Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.66

Адаптивная эволюция *Escherichia coli* K-12 MG1655 при росте на этаноле и глицерине

© 2017 г. Н.С. ЕРЕМИНА*, Е.А. СЛИВИНСКАЯ, Т.А. ЯМПОЛЬСКАЯ, К.В. РЫБАК, И.Б. АЛЬТМАН, Л.Р. ПТИЦЫН, Н.В. СТОЙНОВА

Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика», Москва, 117545

e-mail: Natalya_Eremina@agri.ru*

Поступила в редакцию 26.10.2016 г.
Принята в печать 14.03.2017 г.

Методом лабораторной адаптивной эволюции штамма *E. coli* K-12 MG1655 и его производного YA1461 были получены мутанты с улучшенной способностью к утилизации этанола (FEt) и глицерина (FGl) в аэробных условиях. По сравнению с родительским «фитнесс-штаммы» характеризуются более короткой лаг-фазой и ускоренным ростом на средах с различными источниками углерода, такими как глюкоза, ксилоза и их смеси. Анализ последовательности хромосомной ДНК, выделенной из клеток этих фитнесс-штаммов, а также перекрестный трансдукционный анализ показали, что одной из основных причин изменения скорости роста у рифампицин-устойчивых мутантов FGl и YA1461 RifRII являются мутации в гене *rpoB*, кодирующем β-субъединицу РНК-полимеразы, которые затрагивают консервативный аминокислотный остаток и приводят к заменам в белковой последовательности – $RpoB^{D483G}$ и $RpoB^{H526N}$, соответственно.

Ключевые слова: адаптация, адаптивная эволюция, глицерин, метаболическая инженерия, этанол, *Escherichia coli.*

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-10-19

Микроорганизмы известны своей способностью быстро адаптироваться к изменяющимся внешним условиям. Протекающие в клетках физиологические процессы позволяют им активно реагировать на незначительные изменения условий окружающей среды, не затрагивая при этом генетический аппарат. Однако глобальные изменения условий существования, создающие опасность для выживания, инициируют адаптационный ответ, приводящий к возникновению мутаций в десятках генов и, как следствие, к изменению целого ряда метаболических процессов внутри клетки, что позволяет ей выжить в неблагоприятных условиях. Понимание генетических основ адаптации является одной из важных задач биологии; в связи с этим, эволюция способности бактерий к усвоению различных субстратов, используемых в качестве источников углерода и энергии, оказывается подходящей моделью для изучения подобных процессов.

Одним из основных методов исследования систем адаптации является эволюционная инженерия, или, как ее еще называют, лабораторная адаптивная эволюция (ЛАЭ), основанная на способности микроорганизмов быстро приспосабливаться к новым условиям внешней среды. Этот метод достаточно часто применяется для исследования молекулярных основ и динамики эволюции бактериальных культур, а также для направленного изменения метаболизма микроорганизмов [1–4]. В отличие от естественной эволюции, такой подход предполагает выделение основного фактора селекции, например, такого как, конверсия углеродного субстрата в целевой продукт, скорость

Список сокращений: ЛАЭ – лабораторная адаптивная эволюция; ОП – оптическая плотность; ПЦР – полимеразная цепная реакция; среда LB – среда Луриа–Бертани; Rif – рифампицин; $T_{1/2}$ – время удвоения числа клеток продуцента.

роста на различных субстратах [5], устойчивость к какому-либо негативному фактору окружающей среды, соотношение выхода целевого и побочного продуктов и т.д. Комбинация направленных изменений того или иного метаболического пути и ЛАЭ зачастую приводит к получению практически значимых результатов [5–8].

В настоящее время *E. coli* – один из главных объектов биотехнологии, и интерес представляет расширение спектра потребляемых этим микроорганизмом субстратов, среди которых следует особо выделить этанол и глицерин. Доступность этанола связана с расширением его производства как биотоплива; глицерин является побочным продуктом крупномасштабного производства биодизельного топлива на основе жирных кислот растительного происхождения. Надо заметить, что клетки *E. coli* дикого типа способны усваивать глицерин, но со скоростью, значительно меньшей скорости потребления традиционного субстрата – глюкозы. Что касается этанола, его биотехнологическое использование ограничивается из-за ингибирования кислородом алкогольдегидрогеназы (AdhE) – ключевого фермента пути утилизации спирта, что препятствует потреблению *E. coli* этого субстрата аэробно. Помимо названных выше источников углерода большое значение для биотехнологии имеют пентозы, в частности ксилоза и арабиноза, широко представленные в лигноцеллюлозных гидролизатах.

В настоящей работе мы попытались использовать метод ЛАЭ для получения штаммов *E. coli*, способных к эффективной утилизации глицерина и этанола в аэробных условиях.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы, плазмиды и ростовые среды

Эксперименты проводили со штаммами *E. coli* K-12 MG1655 и его производным YA1461, гены *adhE* и *rpoB* которых содержат несколько мутаций, приводящих к синтезу устойчивой к кислороду алкогольдегидрогеназы [9] (табл. 1).

