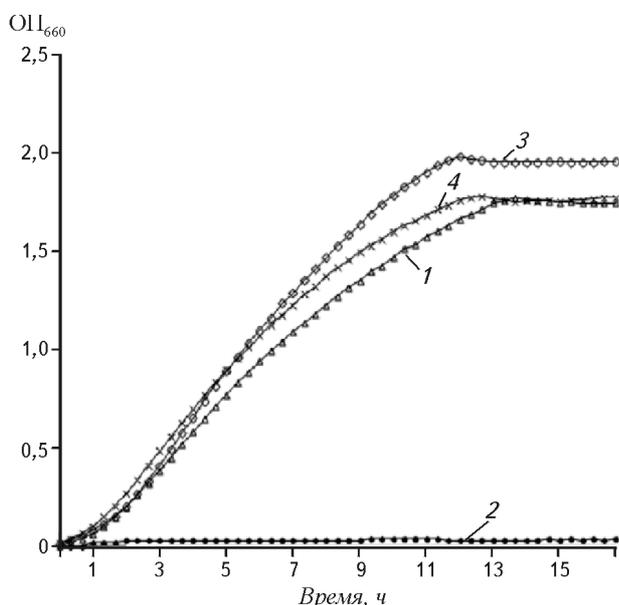


Рис. 2. Кривые роста на минимальной среде M9 штаммов *E. coli*: 1 – TG1; 2 – TG1 $\Delta$ aroC; 3, 4 – TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 и TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC, соответственно

Fig. 2. Growth curves in the M9 minimal medium of *E. coli* strains TG1 (1); TG1 $\Delta$ aroC (2), TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 (3) and TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC (4)

### Оценка экспрессии генов ARO2 и aroC в клетках TG1 $\Delta$ aroC с помощью визуализации и последующей идентификации белков посредством масс-спектрометрии

Для тестирования синтеза ARO2 и AroC в TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 и в TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC белки из клеточных экстрактов этих штаммов были проанализированы с помощью SDS-ПААГ (рис. 3). Белковая полоса, близкая по подвижности к номеру ARO2 (40,8 кДа) была слабо видна только в экстракте клеток TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2, индуцированных ИПТГ (рис. 3, дорожка 5). Белковая полоса, соответствующая по размеру мономеру AroC (39,1 кДа), присутствовала в экстрактах клеток TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC независимо от добавления ИПТГ (рис. 3, дорожки 3, 6). Для подтверждения наличия ARO2 и AroC в упомянутых пробах, соответствующих нумерации дорожек на рис. 3, а также для поиска ARO2 в пробе 2 (клеточный экстракт TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 без ИПТГ), белковые зоны, обозначенные овалами на рис. 3, были вырезаны из геля, обработаны трипсином (Sigma-Aldrich) и проанализированы с помощью MALDI-TOF. ARO2 не был обнаружен в пробе 2 (без ИПТГ), но его присутствие в пробе 5 (с добавлением ИПТГ) оценивалось в 207 баллов (баллы > 86 были значимыми.) Присутствие AroC в пробах 3 и 6 (без и с добавлением ИПТГ) оценивалось в 160 и 169 баллов, соответственно.

Таким образом, ARO2 был визуализирован только в экстрактах клеток, индуцированных ИПТГ, в отличие от AroC, обнаруженного в клетках, выращенных как с ИПТГ, так и без него (см. рис. 3). В связи с этим было сделано заключение, что экспрессия гена ARO2 была слабее, чем гена aroC. Такой вывод подтвердился при количественной оценке эффективности трансляции с помощью UTR Designer [15]. Этот *in silico* метод предсказал в четыре раза более высокую трансляцию RBS<sub>10T7</sub>-aroC по сравнению с RBS<sub>10T7</sub>-ARO2. Следовательно, слегка улучшенный рост TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 по сравнению со штаммами TG1 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC и TG1, содержащими ген aroC дикого типа, мог быть обусловлен свойствами бифункциональной хоризматсинтазы ARO2.

