

## Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577:218

### Сбалансированная амплификация генов мевалонатного пути повысила продукцию изопрена рекомбинантным штаммом *Pantoea ananatis*

© 2019 Ж.И. КАТАШКИНА<sup>1</sup>, Е.Д. КАЗИЕВА<sup>1,\*</sup>, Е. ТАДЖИМА<sup>2</sup>, С.В. МАШКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЗАО Научно-Исследовательский институт Аджиното-Генетика, Москва, 117545

<sup>2</sup>Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki-ku, Kawasaki, 210-8681, Japan

\*e-mail: ekaterina\_kazieva@agri.ru

Поступила в редакцию 11.12.2018 г.

После доработки 08.02.2019 г.

Принята к публикации 15.03.2019 г.

Плохо скоординированная экспрессия генов целевого биосинтетического пути в штамме-продуценте зачастую приводит к накоплению токсичных промежуточных продуктов и, как следствие, к плохому росту культуры и снижению продукции. Достигнуто увеличение продукции изопрена штаммом *Pantoea ananatis*, несущим гены гетерологичного мевалонатного пути, с помощью одновременной  $\phi 80$ -Int-зависимой интеграции смеси условно реплицирующихся плазмид, несущих гены верхнего, нижнего мевалонатного пути и мевалонаткиназы, с последующим отбором клонов с оптимальным сочетанием числа копий данных экспрессионных кассет по увеличению продукции. Использование данного подхода с минимальным числом потенциальных точек интеграции CRIM-плазмид позволило повысить продукцию изопрена как минимум на 30%. Для ускорения конструирования штаммов-реципиентов, содержащих в геноме несколько сайтов *attB* фага  $\phi 80$ , был модифицирован ранее разработанный метод Dual In/Out/.

**Ключевые слова:** скоординированная экспрессия, метод Dual In/Out, мевалонатный путь, *Pantoea ananatis*, изопрен, интеграция гетерологичного пути

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-2-3-15

Стремительное развитие промышленной биотехнологии, основанное на использовании подходов метаболической инженерии и синтетической биологии, требует параллельного совершенствования методов целенаправленной модификации генома для все более широкого спектра микроорганизмов. За последние десятилетия введение гетерологичных путей биосинтеза чужеродных метаболитов в клетки стало рутинной задачей, появилась возможность не только улучшения традиционных процессов микробной ферментации, но и производства ряда новых веществ, ключевых

для химического синтеза, таких как 1,2-пропандиол [1], изобутанол [2], путресцин [3] и изопрен [4].

Чтобы соответствовать требованиям биологической безопасности, промышленные продуценты не должны содержать плазмиды и маркеры устойчивости к антибиотикам в их геномах. Поэтому, как правило, требуется интеграция интересующих нас генов в хромосому базового штамма. Другой задачей, которую приходится решать для достижения максимального уровня продукции при нормальном росте клеток, является оптимизация уровней экспрессии генов,

Список сокращений:  $B_{\lambda}$  – *attB*-сайт фага  $\lambda$ ;  $B_{\phi 80}$  – *attB*-сайт фага  $\phi 80$ ; Cm – хлорамфеникол; Cm<sup>R</sup> – устойчивость к хлорамфениколу; Cm<sup>S</sup> – чувствительность к хлорамфениколу; *cat* – ген устойчивости к хлорамфениколу; Int – фаговая интеграза; IPTG – изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид; Km – канамицин; Km<sup>R</sup> – устойчивость к канамицину; *kan* – ген устойчивости к канамицину;  $L_{\lambda}$  – *attL*-сайт фага  $\lambda$ ;  $L_{\phi 80}$  – *attL*-сайт фага  $\phi 80$ ;  $R_{\lambda}$  – *attR*-сайт фага  $\lambda$ ;  $R_{\phi 80}$  – *attR*-сайт фага  $\phi 80$ ; Tc – тетрациклин; Tc<sup>R</sup> – устойчивость к тетрациклину; *tetAR* – гены устойчивости к тетрациклину; Xis – эксцизионаза.

участвующих в пути биосинтеза, для достижения баланса активностей соответствующих ферментов. Чтобы упростить и ускорить решение этих задач, требуется дальнейшая разработка и совершенствование методов интеграции нескольких протяженных фрагментов ДНК в хромосому и оптимизации относительного уровня экспрессии интегрированных генов.

Эффективная интеграция протяженных последовательностей ДНК в геном *E. coli* может быть достигнута с помощью транспозонов [5, 6], условно реплицирующихся плазмид, несущих сравнительно большие фрагменты ДНК идентичные сайтам в геноме [7] и сайт-специфической рекомбинации [8–10]. В частности, CRIM плазмиды (Conditional-Replication, Integration, and Modular plasmids [9]) могут быть интегрированы в или вырезаны из *attB* сайта, расположенного в хромосоме, фаговой интегразой (Int) или интегразой в паре с эксцизионазой (Xis), соответственно. Использование вырезаемых маркеров антибиотической устойчивости [11–16] позволяет многократно интегрировать генетический материал в геном одного и того же штамма. Так, недавно была разработана система Dual In/Out, которая является мощным инструментом для пошаговой интеграции нескольких фрагментов ДНК в заранее выбранные локусы хромосомы *E. coli* [17]. Этот подход включает в себя пять этапов: 1) the First In –  $\lambda$ Red-зависимая интеграция линейного фрагмента DNA  $L_{\phi 80}$ -*kan*- $R_{\phi 80}$  в желаемую точку бактериальной хромосомы в нужной ориентации; 2) the First Out –  $\phi 80$ -Int/Xis-зависимое рекомбинационное удаление интегрированного  $Km^R$ -маркера с образованием  $B_{\phi 80}$  в хромосоме; 3) the Second In –  $\phi 80$ -Int-зависимая рекомбинационная интеграция CRIM-плазмиды в сайт  $B_{\phi 80}$  бактериальной хромосомы; 4) перенос полученной конструкции P1-трансдукцией в конечный штамм-реципиент; 5) the Second Out –  $\lambda$ Int/Xis-зависимое рекомбинационное удаление векторной части CRIM плазмиды между участками  $L_{\lambda}$  и  $R_{\lambda}$  с сохранением целевой интегрированной в хромосому кассеты, фланкированной сайтами  $L_{\phi 80}$  и  $R_{\phi 80}$  и с образованием сайта  $B_{\lambda}$  как продукта удаления части плазмиды.