Таблица 1

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в данной работе

Bacterial strains and plasmids used in this work

Штамм, плазмида *E. coli* K-12	Генотип, характеристика	Источник
MG1655	F^- λ^- *ilvG rfb*-50 *rph*-1	CGSC 6300
YA1461	MG1655 P_{Ltac}-*adhE*$^{E568K/ I554S/E22G/ M236V/A786V/Y461C}$	[9]
FGl	Штамм, полученный на основе MG1655, адаптирован к росту на глицерине	Данная работа
FGl-Eth	FGl *cat*-P_{Ltac}-*adhE*$^{E568K/ I554S/E22G/ M236V/A786V/Y461C}$	То же
FEt	Штамм, полученный на основе YA1461, адаптирован к росту на этаноле	» »
MG1655 Δ*sroH*	MG1655 Δ*sroH::cat rpoB*^{wt}	» »
MG1655 Δ*sroH rpoB*^{D483G}	MG1655 Δ*sroH::cat rpoB*^{D483G}	» »
FGl Δ*sroH rpoB*^{D483G}	FGl Δ*sroH::cat rpoB*^{D483G}	» »
YA1461 RifRII	YA1461 *rpoB*^{H526N}	» »
YA1461 RifRII Δ*sroH (Rif*^{R}*)*	YA1461 *rpoB*^{H526N} Δ*sroH::cat*	» »
YA1461 RifRII Δ*sroH (Rif*^{S}*)*	YA1461 *rpoB*^{wt} Δ*sroH::cat*	» »
pKD46	*exo, bet, gam* фага λ; Ap^R	[10]
pMW118-(λ*attL*-CmR-λ*attR*)	Содержит кассету λ*attL*-Cm^R- λ*attR*; Ap^R; Cm^R	[11]

В качестве полноценной питательной среды использовали LB («ДиаМ»), минимальной – M9 (Sigma-Aldrich, США) [12]. Для получения твердых сред в жидкие добавляли бактоагар (Difco, США) в концентрации 1,5%. При выращивании бактерий в минимальную жидкую среду вносили сахара (D-глюкозу, D-ксилозу) до концентрации 0,2%, этанол – до 1% или глицерин – до 0,2%. В минимальную агаризованную среду те же источники углерода добавляли в удвоенной концентрации.

Трансформация, трансдукция и получение генетических модификаций в хромосоме *E. coli*

Трансформацию штаммов *E. coli*, получение лизатов фага P1*vir* и трансдукцию проводили согласно общепринятым экспериментальным протоколам [12, 13].

Инактивацию генов в хромосоме *E. coli* осуществляли с использованием Red-системы фага λ по методу, описанному в работе [10], с помощью хелперной плазмиды pKD46 и плазмиды pMW118-(λ*attL*-CmR-λ*attR*) в качестве донора «вырезаемого» маркера антибиотикоустойчивости [11].

Методы работы с ДНК

Выделение ДНК проводили с помощью наборов Qiagen Miniprep Kit и Qiagen DNA Purification Kit, согласно инструкциям производителя (Qiagen, Германия). Электрофорез ДНК в агарозном геле осуществляли по стандартным методикам [14]. Стандартный метод ПЦР воспроизводили с помощью амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США). Химический синтез олигонуклеотидных праймеров для ПЦР осуществляла фирма «Синтол» (Россия). Нуклеотидный состав праймеров приведен в табл. 2.

Отбор рифампицин-устойчивых мутантов, характеризующихся ускоренным ростом на среде с этанолом

Для получения спонтанных рифампицин-устойчивых мутантов ночную культуру клеток YA1461 разводили свежей средой LB до $ОП_{550}$~0,05 (оптическую плотность в пробах определяли на спектрофотометре Shimadzu UV1800 (Япония) при длине волны 550 нм) и растили до $ОП_{550}$~1. Затем клетки высевали на агаризованную среду LB с добавлением рифампицина (200 мкг/мл) (Serva, Германия). Устойчивые к антибиотику клоны смешивали, культуру разводили до $ОП_{550}$~0,05 минимальной средой с добавлением рифампицина (200 мкг/мл) и этанола (2%) (Кировский биохимический завод, Россия) в качестве источника углерода. Для обогащения рифампицин-устойчивыми клетками, способными эффективно утилизировать этанол, культуру растили до логарифмической фазы, затем пересевали в свежую среду того же состава, а затем дважды в минимальную среду без антибиотика. Полученную культуру разводили до получения отдельных колоний на чашках с минимальной средой, содержащей 2% этанола. Выросшие клоны проверяли на устойчивость к рифампицину и рост на этаноле.

Оценка скорости роста штаммов *E. coli*

Ночные культуры штаммов, выращенные в пробирках с богатой средой, два раза промывали 0,9%-ным раствором NaCl («ДиаМ»), разводили свежей минимальной средой до $ОП_{550}$~0,05–0,2 и растили при температуре 37°C со скоростью перемешивания 200 об/мин. В ряде случаев культивирование и анализ оптической плотности проводили не на указанном выше спектрофотометре, а с помощью биофоторекодера TVS062CA Compact

Таблица 2

Праймеры, используемые для делеции гена *sroH* и проверки полученной мутации

Primers used to delete *sroH* gene and to verify the obtained mutation

Праймер	Последовательность (5'→3')
sroH-attR	gag-aaa-taa-gca-gct-tcc-tca-gcc-ctc-aaa-ata-acc-gct-caa-gtt-agt-ata-aaa-aag-ct
sroH-attL	att-gta-aga-gag-taa-ata-ctc-aac-tat-gat-aga-gac-tga-agc-ctg-ctt-ttt-tat-act-aag
sroH-1	tgc-cgt-gat-tga-ggt-gga-c
sroH-2	agc-ttc-ttc-ctc-gtt-tcg

rocking incubator (Advantec®, Япония), позволяющего анализировать рост микроорганизмов в автоматическом режиме (скорость перемешивания 70 об/мин) при длине волны 660 нм. Удельную скорость роста μ и время удвоения $T_{1/2}$, связанное с удельной скоростью роста уравнением $T_{1/2}=\ln 2/\mu$, определяли после построения кривых роста бактериальных клеток путем аппроксимации логарифмической части кривой уравнением $ОП = ОП_0 Exp^{(\mu T)}$ (где $ОП_0$ – оптическая плотность пробы в момент инокуляции), проводимой стандартными средствами Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение штаммов, характеризующихся ускоренным ростом на этаноле и глицерине