### Сравнение моно- и бифункциональных хоризматсинтаз у продуцента фенилаланина DV1017

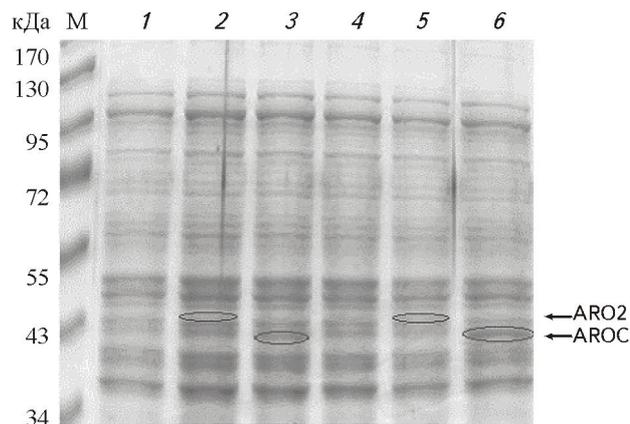
Предполагая, что преимущества бифункционального фермента могли быть выявлены в усло-

виях сверхпродукции соединений, образующихся из хоризмата, в клетки продуцента фенилаланина с инактивированной хоризматсинтазой DV1017 $\Delta$ aroC (этот штамм не синтезировал фенилаланин) были введены модификации P<sub>tac</sub>-ARO2 и P<sub>tac</sub>-aroC. Полученные штаммы DV1017 $\Delta$ aroC P<sub>tac</sub>-ARO2 и DV1017 $\Delta$ aroC P<sub>tac</sub>-aroC продуцировали фенилаланин на уровне штамма DV1017 и, так же как DV1017, помимо фенилаланина накапливали примесные количества тирозина (табл. 2). DV1017 в дополнение к гену pheA<sup>fbr</sup>, кодирующему нечувствительную к фенилаланину хоризматмутазу/префенатдегидратазу, содержал ослабленный аллель хоризматмутазы/префенатдегидрогеназы tyrA-LAA [9].

Поскольку продукция фенилаланина не возросла ни у одного из полученных штаммов, был сделан вывод, что активность хоризматсинтазы не является узким местом в биосинтезе аминокислоты штаммом DV1017. Вероятно, поэтому клеточная флавинредуктазная активность могла быть достаточной для проявления активности хоризматсинтазы AroC и использование бифункциональной хоризматсинтазы ARO2 не давало преимуществ в этих условиях.

### Сравнение моно- и бифункциональных хоризматсинтаз в клетках продуцента фенилаланина DV1017 $\Delta$ tyrR

Активность хоризматсинтазы могла стать узким местом в биосинтезе фенилаланина в результате дальнейшего расширения ароматического пути у штамма DV1017, например, после инактивации репрессора этого пути TyrR [16]. Действительно, введение делеции  $\Delta$ tyrR в DV1017 приводило к улучшению показателей штамма: выход фенилаланина из глюкозы вырос на 1%, а продуктивность – на 0,02 г/(л·ч) (рис. 4). Введение в



**Рис. 3.** Электрофоретический анализ в 12,5%-ном SDS-ПААГ клеточных экстрактов штаммов TG1 (1, 4); TG1 $\Delta$ aroC P<sub>tac</sub>-ARO2 (2, 5); TG1 $\Delta$ aroC P<sub>tac</sub>-aroC (3, 6), выращенных в среде M9 без (1–3) и с добавлением 1 мМ ИПТГ (4–6). Овалами обозначены зоны, исследованные с помощью масс-спектроскопии. М – маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific)

**Fig. 3.** Electrophoresis in 12.5% SDS-PAGE of cell extracts of strains TG1 (1, 4), TG1 $\Delta$ aroC P<sub>tac</sub>-ARO2 (2, 5), and TG1 $\Delta$ aroC P<sub>tac</sub>-aroC (3, 6) grown in M9 medium with 1 mM IPTG (4–6) or without it (1–3). Ovals indicate zones investigated by mass-spectroscopy. M, markers of molecular masses (Thermo Scientific)