После каждого такого цикла в хромосоме штамма-реципиента добавляется немаркированная интегративная кассета, встроенная в желаемую точку. Очевидно, можно заранее сконструировать библиотеку штаммов, несущих  $B_{\phi 80}$  в разных точках хромосомы, и затем использовать ее для создания разных штаммов-продуцентов.

В настоящей работе этот подход был применен для конструирования штамма-продуцента изопрена на основе *Pantoea ananatis* AJ13355. Эта бактерия относится к семейству *Enterobacteriaceae* и является многообещающей биоплатформой с большим потенциалом для биотехнологии. Первоначально штамм AJ13355 был селекционирован специалистами японской компании Ajinomoto благодаря его способности расти при умеренно низком pH в присутствии насыщающих концентраций L-глутаминовой кислоты. Определена полная нуклеотидная последовательность и проведена аннотация генома *Pantoea ananatis* AJ13355, осуществлена частичная реконструкция метаболизма этой бактерии [18]. Все существующие методы для редактирования генома *E. coli* с использованием гомологичной и сайт-специфической рекомбинации (рекомбинирования) были адаптированы для работы с той же эффективностью в *Pantoea ananatis* AJ13355, SC17(0) [19]. На базе штамма SC17(0) и разработанных инженерных подходов были созданы и успешно внедрены в действующее промышленное производство продуценты L-глутаминовой кислоты и L-цистеина [20, 21].

При конструировании штамма-продуцента изопрена гетерологичные гены мевалонатного пути в составе трех интегративных кассет были последовательно интегрированы в хромосому штамма SC17(0) с помощью метода Dual In/Out. При этом гены верхнего мевалонатного пути из *E. faecalis* [22, 23] под транскрипционным контролем  $P_{phoC}$ -промотора входили в состав первого из оперонов [24]. Гены нижнего мевалонатного пути из *S. cerevisiae* с оптимизированными для экспрессии в *P. ananatis* кодонами под контролем конститутивного  $P_{tac}$ -промотора входили в состав второго оперона [24]. Ген мевалонаткиназы из *M. paludicola* экспрессировался отдельно под контролем конститутивного  $P_{tac}$ -промотора в составе третьей кассеты [25]. Таким образом, полученный штамм SWITCH-phoC содержал все гены мевалонатного пути, интегрированные в хромосому в одной копии. При этом была достигнута сравнительно высокая продукция изопрена после введения в клетки мультикопийной плазмиды с экспрессирующейся изопренсинтазой [24]. Можно было ожидать, что сбалансированное увеличение числа копий отдельных или, возможно, всех выбранных генов мевалонатного пути позволит обеспечить повышенное накопление изопрена.

При несбалансированной экспрессии генов любого биосинтетического пути происходит накопление интермедиатов, которые будут оказывать

влияние на продукцию [26]. Для мевалонатного пути известно, что по крайней мере часть его интермедиатов может накапливаться в клетке и оказывать токсическое воздействие [27]. Так, при несбалансированной суперэкспрессии генов верхнего мевалонатного пути может накапливаться гидроксиметилглутарил-КоА, что приводит к нарушению биосинтеза жирных кислот и изменению состава клеточной мембраны, вызывая значительное замедление роста [28]. При согласованной же работе генов верхнего мевалонатного пути образуется мевалонат, который легко секретируется клетками и может накапливаться в среде культивирования до высокой концентрации, не вызывая заметного ухудшения роста культуры. Продуктами реакции мевалонаткиназы и последующих ферментов мевалонатного пути являются фосфорилированные интермедиаты, которые накапливаются в клетке и ингибируют большинство мевалонаткиназ. Для достижения высоких уровней продукции изопреноидов необходимо использовать мевалонаткиназы, устойчивые к данным ингибиторам [29, 30]. Кроме того, накопление дифосфомевалоната может приводить к резкому снижению уровня аденозинтрифосфата и дНТФ в клетке, накоплению повреждений ДНК и остановке роста [31]. Накопление изопентинитпирофосфата обратно коррелирует с уровнем АТФ в клетке и дестабилизирует фосфомевалонаткиназу из *S. cerevisiae*, что может авторегулировать его биосинтез [32]. С другой стороны, изопентинитпирофосфат и пирофосфаты с более длинной цепью являются необходимыми для клетки, и истощение их пула также приводит к остановке роста. Кроме того, для синтеза необходимых клетке изопреноидов требуется строго определенное соотношение концентраций изопентинитпирофосфата и диметилаллилпирофосфата, которое определяется свойствами изомеразы [33]. Высокий уровень продукции изопрена нарушает необходимый баланс, вызывая дефицит диметилаллилпирофосфата [27].