Для селекции клеток, эффективно утилизирующих этанол, в качестве исходного использовали штамм YA1461, ген *adhE* которого содержит мутации, приводящие к синтезу устойчивой к кислороду алкогольдегидрогеназы (см. табл. 1). Культуру, росшую в пробирках, поддерживали в стадии экспоненциального роста ежедневным пересевом на свежую минимальную среду с этанолом (2%). Каждые 100 ч культивирования клетки высевали на агаризованную среду с этанолом для получения индивидуальных клонов и последующей оценки скорости их роста. Через 700 ч культивирования, когда удельная скорость роста клеток перестала изменяться, из полученной культуры

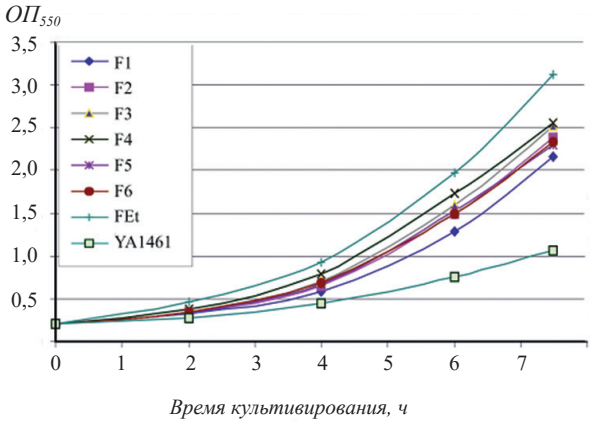

Рис. 1 Рост индивидуальных фитнесс-клонов (F1-F6, FEt), производных штамма YA1461, после 700 ч ЛАЭ на минимальной среде с этанолом в качестве единственного источника углерода. Культивирование проводили в пробирках при 200 об/мин и начальной оптической плотности $ОП_{550}$ = 0,2

Fig. 1. Growth of individual fitness clones (F1–F6, FEt) derived from YA1461 strain after 700-h culturing on minimal medium with ethanol as a sole carbon source. The growth was performed in tubes at 200 rpm and starting OD_{550} = 0,2

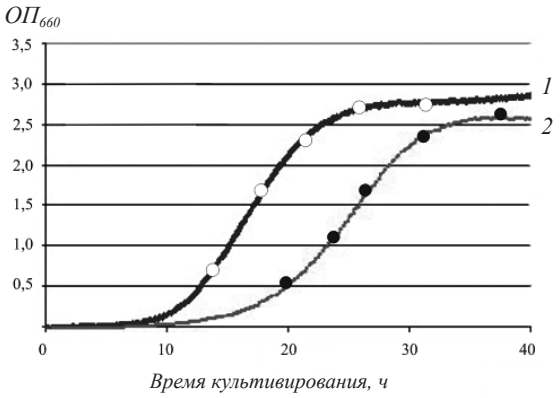

Рис. 2. Рост штаммов FEt (*1*) и YA1461 (*2*) на минимальной среде с этанолом в качестве единственного источника углерода. Культивирование и анализ оптической плотности проводили с помощью биофоторекодера TVS062CA при 70 об/мин; начальная $ОП_{660}$ составляла 0,05

Fig. 2. Growth of FEt (*1*) and YA1461 (*2*) strains on minimal medium with ethanol as a sole carbon source. Culturing and analysis of OD were performed using a TVS062CA biophotorecorder at 70 rpm with starting OD_{660} = 0,05

были выделены семь независимых клонов. Как следует из рис. 1, все отобранные клоны существенно превосходили исходный штамм по скорости роста на минимальной среде с этанолом в качестве единственного источника углерода. Таким образом, в результате генотипической адаптации, или «фитнесса» (fitness), как принято называть этот процесс в англоязычной литературе, были получены штаммы, характеризующиеся ускоренным ростом на этаноле – фитнесс-штаммы.

Для дальнейшего исследования был выбран один из фитнесс-клонов, названый FEt (см. рис.1), скорость роста которого в экспоненциальной фазе в 1,4 раза превышала скорость роста родительского штамма YA1461 (рис. 2, табл. 3).

Таблица 3

Рост родительских и фитнесс-штаммов на средах с различными источниками углерода

Growth of parental and fitness strains on various carbon sources

Штамм	$T_{1/2}$, ч		
	Глюкоза	Этанол	Глицерин
YA1461	1,1 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2
FEt	0,8 ± 0,3	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1
MG1655	1,1 ± 0,1	Не определяли	1,5 ± 0,2
FGl	1,0 ± 0,1	Не определяли	1,1 ± 0,1
FGl-Eth	1,0 ± 0,1	*2,8* ± 0,1	1,6 ± 0,1

Аналогичный подход был использован нами для получения штамма *E. coli*, способного к более быстрой по сравнению с диким типом утилизации глицерина. Клетки MG1655 растили в жидкой минимальной среде, содержащей 0,5% глицерина в качестве единственного источника углерода. Культуру поддерживали в стадии экспоненциального роста путем ежедневного пересева на свежую среду. Каждые 100 ч производили посев на агаризованную среду для оценки скорости роста независимых клонов. После 850 ч культивирования был получен штамм, названный FGl, который рос на среде с глицерином со скоростью, в 1,4 раза превышающей скорость роста штамма дикого типа в экспоненциальной фазе (рис. 3, см. табл. 3).

Поскольку штамм FGl с геном *adhE* дикого типа не способен к аэробному росту на среде с этанолом, для культивирования на данном субстрате использовали штамм FGl-Eth (см. табл. 1), в хромосоме которого нативный ген *adhE* был замещен мутантным, кодирующим устойчивую к кислороду алкогольдегидрогеназу.