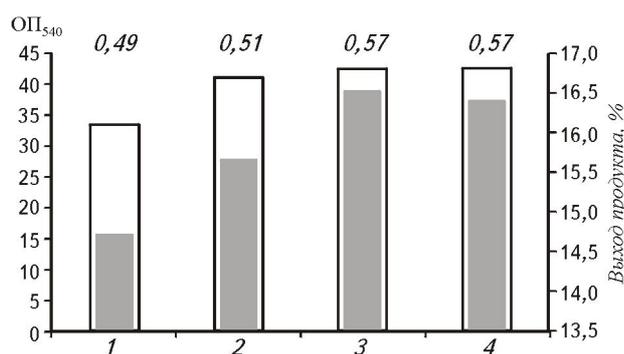
штамм DV1017 $\Delta$ tyrR модификаций P<sub>tac</sub>-ARO2 или P<sub>tac</sub>-aroC повысило выход фенилаланина из глюкозы на 0,8 и 0,9%, соответственно, а продуктивность – на 0,06 г/(л·ч) по сравнению с соответствующими показателями для DV1017 $\Delta$ tyrR (см. рис. 4). Хоризматсинтаза действительно являлась узким местом биосинтеза фенилаланина штаммом DV1017 $\Delta$ tyrR, так как, было установлено, что введение дополнительного гена этого фермента приводило к увеличению продукции аминокислоты. Однако положительный эффект P<sub>tac</sub>-ARO2 и P<sub>tac</sub>-aroC на продукцию фенилаланина был примерно одинаков.

Таблица 2

### Накопление фенилаланина и тирозина в среде

#### Accumulation of phenylalanine and tyrosin in a medium

| Штамм <i>E. coli</i>                          | ОП <sub>540нм</sub> | Фенилаланин, (Phe, г/л) | Тирозин, (Tyr, мг/л) |
|---|---------------------|-------------------------|----------------------|
| DV1017  | 32±2                | 6,6±0,5                 | 7±2                  |
| DV1017 $\Delta$ aroC                          | 13±2                | <0,02                   | <0,02                |
| DV1017 $\Delta$ aroC · P <sub>tac</sub> -aroC | 34±2                | 6,8±0,5                 | 10±2                 |
| DV1017 $\Delta$ aroC · P <sub>tac</sub> -ARO2 | 35±2                | 6,7±0,5                 | 9±2                  |



**Рис. 4.** Показатели продуцирующих фенилаланин штаммов *E. coli*: 1 – DV1017; 2 – DV1017Δ*tyrR*; 3 – DV1017Δ*tyrRP*<sub>lac-aroC</sub>; 4 – DV1017Δ*tyrRP*<sub>lac-ARO2</sub>. Оптическая плотность и выход фенилаланина изображены в виде белых и серых столбцов, соответственно. Продуктивность (г/(л·ч)) указана в виде цифр над столбцами

**Fig. 4.** Characteristics of *E. coli* Phe-producing strains: (1), DV1017; (2), DV1017Δ*tyrR*; (3), DV1017Δ*tyrRP*<sub>lac-aroC</sub>; and (4), DV1017Δ*tyrRP*<sub>lac-ARO2</sub>. Optical density and Phe yield are represented as white and gray columns, respectively. Productivity (g/(L·h)) is given as numbers over columns

### Тестирование бифункциональности ARO2 в клетках продуцента фенилаланина *E. coli* Δ*pgi*

В предыдущих экспериментах функциональная хоризматсинтаза ARO2 не показала преимуществ перед AroC, поэтому возник вопрос о проявлении свойств бифункциональности ARO2 в клетках *E. coli*. Поскольку бифункциональная хоризматсинтаза ARO2 является зависимой от NADPH, она могла бы иметь преимущества перед монофункциональным ферментом в случае усиления метаболического пути, в котором образуется указанный кофермент.

Предшественник ароматических соединений эритрозо-4-фосфат образуется в пентозофосфатном пути, являющемся одним из основных источников NADPH в клетках *E. coli* [17]. Для того, чтобы перенаправить поток углерода через пентозофосфатный путь, у штаммов DV1017Δ*aroC*<sub>lac-ARO2</sub> и DV1017Δ*aroC*<sub>lac-aroC</sub> делетировали ген *pgi*, кодирующий фосфоглюкозоизомеразу, и сравнивали скорость роста штаммов Δ*pgi* и исходных штаммов в процессе ферментации. Время ферментации штаммов Δ*pgi* увеличилось до > 20 ч, тогда как исходные штаммы потребляли ту же начальную концентрацию глюкозы за 13–15 ч. Замедленный рост штаммов Δ*pgi* на среде с глюкозой объяснялся нарушением окислительно-восстановительного потенциала клетки из-за избыточного образования NADPH в пентозофосфатном пути [18].