Ранее был разработан высокоэффективный метод оптимизации экспрессии генов, расположенных в бактериальной хромосоме, с использованием  $\lambda$ Red-зависимой интеграции библиотеки рандомизированных  $P_{lac}$ -подобных промоторов перед интересующим геном, с последующей селекцией клонов с наиболее высокой продуцирующей способностью [16]. Многолетний опыт использования этого подхода в *E. coli* и *P. ananatis* доказал его эффективность [20, 21]. Но в случае оперонов, применение этого метода может быть

затруднено, поскольку транскрипция у бактерий сопряжена с трансляцией, скорости обоих процессов влияют на стабильность мРНК [34, 35], а потому во многих случаях замена промотора изменяет соотношение между экспрессией проксимальных и дистальных генов в опероне.

Цель данной работы – создание метода сбалансированного увеличения активностей ферментов целевого биосинтетического пути в штаммах-продуцентах. Метод предполагает: 1) конструирование штамма-реципиента, содержащего несколько  $B_{\phi 80}$ -сайтов, введенных в различные локусы хромосомы; 2) одновременную интеграцию CRIM плазмид, содержащих соответствующий *attP*-сайт и различные гены интересующего пути; 3) выбор интегрантов, имеющих самую высокую продуцирующую способность. В качестве модели был использован специально сконструированный штамм *P. ananatis*, продуцирующий изопрен.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы и плазмиды

Все бактериальные штаммы и плазмиды, используемые в этом исследовании, перечислены в табл. 1. Для культивирования использовались жидкая и агаризованная LB-среда [36]. При необходимости в среды добавляли канамицин (50 мг/л), тетрациклин (10 мг/л) или хлорамфеникол (25 мг/л).

### Среды и условия культивирования для определения продукции изопрена

Штаммы были трансформированы мультикопийной плазмидой, содержащей ген изопренсинтазы из *Mucuna bracteata*, и культивировались при 34 °С на чашках с агаризованной LB-средой с добавлением хлорамфеникола (100 мг/л) в течение ночи. Выросшие отдельные клоны штаммов *P. ananatis*, содержащие плазмиду, пересеивали и культивировали в течение ночи при 34 °С. Полученную биомассу инокулировали в 1 мл среды, содержащей хлорамфеникол (добавляли в виде спиртового раствора с концентрацией 100 г/л до конечной концентрации 100 мг/л). Культивирование проводили в течение 65 ч при 32 °С при перемешивании 120 об/мин в виалах для газовой хроматографии объемом 20 мл.

Состав сред, использованных для оценки продуцирующей способности штаммов, был следующим: среда 1 – 100 мМ MOPS pH 7; 5 г/л глюкозы; 18,7 мМ NH<sub>4</sub>Cl; 50,6 мМ NaCl; 0,5 мМ MgSO<sub>4</sub>; 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub>; 1 мкМ Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 5 мкМ NiSO<sub>4</sub>;

## Бактериальные штаммы и плазмиды

## Bacterial strains and plasmids

Штаммы/плазмиды	Генотип	Источник
CC118 ( $\lambda$ pir)	<i>E. coli</i> $\lambda$ pir $\Delta$ (ara-leu) araD $\Delta$ lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1	[38]
SC17(0)	Спонтанно устойчивый мутант <i>P. ananatis</i> к $\lambda$ Red	[19]
SC17(0) $\Delta$ ampC::R $\lambda$ -L $\phi$ 80-kan-R $\phi$ 80	$\Delta$ ampC::R $\lambda$ -L $\phi$ 80-kan-R $\phi$ 80	Данная работа
SC17(0) $\Delta$ ampC::R $\lambda$ -B $\phi$ 80	$\Delta$ ampC::R $\lambda$ -B $\phi$ 80	То же
IR1	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI	» »
IR2	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI $\Delta$ ampH::R $\lambda$ -B $\phi$ 80	» »
IR3	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI $\Delta$ ampH::B $\lambda$ -P <sub>phoC</sub> -mvaES	» »
IR4	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI $\Delta$ ampH::B $\lambda$ -P <sub>phoC</sub> -mvaES $\Delta$ crtE-Z::R $\lambda$ -B $\phi$ 80	» »
IR5	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI $\Delta$ ampH::B $\lambda$ -P <sub>phoC</sub> -mvaES $\Delta$ crtE-Z::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -mvk <sup>mpd</sup>	» »
IR6	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI $\Delta$ ampH::B $\lambda$ -P <sub>phoC</sub> -mvaES $\Delta$ crtEZ::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -mvk <sup>mpd</sup> $\Delta$ gcd::R $\lambda$ -B $\phi$ 80	» »
IR6-mvk	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI $\Delta$ ampH::B $\lambda$ -P <sub>phoC</sub> -mvaES $\Delta$ crtE-Z::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -mvk <sup>mpd</sup> $\Delta$ gcd::pAH162-P <sub>tac</sub> -mvk <sup>mpd</sup>	» »
IR6-mvaES	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI $\Delta$ ampH::B $\lambda$ -P <sub>phoC</sub> -mvaES $\Delta$ crtE-Z::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -mvk <sup>mpd</sup> $\Delta$ gcd::pAH162-P <sub>phoC</sub> -mvaES	» »
IR5-3 $\Delta$	$\Delta$ ampC::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -KDyI $\Delta$ ampH::B $\lambda$ -P <sub>phoC</sub> -mvaES $\Delta$ crtE-Z::B $\lambda$ -P <sub>tac</sub> -mvk <sup>mpd</sup> $\Delta$ gcd::R $\lambda$ -B $\phi$ 80 $\Delta$ ampC2::R $\lambda$ -B $\phi$ 80 $\Delta$ bla::R $\lambda$ -B $\phi$ 80	» »
pMWattphi	pMWattphi	[17]
pMW118-( $\lambda$ attL-Cm <sup>R</sup> - $\lambda$ attR)	pMW118-( $\lambda$ attL-Cm <sup>R</sup> - $\lambda$ attR)	[16]
RSFRedTER	RSF1010 репликон; $\lambda$ gam-bet-exo; P <sub>lacUV5</sub> -lacI-sacB	[19]
pMW- $\lambda$ Int/Xis-cat	pSC101-ts репликон; $\lambda$ xis-int	То же
pAH123-cat	pSC101-ts репликон; $\phi$ 80 int	[39]
pAH129-cat	pSC101-ts репликон; $\phi$ 80 xis-int	То же
pAH162-P <sub>tac</sub> -mvk	R6K репликон; mvk <sup>mpd</sup>	[25]
pAH162-P <sub>tac</sub> -KDyI	R6K репликон; PMK, MVD, idi из <i>S. cerevisiae</i>	[24]
pAH162-P <sub>phoC</sub> -mvaES	R6K репликон; P <sub>phoC</sub> -mvaES	То же