Таким образом, генотипическая адаптация к утилизации этанола привела к существенному ускорению роста штамма FEt на среде с этим источником углерода; еще более продуктивным оказался этот подход в отношении селекции глицерин-утилизирующего штамма FGl: скорость его роста на глицерине оказалась равна скорости роста штамма дикого типа на наиболее предпочтительном источнике углерода, глюкозе.

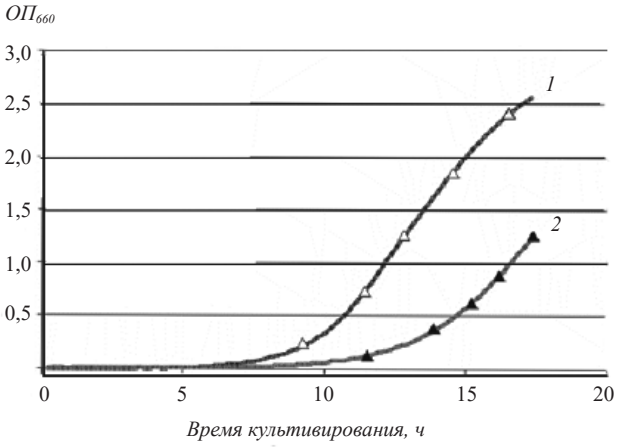

Рис. 3. Рост штаммов FGl (*1*) и MG1655 (*2*) на минимальной среде с глицерином в качестве единственного источника углерода. Культивирование и анализ оптической плотности проводили с помощью биофоторекодера TVS062CA при 70 об/мин; начальная оптическая плотность $ОП_{660}$ составляла 0,05

Fig. 3. Growth of FGl (*1*) and MG1655 (*2*) strains on minimal medium with glycerol as a sole carbon source. Culturing and analysis of OD were performed using a TVS062CA biophotorecorder at 70 rpm with starting OD_{660} = 0,05

Анализ роста фитнесс-штаммов на различных источниках углерода

Было высказано предположение о том, что в процессе адаптивной эволюции штаммов оказались затронуты их глобальные системы регуляции, участвующие, например, в катаболитной репрессии и влияющие на утилизацию сахаров в целом. В связи с этим предположением мы проверили рост фитнесс-штаммов на средах, содержащих различные источники углерода.

Как и ожидалось, при использовании ряда сахаров – глюкозы и ксилозы либо их смеси – оба фитнесс-штамма имели более высокую скорость роста и более короткую лаг-фазу по сравнению с родительскими штаммами (рис. 4 и 5). Однако стоит отметить, что рост FEt и FGl на смеси ксилозы и глюкозы по-прежнему характеризовался диауксией (см. рис.4, *d* и рис. 5, *1*). При этом скорость роста клеток штамма FEt на смеси ксилозы и глюкозы оказалась выше, чем у родительского штамма, не только на этаноле, но и на глицерине (см. рис. 2 и 4).

Идентификация мутаций, полученных в ходе адаптивной эволюции к росту на глицерине

Полученные данные подтверждают предположение, что в случае обоих фитнесс-фенотипов возникшие изменения генома *E. coli* связаны с мутацией (мутациями) в гене одного или нескольких глобальных регуляторов и не только касаются путей усвоения этанола или глицерина, но имеют более общий характер, затрагивая по всей видимости, механизмы регуляции клеточного метаболизма в целом; об этом свидетельствует увеличение скорости роста штаммов на источниках углерода, отличных от тех, к которым проводилась адаптация.

Приведенные выше результаты полностью согласуются с данными ряда авторов, описывающих преимущественное возникновение в процессе адаптивной эволюции мутаций в генах глобальных регуляторных систем, в частности, *rpoBC* [7, 15]. Например, показано, что селекция клеток, способных к быстрой утилизации глицерина, приводит к возникновению мутаций в β и β'-субъединицах РНК-полимеразы [7]. С высокой вероятностью и в нашем случае произошедшие изменения могли затронуть именно этот фермент.