Тем не менее, культура штамма DV1017Δ*aroC*<sub>lac-ARO2</sub>Δ*pgi* достигла более высокой оптической плотности (ОП<sub>540</sub> = 35) и имела большую продуктивность (0,21 г/(л·ч)), чем DV1017Δ*aroC*<sub>lac-aroC</sub>Δ*pgi* (ОП<sub>540</sub> = 31, продуктивность – 0,16 г/(л·ч)), а выход фенилаланина из глюкозы у обоих штаммов Δ*pgi* снизился на 5 и 7%, соответственно, относительно исходных штаммов DV1017Δ*aroC*<sub>lac-ARO2</sub> и DV1017Δ*aroC*<sub>lac-aroC</sub>, у которых эта величина была равна 15%. Следовательно, перенаправление потока углерода через пентозофосфатный путь имело негативный эффект на ферментационные характеристики обоих изученных штаммов, но для штамма, содержащего ген ARO2, этот эффект был слабее. Штамм, синтезирующий бифункциональный фермент, оказался более устойчив к избытку NADPH в клетке.

Таким образом, хоризматсинтаза ARO2 проявила свою бифункциональность в клетках штамма Δ*pgi*, повысив их устойчивость к сверхпродукции NADPH за счет его потребления. Преимущества гетерологичной хоризматсинтазы перед собственным ферментом в клетках *E. coli* Pgi<sup>+</sup> не были выявлены.

Авторы благодарны С.М. Казаковой и Ю.В. Кулагиной (ЗАО АГРИ) за проведение ферментаций в аппаратах и А.Д. Киверо (ЗАО АГРИ) за количественный ВЭЖХ-анализ аминокислот в культуральной жидкости. Авторы чрезвычайно благодарны С.В. Машко (ЗАО АГРИ) за ценные замечания при чтении рукописи данной статьи.

### ЛИТЕРАТУРА

- Hawkes T.R., Lewis T., Coggins J.R., et al. Chorismate synthase: pre-steady-state kinetics of phosphate release from 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate. *Biochem. J.*, 1990, 265(3), 899–902.
- Balasubramanian S., Abell C., Coggins J.R. Observation of an isotope effect in the chorismate synthase reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112(1), 8581–8583.
- White P.J., Millar G., Coggins J.R. The overexpression, purification and complete amino acid sequence of chorismate synthase from *Escherichia coli* K12 and its comparison with the enzyme from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.*, 1988, 251(2), 313–322.
- Ely F., Nunes J., Schroeder E., et al. The *Mycobacterium tuberculosis* Rv2540c DNA sequence encodes a bifunctional chorismate synthase. *BMC Biochem.*, 2008, 9(13). doi: 10.1186/1471-2091-9-13.
- Brenda Database: <http://www.brenda-enzymes.org/>
- Macheroux P., Schmid J., Amrhein N., Schaller A. A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta*, 1999, 207(3), 325–334.