10 мг/л КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> и среда 2 – 20 мМ MES pH 7; 4 г/л глюкозы; 1 г/л MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 10 г/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5 мг/л FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 5 мг/л MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 50 мг/л Yeast Extract (Difco, Нидерланды).

## Измерение концентрации изопрена

Для приготовления стандартных растворов изопрена в воде с концентрацией 1, 2,5, 5, 10, 20, 50 и 100 мг/л использовался 2,03 г/л раствор изопрена в метаноле (конечная концентрация метанола в растворе стандарта 2,5%).

Для измерения концентрации изопрена использовали газовый хроматограф GC-2014 (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором и парофазным автосемплером HT200H (hta company, Италия) и колонку RXI-1ms 30м 0,53мм

1,5 мкм (Restek, США). Время измерения 15 мин, температура колонки 37 °С, температура детектора 250 °С, давление газа в колонке 64,7 кПа, поток газа-носителя (гелий) 105,1 мл/мин, объемная скорость газа-носителя через колонку 17,02 мл/мин, объем вводимой пробы 0,4 мл.

## Использованные материалы

Все праймеры, используемые в этой работе, были химически синтезированы компанией «Евроген» (Россия) на коммерческой основе. Их нуклеотидные последовательности приведены в табл. S1 (дополнительный материал). Геномную ДНК выделяли, используя Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США). Для выделения фрагментов из геля использовался QIAquick

Gel Extraction kits (QIAGEN GmbH, Германия). Рестриктаза *PstI* и Taq-полимераза произведены компанией Fermentas (Thermo Fisher Scientific, США) и Т4ДНК-лигаза – New England Biolabs (Великобритания). Все реакции проводились в соответствии с рекомендациями, указанными в инструкции производителя.

### Конструирование штаммов с модификацией

#### $R_\lambda$ - $L_{\phi 80}$ -*kan*- $R_{\phi 80}$

Для конструирования модифицированного локуса  $R_\lambda$ - $L_{\phi 80}$ -*kan*- $R_{\phi 80}$  в хромосоме *P. ananatis* с помощью  $\lambda$ Red-зависимой интеграции, фрагмент ДНК с  $R_\lambda$  был амплифицирован в ПЦР с праймерами P1–P2 (см. табл. S1) и плазмидой pMW118- (*lattL*- $Cm^R$ -*lattR*) [16] в качестве матрицы. Фрагмент ДНК  $L_{\phi 80}$ -*kan*- $R_{\phi 80}$  был амплифицирован в ПЦР с праймерами P3–P4 (см. табл. S1) и плазмидой pMWattphi [17] в качестве матрицы. Затем оба фрагмента были обработаны *PstI* (Fermentas, Литва) и лигированы. Сайт узнавания *PstI* был введен в состав праймеров P2 и P3 (см. табл. S1). Фрагмент ДНК, соответствующий по размеру желаемому продукту лигирования, был выделен из агарозного геля и использован в качестве матрицы для наработки нового фрагмента в ПЦР с праймерами P1 и P4 (см. табл. S1). Полученный фрагмент был интегрирован вместо гена *ampC* (ORF PAJ\_1290, см. полная нуклеотидная последовательность генома *P. ananatis* AJ13355, GenBank, PRJDA60793) в штамм SC17(0)/RSFRedTER [19]. При проверке  $Km^R$ -клонов в ПЦР с праймерами P5 и P6, указанными в табл. S1, была подтверждена ожидаемая структура хромосомы. Геномная ДНК, выделенная из данного штамма, использовалась в дальнейшем в качестве матрицы для наработки фрагментов для последующей  $\lambda$ Red-зависимой интеграции маркера  $Km^R$  в локусы *ampH* (ORF PAJ\_2072), *crt* (ORF PAJ\_p0121-PAJ\_p0126), *bla* (ORF PAJ\_1103), *gcd* (ORF PAJ\_3473) и *ampC2* (ORF PAJ\_3735) с помощью выбора концевых олигонуклеотидных праймеров P8–P9, P12–P13, P16–P17, P18–P19, P20–P21 (см. табл. S1), соответственно, для амплификации фрагмента, фланкированного сайтами  $R_\lambda$  и  $R_{\phi 80}$ . Полученные модификации были проверены в ПЦР с тестовыми праймерами P10–P11, P14–P15, P22–P23, P24–P25, P26–P27 (см. табл. S1).