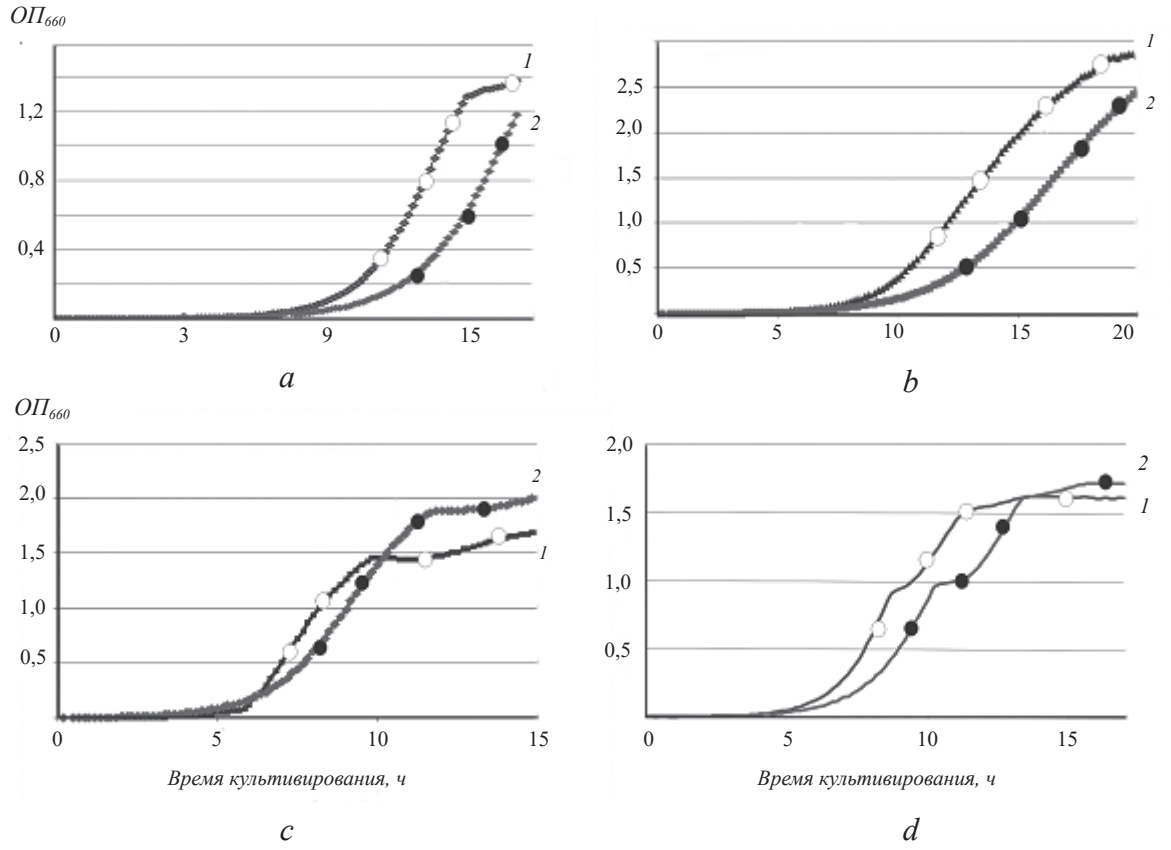

Рис. 4. Рост фитнесс-штамма FEt (*1*) и родительского YA1461 (*2*) на средах с ксилозой (*a*), глицерином (*b*), глюкозой (*c*), смесью ксилозы и глюкозы (*d*). Культивирование и анализ оптической плотности проводили с помощью биофоторекодера TVS062CA при 70 об/мин; начальная оптическая плотность $ОП_{660}$ составляла 0,05 (то же для рис.5)

Fig. 4. Growth of fitness FEt strain (*1*) and parental YA1461 strain (*2*) on media with xylose (*a*), glycerol (*b*), glucose (*c*) and xylose + glucose mixture (*d*). Culturing and OD analysis were performed using a TVS062CA biophotorecorder at 70 rpm with starting OD_{660} = 0,05

Действительно, определение нуклеотидной последовательности генов *rpoBC*, кодирующих соответствующие субъединицы, у двух полученных нами фитнесс-штаммов (FEt и FGl) выявило наличие ранее не описанной замены D483G в гене *rpoB* штамма FGl. Отдельно подчеркнем, что область *rpoBC* штамма FEt мутаций не несла.

Чтобы проверить, обусловлено ли ускорение роста фитнесс-культуры мутацией в *rpoBC* опероне, в штамм FGl путем P1-трансдукции был перенесен оперон дикого типа. В качестве донорного использовали штамм MG1655, в котором соседний с *rpoBC* ген *sroH* был маркирован устойчивостью к хлорамфениколу.

Было показано, что сама по себе инактивация гена *sroH* не влияла на рост штамма дикого типа на глицерине (рис. 6, кривая MG1655Δ*sroHrpoB*^{wt}). Замена же мутантного оперона *rpoBC* нативным приводила к исчезновению фитнесс-фенотипа клеток FGl (см. рис. 6). При этом скорость роста штамма FGl Δ*sroH rpoB*^{wt} превышала скорость роста штамма дикого типа, т.е. улучшение роста FGl, по-видимому, является результатом действия нескольких мутаций, лишь одна из которых локализована в опероне *rpoBC*. Для проверки этого предположения в геноме штамма дикого типа нативная область *rpoBC* была заменена мутантной *rpoB*^{D483G}. Скорость роста полученного штамма на среде с глицерином оказалась выше скорости роста исходного MG1655, что говорит о том, что замена *rpoB*^{D483G} действительно является одной из мутаций, ответственных за улучшение роста клеток на глицерине (см. рис. 6). Согласно данным полногеномного сиквенса фитнесс-штаммов FEt и FGl, их хромосомы в окрестностях двух минут карты оперона *rpoBC* не содержали замен в сравнении с хромосомой штамма MG1655, поэтому возможность изменений генотипа, отличных от изменения аллеля *rpoB* при описанных выше трансдукционных скрещиваниях можно исключить.