7. Morell H., Clark M.J., Knowles P.F., Sprinson D.B. The enzymic synthesis of chorismic and prephenic acids from 3-enolpyruvylshikimic acid 5-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242(2), 82–90.
8. Green M. R., Sambrook, J. *Molecular Cloning: laboratory Manual*, 4<sup>th</sup> edn. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, 2028 pp.
9. Doroshenko V.G., Shakulov R.S., Kazakova S.M., et al. Construction of an L-phenylalanine-producing tyrosine-prototrophic *Escherichia coli* strain using *tyrA* *ssrA*-like tagged alleles. *Biotechnol. Lett.*, 2010, 32(8), 1117–1121. doi: 10.1007/s10529-010-0265-1.
10. Minaeva N.I., Gak E.R., Zimenkov D.V., et al. Dual in/out strategy for genes integration into bacterial chromosome: a novel approach to step-by-step construction of plasmid-less marker-less recombinant *E. coli* strains with predesigned genome structure. *BMC Biotechnol.*, 2008, 8(63). doi: 10.1186/1472-6750-8-63
11. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В. и др. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме. *Мол. биол.*, 2005, 39(5), 823–831. (Katashkina Zh.I., Skorokhodova A.Iu., Zimenkov D.V., et al. Tuning of expression level of the genes of interest located in the bacterial chromosome. *Molekuliarnaya Biologiya* (Mol. Biol.), 2005, 39(5), 823–831.)
12. Wilson G.G., Young K.K.Y., Edlin G.J. High-frequency generalized transduction by bacteriophage T4. *Nature*, 1979, 280(5717), 80–82. doi: 10.1038/280080a0
13. Гурский Я.Г., Маримонт Н.Ю., Бибилашвили Р.Ш. Влияние внутриклеточных концентраций тРНК, соответствующих редким аргининовым кодонам AGG and AGA, на экспрессию генов в *Escherichia coli*. *Мол. биол.*, 1992, 26(5), 1080–1087. (Gurskii Ia.G., Marimont N.Iu. Bibilashvili R.Sh. The effect of intracellular concentrations of tRNA, corresponding to the rare arginine codons AGG and AGA, on the gene expression in *Escherichia coli*. *Molekuliarnaya Biologiya* (Mol. Biol.), 1992, 26(5), 1080–1087.)
14. Olins P.O., Rangwala S.H. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264(29), 16973–16976.
15. Seo S.W., Yang J.S., Kim I., et al. Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency. *Metab. Eng.*, 2013, 15, 67–74. doi: 10.1016/j.ymben.2012.10.006
16. Pittard J., Camakaris H., and Yang J. The TyrR regulon. *Mol. Microbiol.*, 2005, 55(1), 16–26. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04385.x
17. Sauer U., Canonaco F., and Heri S. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(8), 6613–6619. doi: 10.1074/jbc.M311657200
18. Canonaco F., Hess T.A., Heri S., et al. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, 204(2), 247–252.

## Comparison of Mono- and Bifunctional Chorismate Synthases in *Escherichia coli* Cells with or without Phenylalanine Production

A.E. SLESAREVA, L.G. KUHN, and V.G. DOROSHENKO\*

*The Closed Joint-Stock Company Ajinomoto-Genetika Research Institute (AGRI), 117545, Moscow Russia*

*e-mail: Vera\_Doroshenko@agri.ru*

Received October 04, 2016

Accepted November 03, 2016

**Abstract**—Chorismate synthase, the last enzyme in the common aromatic pathway, has an absolute requirement for reduced flavin mononucleotide. Bifunctional chorismate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* (an *ARO2* gene protein product) is able to reduce flavin by the NADPH oxidation in contrast to the *Escherichia coli* monofunctional chorismate synthase (an *aroC* gene protein product) which depends on the cellular flavin reductase activity. To compare functional activities of two types of chorismate synthases, the structural part of the *ARO2* gene with amino acid codons optimized for the expression in *E. coli* was chemically synthesized. After verification of the *ARO2* expression in T7 system, isogenic strains of *E. coli* TG1Δ*aroC*P<sub>tac</sub>-*ARO2* and TG1Δ*aroC*P<sub>tac</sub>-*aroC* were obtained. The comparative analysis of proteins from cell extracts as well as *in silico* calculations of hybrid RBS efficacy showed that the gene for the AroC protein was expressed better in TG1Δ*aroC*P<sub>tac</sub>-*aroC* than *ARO2* in TG1Δ*aroC*P<sub>tac</sub>-*ARO2* cells. The introduction of the P<sub>tac</sub>-*ARO2* and P<sub>tac</sub>-*aroC* modifications fully restored the growth of the TG1Δ*aroC* aromatic auxotroph in minimal M9 medium and the phenylalanine production in the producer with inactive chorismate synthase, DV1017Δ*aroC*. The similar positive effect of P<sub>tac</sub>-*ARO2* and P<sub>tac</sub>-*aroC* on the phenylalanine production of the DV1017Δ*tyrR* strain where chorismate synthase was a bottleneck allowed concluding about the lack of limitation by reduced flavin under the overexpression of monofunctional chorismate synthase in *E. coli*.

**Key words:** chorismate synthase, *Escherichia coli*, phenylalanine producer, reduced flavin mononucleotide.

**Acknowledgements** – The authors thank S.M. Kazakova and Yu.V. Kulagina (CJSC AGRI) for conducting of S-Jar fermentations and A.D. Kivero (CJSC AGRI) for quantitative analysis by HPLC of amino acids in the culture broth. The authors are extremely grateful to S.V. Mashko (CJSC AGRI) for the valuable comments while reading the manuscript.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2017-33-2-48-55