### Конструирование «точки интеграции», с использованием генов *tetAR*

Фрагмент ДНК, полученный в ПЦР с праймерами P28–P29 и плазмидой pAN162-*lattL*- $Tc^R$ -*lattR* [16] в качестве матрицы, был введен с помощью

$\lambda$ Red-зависимой интеграции в штамм SC17(0)  $\Delta$ *bla*:: $R_\lambda$ - $L_{\phi 80}$ -*kan*- $R_{\phi 80}$  с последующей селекцией на среде с тетрациклином и проверкой в ПЦР с праймерами P22–P23 (см. табл. S1).

### $\phi 80$ -*Xis*/*Int*-зависимое удаления маркеров

Для вырезания маркеров антибиотической устойчивости из штаммов проводилась электропорация плазмиды pAN129-*cat* (обеспечивает экспрессию генов  $\phi 80$ *int* и  $\phi 80$ *xis* под контролем термочувствительного репрессора  $\lambda$ CIts857). После электропорации клетки инкубировали при +37 °C в течение 2 ч, после чего высевали на твердую среду с хлорамфениколом и инкубировали при +37 °C в течение ночи. Среди полученных колоний  $Cm^R$  были отобраны чувствительные к канамицину варианты и проверены в ПЦР с праймерами P4–P5, P10–P11, P14–P15, P22–P23, P24–P25, P26–P27 (см. табл. S1) для замены локусов *ampC*, *ampH*, *crt*, *bla*, *gcd* и *ampC2* соответственно. Отобранные клоны были излечены от плазмиды-помощника pAN129-*cat* повторным расеевом до отдельных колоний при +37 °C и отбором среди них  $Cm^S$ -вариантов. В результате были получены штаммы, содержащие немаркированные сайты  $R_\lambda$ - $B_{\phi 80}$  в соответствующих локусах.

### Интеграция плазмид в сайты $B_{\phi 80}$ в хромосоме *P. ananatis*

В штамм, содержащий модифицированный сайт  $R_\lambda$ - $B_{\phi 80}$ , с помощью электротрансформации была введена термочувствительная плаزمиды-помощник pAN123-*cat* (обеспечивает экспрессию гена  $\phi 80$ *int* под контролем термочувствительного репрессора  $\lambda$ CIts857). После чего в полученные  $Cm^R$ -колонии была трансформирована целевая CRIM-плазмиды. После электропорации клетки инкубировали при +37 °C в течение 2 ч, затем высевали на твердую среду с антибиотиком (в зависимости от маркера устойчивости заданной CRIM-плазмиды) и инкубировали при +37 °C в течение ночи. Полученные клоны были проверены с помощью ПЦР с праймерами P6–P5, P6–P10 и P6–P15 (см. табл. S1) для точек интеграции в локусах *ampC*, *ampH* и *crt*.

Для отбора тройных интегрантов в ПЦР сначала использовали смесь, содержащую тестовые праймеры на хромосоме для точек интеграции *bla*, *gcd* и *ampC2* и универсальный праймер на части  $R_{\phi 80}$ , возникающей только при интеграции в  $B_{\phi 80}$ . Следующие пары праймеров P22–P6, P24–P6, P26–P6 были использованы для подтверждения факта интеграции в локусы *bla*, *gcd*

и *ampC2*, соответственно. Отобранные клоны далее проверяли в ПЦР, чтобы определить, какая именно кассета интегрирована в конкретную точку, один из праймеров отжигался непосредственно на интегрируемую кассету, а второй – тестовый – на хромосому. Для детального анализа тройных интегралов CRIM-плазмид рАН162-*P<sub>tac</sub>*-*KDyI*, рАН162-*P<sub>phoC</sub>*-*mvaES* и рАН162-*P<sub>tac</sub>*-*mvk* были использованы следующие пары праймеров: P23–P30, P23–P31, P23–P32 для интеграции в локус *bla*; P25–P30, P25–P31, P25–P32 для интеграции в локус *gcd* и P27–P30, P27–P31, P27–P32 для интеграции в локус *ampC2* (см. табл. S1).

После этого клетки были излечены от плазмиды-помощника рАН123-*cat* повторным рассевом до отдельных колоний при +37 °С и отбором среди них *Sm<sup>S</sup>*.

### Удаление векторной части CRIM-плазмид

Для удаления векторной части в целевой штамм-интегрант с помощью электропорации была введена плаزمида рMW- $\lambda$ Int/*Xis*-*cat*, которая содержит гены фага  $\lambda$  *int* и *xis* под контролем термочувствительного репрессора  $\lambda$ CIts857. После электропорации клетки инкубировали при +37 °С 3–4 ч, высевали на твердую среду с хлорамфениколом (25 мкг/мл) и инкубировали при +37 °С в течение ночи. Среди полученных *Sm<sup>R</sup>* колоний были отобраны клоны, чувствительные к соответствующему антибиотику. Рекомбинанты с дополнительно удаленным *L<sub>φ80</sub>* отбирали в ПЦР с праймерами P7–P5, P7–P10 и P7–P15 для точек интеграции  $\Delta$ *ampC*,  $\Delta$ *ampH* и  $\Delta$ *crtE-Z* (табл. S1), соответственно. Затем клетки были излечены от плазмиды-помощника рMW- $\lambda$ Int/*Xis*-*cat* повторным рассевом до отдельных колоний при +37 °С и отбором среди них *Sm<sup>S</sup>* клонов.