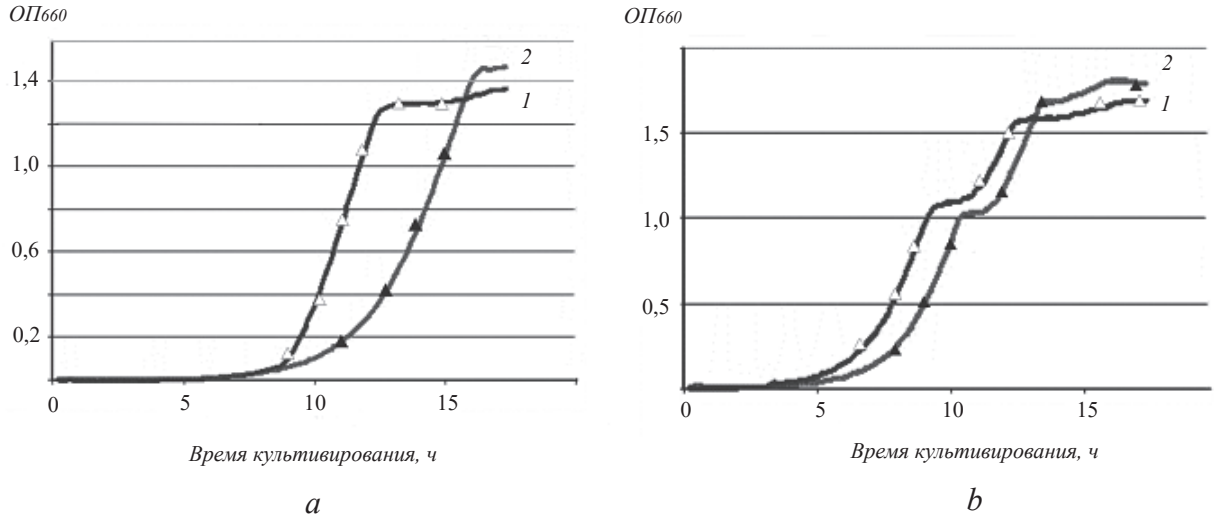

Рис. 5. Рост фитнесс-штамма FGl (*1*) и родительского MG1655 (*2*) на средах с ксилозой (*a*) и смесью ксилозы и глюкозы (*b*)

Fig. 5. Growth of fitness FGl strain (*1*) and parental MG1655 strain (*2*) on media with xylose (*a*), and glucose + xylose mixture (*b*). Culturing and OD_{660} analysis were performed using TVS062CA biophotorecorder at 70 rpm with starting OD_{660} = 0,05

Получение рифампицин-устойчивых мутантов *E. coli* с ускоренным ростом на этаноле

Как оказалось, замена $rpoB^{D483G}$ не оказывает влияния на рост *E. coli* на этаноле (данные не приведены). Однако нельзя исключить, что другая мутация в этом гене не приведет к похожему эффекту. В связи с этим представлялось интересным получение мутантов в гене *rpoB*, способных к более эффективной утилизации именно этого субстрата.

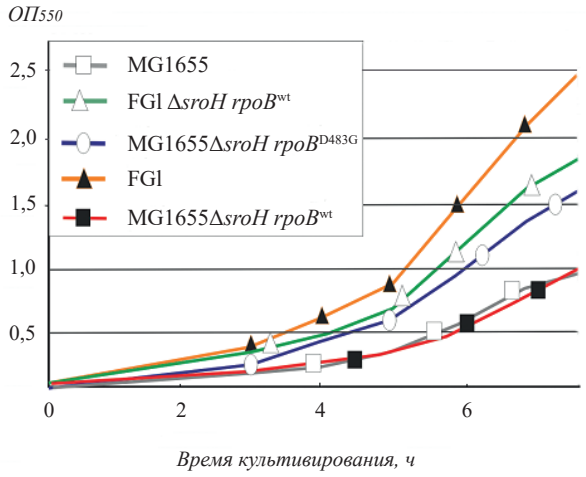

Рис. 6. Влияние мутации $rpoB^{D483G}$ на рост различных штаммов *E. coli* на среде с глицерином. Культивирование проводили в пробирках при 200 об/мин; начальная оптическая плотность ($ОП_{550}$) составляла 0,1

Fig. 6. Effect of $rpoB^{D483G}$ mutation on growth of various *E. coli* strains on glycerol-containing medium. Culturing was performed in tubes at 200 rpm; starting OD_{550} was 0,1

В генах, кодирующих β и β'-субъединицы РНК-полимеразы, известен ряд мутаций, улучшающих рост *E. coli* на различных источниках углерода. Их можно условно разделить на две группы: 1) мутации, полученные в результате ЛАЭ [7, 15, 16] и расположенные в различных частях белка, и 2) мутации, приводящие к устойчивости к антибиотику рифампицину и локализующиеся в строго ограниченной области. Рифампицин, связываясь с РНК-полимеразой, специфически блокирует инициацию транскрипции и не влияет на элонгацию [17]. У бактерий мутации, приводящие к устойчивости к рифампицину, локализуются в небольшом высококонсервативном участке β-субъединицы, так называемом «рифампициновом кармане» [18]. Показано, что мутации, вызывающие устойчивость к рифампицину у *E. coli*, могут иметь различные фенотипические проявления, включающие изменение скорости роста, а также изменение устойчивости бактерий к фаговой инфекции [15], [19]. У других бактерий также известны примеры мутаций в гене *rpoB*, обладающих плейотропным действием; так, в частности, у *Bacillus subtilis* мутации в гене *rpoB* изменяют скорость роста и способность к споруляции и прорастанию спор [20].

В связи с этим мы использовали рифампицин для получения в гене *rpoB* мутаций, приводящих к улучшению роста *E. coli* на этаноле.

Рифампицин-устойчивые клетки были селекционированы на основе штамма YA1461. После получения спонтанных рифампицин-устойчивых мутантов и обогащения культуры клетками, быстро растущими на среде с этанолом, был отобран клон, названный YA1461 RifRII, который характеризовался наиболее высоким ростом на этом субстрате по сравнению с родительским штаммом (рис. 7, *a*).

Чтобы проверить, связано ли улучшение роста с мутациями в опероне *rpoBC*, этот оперон в штамме YA1461 RifRII был заменен опероном дикого типа с помощью P1-трансдукции. При этом в качестве донорного использовали штамм MG1655 Δ*sroH*, в котором соседний с *rpoBC* опероном ген *sroH* был маркирован устойчивостью к хлорамфениколу. Часть трансдуктантов оказалась чувствительна к рифампицину; последующий анализ скорости их роста на этаноле показал исчезновение фитнесс-фенотипа (рис. 7, *a,* штамм YA1461RifRIIΔ*sroHrpoB*^{wt}). В то же время клоны, сохранившие устойчивость к рифампицину, сохраняли и повышенную скорость роста на среде с этанолом. Таким образом, как и ожидалось, мутация, обеспечивающая рифампицин-устойчивость, связана с ускоренным ростом клеток на этаноле.