### Конструирование плазмиды рHSG398-*P<sub>tac</sub>*-*IspS(M)*

Фрагмент ДНК, полученный в ПЦР с праймерами P33–P34 и плазмидой рSTV28-*P<sub>tac</sub>*-*IspS(M)* [37] в качестве матрицы, был лигирован с фрагментом ДНК, полученным в ПЦР с праймерами P35–P36 и плазмидой рHSG398 (TAKARA BIO, Япония) в качестве матрицы (In-Fusion® HD Cloning Kit (TAKARA BIO)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы обеспечить сбалансированное увеличение уровня экспрессии генов мевалонатного пути, было решено первоначально осуществить конс-

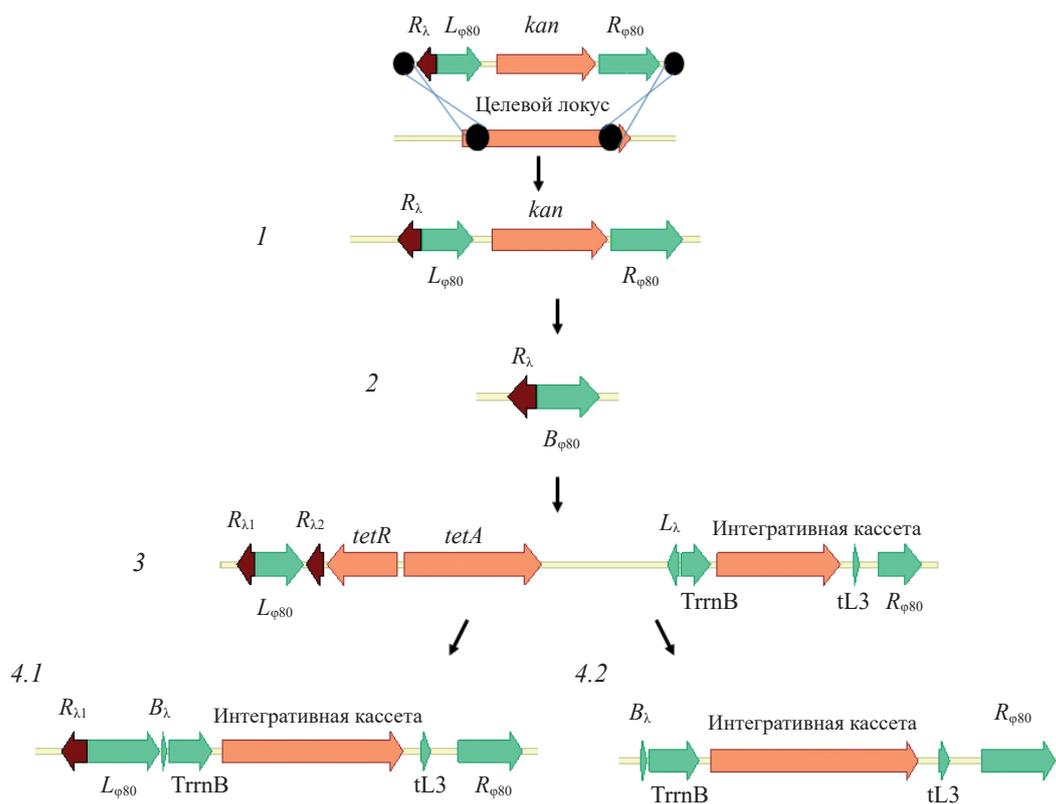
труирование рекомбинантного штамма, содержащего в своем геноме на 1-ом этапе все гены мевалонатного пути и на 2-ом этапе – несколько точек потенциальной интеграции «дополнительных» копий уже интегрированных генов этого биосинтетического пути или их гомологов из других организмов. В данной работе использовалась стратегия с тремя точками потенциальной вторичной интеграции, а «дополнительные» гены входили в состав тех же интегративных кассет, которые использовались на 1-ом этапе. В идеале число потенциальных точек интеграции должно было быть значительно бóльшим, а интегрировать «дополнительные» гены следовало бы по одному, однако, даже использованная, существенно методически сокращенная стратегия, с минимальными затратами на селекцию на заключительном этапе, покажут далее результаты, позволила отобрать желаемый продуцент изопрена, превосходящий на 30% свой исходный аналог. В полученную таким образом хромосому реципиентного штамма IR5-3Δ (табл. 1) в одном эксперименте должна была вводиться смесь CRIM-плазмид (в нашем случае – из трех различных плазмид с одним из двух селективных маркеров устойчивости к антибиотикам – *Tc<sup>R</sup>*, *Km<sup>R</sup>*) со всеми генами мевалонатного пути и интегрироваться по  $\phi$ 80-Int-зависимому механизму с последующим отбором целевых множественных интегралов на среде с обоими антибиотическими маркерами. Индивидуальные клоны планировалось использовать в качестве реципиентов для электропорации плазмиды с геном изопренсинтазы, а полученные трансформанты – тестировать на продукцию изопрена.

### Необходимость модификации метода Dual In/Out

Для реализации предлагаемой стратегии был получен штамм IR5-3Δ, клонированы все гены мевалонатного пути и созданы три точки интеграции дополнительных копий генов. Первоначально в качестве основного метода для интеграции целевых генов планировалось использовать Dual In/Out стратегию [17]. Однако, в данном случае прямое использование всех ранее созданных элементов метода Dual In/Out было осложнено тем, что при  $\lambda$ Red-зависимой интеграции маркированных линейных кассет *L<sub>φ80</sub>*-*kan*-*R<sub>φ80</sub>* с флангами 40 пн, гомологичных целевому локусу хромосомы, происходила их рекомбинация с введенными ранее кассетами из-за присутствия на их флангах *L<sub>φ80</sub>* и *R<sub>φ80</sub>* в составе более протяженных участков исходной кассеты (463 пн и 388 пн, соответственно).

Чтобы последовательно вводить несколько  $B_{\phi 80}$ -сайтов с помощью  $\lambda$ Red-интеграции непосредственно в продуцент, было решено провести некоторую модификацию ранее разработанной стратегии Dual In/Out. Каждый раз при внесении будущей точки  $\phi 80$ -Int-зависимой интеграции CRIM-плазмиды в первоначально выбранную область бактериальной хромосомы осуществлялась Red-зависимая интеграция линейного фрагмента ДНК ( $R_{\lambda}$ - $L_{\phi 80}$ - $kan$ - $R_{\phi 80}$ ), содержащего дополнительный сайт  $R_{\lambda}$  перед сайтом  $L_{\phi 80}$ . После  $\phi 80$ -Int/Xis-зависимого удаления введенного  $Km^R$ -маркера это позволило получить в составе хромосомы точку последующей  $\phi 80$ -Int-зависимой интеграции CRIM-плазмиды в виде  $R_{\lambda}$ - $B_{\phi 80}$  вместо стандартного  $B_{\phi 80}$ . Тогда, при интеграции CRIM-плазмид в модифицированный сайт интеграции вновь образующийся рекомбинантный сайт  $L_{\phi 80}$  оказывался окруженным прямым повтором двух сайтов  $R_{\lambda}$

( $R_{\lambda 1}$ - $L_{\phi 80}$ - $R_{\lambda 2}$ ), где  $R_{\lambda 1}$  – ранее введенный в хромосому при образовании точки интеграции и  $R_{\lambda 2}$  – сайт из структуры вновь введенной CRIM-плазмиды. В этом случае при экспрессии в клетках генов *int-xis* фага  $\lambda$  и удаления векторной части CRIM-плазмиды, равновероятна рекомбинация между единственным рекомбиногенным сайтом  $L_{\lambda}$  и одним из двух имеющихся в хромосоме сайтов –  $R_{\lambda 1}$  или  $R_{\lambda 2}$ . В результате этих событий образуются интересующие нас рекомбинанты, утратившие или векторную часть плазмиды и сайт  $L_{\phi 80}$  (при рекомбинации по сайту  $R_{\lambda 1}$  (рис.1, 4.2)), или только векторную часть плазмиды (при рекомбинации по сайту  $R_{\lambda 2}$  (рис.1, 4.1)). Отметим, что, хотя предварительное удаление  $R_{\lambda 2}$  из состава интегративного вектора делает безальтернативным результат финальной рекомбинации, на практике при использовании интегративных плазмид, содержащих  $R_{\lambda 2}$ , желаемые варианты образуются с частотой 50% и



**Рис. 1.** Модифицированный метод Dual In/Out. 1 –  $\lambda$ Red-зависимая интеграция ПЦР-амплифицированного фрагмента  $R_{\lambda}$ - $L_{\phi 80}$ - $kan$ - $R_{\phi 80}$ , фланкированного 40 пн последовательностями, гомологичными целевому локусу (the First In); 2 –  $\phi 80$ -Int/Xis-зависимое вырезание маркера антибиотической ( $Km^R$ ) устойчивости (the First Out); 3 –  $\phi 80$ -Int-зависимая интеграция  $Tc^R$ -CRIM плазмиды (the Second In); 4.1 –  $\lambda$ Int/Xis-зависимое удаление векторной части  $Tc^R$ -CRIM плазмиды между участками  $L_{\lambda}$  и  $R_{\lambda 2}$  плазмиды с сохранением  $R_{\lambda 1}$  перед точкой интеграции плазмиды и 4.2 – удаление векторной части  $Tc^R$ -CRIM плазмиды между  $L_{\lambda}$  и  $R_{\lambda 1}$  с одновременным удалением и сайта  $L_{\phi 80}$  ( $\lambda$ Int/Xis) (the Second Out)

**Fig. 1.** The modified Dual In/Out method. 1 –  $\lambda$ Red-dependent integration of the PCR-amplified fragment  $R_{\lambda}$ - $L_{\phi 80}$ - $kan$ - $R_{\phi 80}$  flanked by 40 bp homologous to the target locus (the First In); 2 – excision of the marker of antibiotic resistance ( $\phi 80$ -Int/Xis) (the First Out); 3 – plasmid integration ( $\phi 80$ -Int) (the Second In); 4.1 – excision vector part ( $\lambda$ Int/Xis); 4.2 – simultaneous excision of the vector part and  $L_{\phi 80}$  ( $\lambda$ Int/Xis) (the Second Out)

легко могут быть отобраны с помощью ПЦР. Поэтому в данном эксперименте мы использовали ранее сконструированные CRIM-плазмиды. Для будущих экспериментов сайт  $R_{\lambda 2}$  был удален из вектора pAN162- $\lambda attL$ -Tc<sup>R</sup>- $\lambda attR$  [16].