Секвенирование гена *rpoB* выявило в ДНК мутанта YA1461 RifRII замену c1576a, приводящую к замене H526N в белковой последовательности.

Данная мутация располагается в так называемой «горячей точке» рифампицин-устойчивости и не была ранее описана для *E. coli*. Важно отметить, что мутация *rpoB*^{H526N} улучшает рост *E. coli* на среде не только с этанолом, но и с другими источниками углерода, в частности, с глицерином (рис. 7, *b*, штамм YA1461 RifRII, или YA1461 *rpoB*^{H526N}, как он был назван после сиквенса).

Сравнение последовательности белка RpoB из *E. coli* с его бактериальными ортологами с достаточно высоким уровнем гомологии показывает, что полученная нами мутация *rpoB*^{H526N} затрагивает консервативный аминокислотный остаток. Позиция H526 в RpoB из *E. coli* соответствует позиции остатка H482 в его гомологе из *B. subtilis*, мутации в котором довольно подробно охарактеризованы [21]. У *B. subtilis* замены H482D и H482P приводят к улучшению утилизации клетками таких субстратов, как салицин и трегалоза, одновременно снижая усвоение ксилозы, пирувата, инозина и уридина. Мутации H482P, H482R и H482Y увеличивают эффективность утилизации декстрина и снижают утилизацию арабинозы. При этом мутанты H482R и H482Y характеризуются также дефектами споруляции. Таким образом, в RpoB из *B. subtilis* описанные мутации в позиции H482 приводят к сходному с наблюдаемым нами эффекту, несмотря на различие в химических свойствах аминокислот, заменяющих гистидиновый остаток.

Что касается молекулярных основ фенотипических проявлений мутаций в RpoB, то стоит

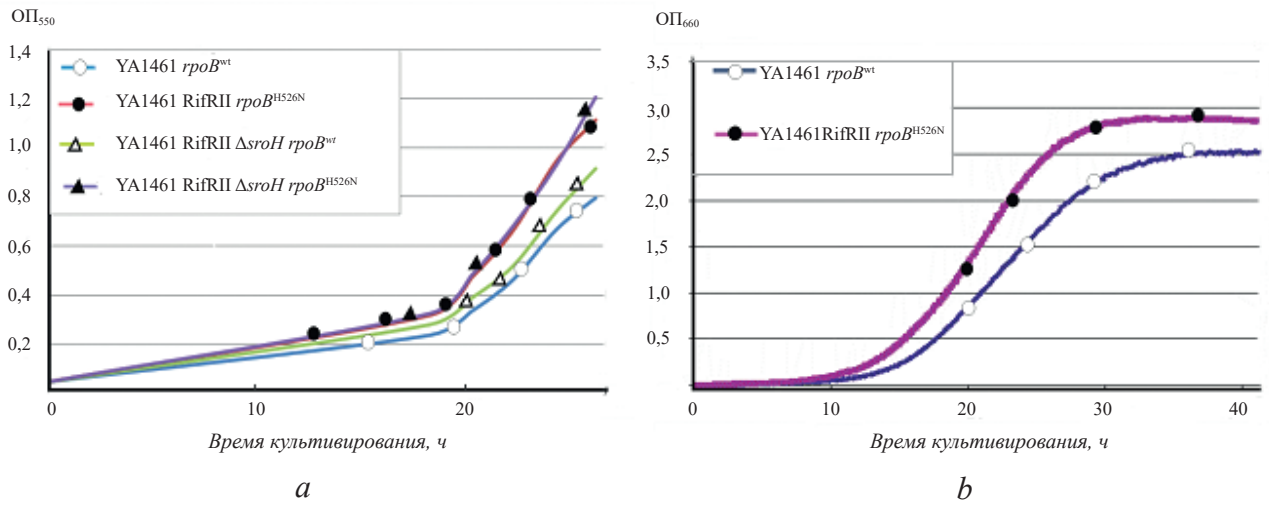

Рис. 7 Влияние мутации *rpoB*^{H526N} на рост клеток *E. coli* при использовании этанола (*a*) и глицерина (*b*) в качестве источника углерода. Культивирование осуществляли в пробирках при 200 об/мин (*a*); культивирование и анализ оптической плотности проводили с помощью биофоторекодера TVS062CA при 70 об/мин (*b*). Начальная оптическая плотность каждой из культур ($ОП_{550}$ и $ОП_{660}$) составляла 0,05

Fig. 7. Effect of *rpoB*^{H526N} mutation on *E. coli* cell growth using ethanol (*a*) or glycerol (*b*) as a carbon source. Cells were cultured in tubes at 2000 rpm (*a*); or culturing and OD analysis were performed using biophotorecorder TVS062CA at 70 rpm (*b*). Starting OD_{550} and OD_{660} were equal to 0,05

учесть, в частности, что мутации в «рифампициновом кармане» β-субъединицы могут изменять структуру РНК-полимеразы и, следовательно, ее регуляторные взаимодействия с различными промоторами [21]. Известно, например, что некоторые мутации устойчивости к рифамипицину приводят к дестабилизации инициирующего комплекса РНК-полимеразы с промоторами генов, находящихся под контролем строгого ответа; то же происходит с РНК-полимеразой дикого типа при увеличении концентрации ppGpp [22].

Тем самым, подход, связанный с получением спектра мутаций в гене *rpoB*, обеспечивающих рифампицин-устойчивость, с последующим обогащением культуры клонами, характеризующимися более быстрым ростом на целевом источнике углерода, может быть интересным с практической точки зрения. В ряде случаев он может служить дополнением к ЛАЭ, результатом которой зачастую является получение широкого спектра мутантов по различным генам, анализ которых довольно сложен.

Таким образом, описанные в настоящей работе методы позволяют селекционировать клетки, способные к более эффективной утилизации целого ряда различных источников сырья. Полученные штаммы могут рассматриваться в качестве исходных для дальнейшего конструирования промышленно значимых продуцентов биологически активных веществ.

Принципиально важно, что эволюционная инженерия является лишь одним из этапов системной работы по созданию штаммов *E. coli*, способных к утилизации широкого круга субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rosenzweig R.F., Sharp R.R., Treves D.S., Adams J. Microbial evolution in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics*, 1994, 137(4), 903–917.
2. Helling R.B., Vargas C.N., Adams J. Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment. *Genetics*, 1987, 116(3), 349–358.
3. Horinouchi T., Tamaoka K., Furusawa C., et al. Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress.BMC *Genomics*, 2010, 9(11), 579. doi: 10.1186/1471-2164-11-579.
4. Conrad T.M., Lewis N.E., and Palsson B. Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Mol. Syst. Biol.*, 2011, 5(7), 509. doi: 10.1038/msb.2011.42
5. Weikert C., Sauer U., and Bailey J.E. Use of a glycerol-limited, long-term hemostat for isolation of *Escherichia coli* mutants with improved physiological properties. *Microbiology*., 1997,143(5), 1567–1574. doi: 10.1099/00221287-143-5-1567
6. Balderas-Hernández V.E., Hernández-Montalvo V., Bolívar F., et al. Adaptive evolution of *Escherichia coli* inactivated in the phosphotransferase system operon improves co-utilization of xylose and glucose under anaerobic conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2011, 163(4), 485–496. doi: 10.1007/s12010-010-9056-3
7. Herring C.D., Raghunathan A., Honisch C., et al. Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. *Nat. Genet.*, 2006, 38, 1406–1412. doi: 10.1038/ng1906
8. Meynial-Salles I., Forchhammer N., Croux C., et al. Evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Metab. Eng*., 2007, 9(2), 152–159. doi: 10.1016/j.ymben.2006.09.002
9. Ptitsyn L.R., Altman I.B., Kotliarova V.A., et al. A method for producing an L-amino acid using a bacterium of the Enterobacteriaceae family Patent WO2008010565, 2007
10. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
11. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В и др. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме. *Мол. биология*, 2005, 39, 823–831.
12. Sambrook J., Russell, and D.W. Molecular Cloning: Laboratory Mannual, 3rd edn. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
13. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир. 1976, 436.
14. Маниатис Т., Фрич Э., and Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984, 480.
15. Conrad T.M., Joyce A.R., Applebee M.K., et al. Whole-genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution inlactate minimal media reveals flexible selection of adaptive mutations. *Gen. Biol.,* 2009, 10(10), R118. doi: 10.1186/gb-2009-10-10-r118
16. Conrad T.M., Frazier M., Joyce A.R., et al. RNA polymerase mutants found through adaptive evolution reprogram *Escherichia coli* for optimal growth in minimal media. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2010, 107(47), 20500–20505. doi: 10.1073/pnas.0911253107
17. Wehrli W., Knusel F., Schmid K., et al. Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 61, 667–673.
18. Jin D.J, Gross C.A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.,* 1988, 202(1), 45–58. doi: 10.1016/0022-2836(88)90517-7

19. Jin D.J., Gross C.A. Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant rpoB mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.,* 1989, 171(9), 5229–5231. doi: 10.1128/jb.171.9.5229-5231.1989

20. Maughan H., Galeano B., and Nicholson W. L. Novel rpoB mutations conferring rifampin resistance on Bacillus subtilis: global effects on growth, competence, sporulation, and germination. *J. Bacteriol.* 2004, 186(8), 2481–2486. doi: 10.1128/JB.186.8.2481-2486.2004

21. Perkins A.E., Nicholson W.L. Uncovering new metabolic capabilities of *Bacillus subtilis* using phenotype profiling of rifampin-resistant rpoB mutants. *J. Bacteriol.,* 2008, 190(3), 807–814. doi: 10.1128/JB.00901-07

22. Zhou Y.N., Jin D.J. The rpoB mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like "stringent" RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(6), 2908–2913.

Adaptive Evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 during Growth on Ethanol and Glycerol

N.S. EREMINA*, E.A. SLIVINSKAYA, T.A. YAMPOLSKAYA, K.V. RYBAK, I.B. ALTMAN, L.R PTITSYN and N.V. STOYNOVA

Research Institute «Ajinomoto-Genetika», 117545, Moscow Russia

e-mail: Natalya_Eremina@agri.ru*

Received October 26, 2016
Accepted March 14, 2017

Abstract–Derivatives of the *E. coli* K-12 MG1655 and YA1461 strains with the improved ethanol (FEt) and glycerol (FGl) utilization under aerobic conditions have been obtained using the method of laboratory adaptive evolution. Those *fitness* strains have a shorter lag-phase and higher growth rate on glucose, xylose, and their mixture in comparison with the parental strain. The sequencing of the chromosomal DNA isolated from the strans' cells and also cross-transduction analysis confirmed that the mutations in the *rpoB* genes encoding the β-subunit of RNA polymerase in the FGl and YA1461 RifRII rifampicin-resistant strains was the main reason for improving their growth rates. These mutations affect the conservative aminoacid segments and provide the amino acid substitutes of $RpoB^{D483G}$ and $RpoB^{H526N}$, respectively.

Key words: adaptation, adaptive evolution, *Escherichia coli,* ethanol, glycerol, metabolic engineering.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-10-19