### Использование модифицированного метода Dual In/Out для конструирования IR5-3Δ

С помощью модифицированного метода Dual In/Out CRIM-плазмиды pAN162-P<sub>tac</sub>-KDyI, pAN162-P<sub>phoC</sub>-*mvaES* и pAN162-P<sub>tac</sub>-*mvk* были последовательно интегрированы в локусы *ampC*, *ampH* и *crt* соответственно, каждый раз за счет функционирования интегразы  $\phi 80$ -Int с последующим удалением векторной части CRIM-плазмиды с помощью  $\lambda$ Int/Xis и отбором вариантов, утративших  $L_{\phi 80}$ . Затем в ген *gcd* с помощью Red-зависимой интеграции линейного фрагмента  $R_{\lambda}$ - $L_{\phi 80}$ -*kan*- $R_{\phi 80}$  с последующим  $\phi 80$ -Int/Xis-зависимым удалением маркера была введена «точка интеграции» ( $R_{\lambda}$ - $B_{\phi 80}$ ). Полученный штамм был назван IR5-Δ*gcd*. Аналогично была получена еще одна интеграция линейного фрагмента с одновременной делецией генов *ampC2*. Как и ожидалось, присутствие в геноме ранее интегрированных  $R_{\phi 80}$  (в отсутствие соответствующих  $L_{\phi 80}$ ) не снижало частоту  $\lambda$ Red-интеграции в целевые локусы хромосомы за счет «ошибочной интеграции» в ранее введенные кассеты. Полученный устойчивый к канамицину штамм, несущий  $R_{\lambda}$ - $L_{\phi 80}$ -*kan*- $R_{\phi 80}$  в локусе *ampC2*, был назван IR5-2Δ.

На последнем этапе решено было проверить возможность одновременного удаления сразу двух маркеров антибиотической устойчивости из генома *P. ananatis* с использованием плазмиды-помощника pAN129-cat. Так как специфически направленная  $\lambda$ Red-интеграция кассеты, фланкированной  $R_{\lambda}$ - $L_{\phi 80}$  и  $R_{\phi 80}$ , в целевой локус хромосомы штамма, уже несущего  $R_{\lambda}$ - $L_{\phi 80}$ -*kan*- $R_{\phi 80}$ , была невозможна, хромосомная модификация Δ*bla*:: $R_{\lambda}$ - $L_{\phi 80}$ -*tetAR*- $R_{\phi 80}$  была сконструирована в штамме SC17(0) дикого типа, как описано в разделе «Условия эксперимента», и перенесена в штамм IR5-2Δ методом электропорации геномной ДНК. Описанная выше стандартная процедура  $\phi 80$ -Int/Xis-зависимого удаления маркера была применена для одновременного удаления генов канамициновой и тетрациклиновой устойчивости из полученного штамма, в результате чего был получен штамм IR5-3Δ. Частота отбора клонов, чувствительных к обоим антибиотикам, составила в этом эксперименте около 1%. Учитывая, что общее число клонов в таких

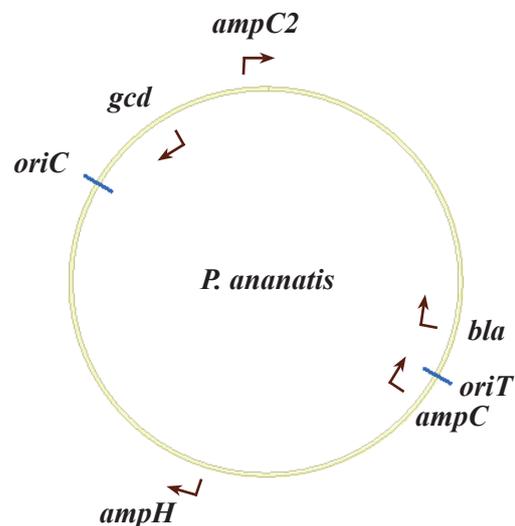
экспериментах превосходит 10<sup>4</sup>, представляется возможным излечение штаммов даже от трех маркеров антибиотической устойчивости одновременно, что может существенно ускорить их конструирование.

С другой стороны, полученный результат показывает, что при  $\phi 80$ -Int/Xis-зависимом удалении маркера антибиотической устойчивости из «точки интеграции» с достаточно высокой вероятностью могут утрачиваться ранее введенные экспрессионные кассеты, если они фланкированы сайтами  $L_{\phi 80}$  и  $R_{\phi 80}$ . Проведенная нами модификация метода Dual In/Out, обеспечивающая удаление  $L_{\phi 80}$  из состава интегрированной генетической кассеты, позволила избежать таких нежелательных событий.

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

Рис. 2 иллюстрирует расположение локусов, использованных в данной работе, относительно начала репликации хромосомы. Локус *crt* не указан на рисунке, так как расположен на мегаплазмиде pEA320, являющейся частью генома *P. ananatis* AJ13355.

Введенные в хромосому штамма IR5-3Δ сайты  $R_{\lambda}$ - $B_{\phi 80}$  были расположены на разном расстоянии



**Рис. 2.** Схема расположения локусов в хромосоме *P. ananatis* для интеграции экспрессионных кассет. Стрелками указано направление транскрипции гена. *oriC* и *oriT* – старт и терминатор репликации соответственно

**Fig. 2.** Positions of loci of *P. ananatis* chromosome used for integration of expression cassettes. The arrows indicate the direction of transcription of the gene. Bold lines – start and terminator replication

от точки *oriC* – начала репликации хромосомы (рис. 2). Не исключено, что продуцирующая способность штамма зависит не только от числа копий того или иного гена, но и от их расположения в хромосоме. Хорошо известно, что для *E. coli* в логарифмической фазе роста локусы хромосомы, расположенные вблизи начала репликации, присутствуют в клетках в большем числе копий, чем локусы, расположенные на противоположной стороне хромосомы за счет разветвленной  $\Theta$  структуры частично реплицированной кольцевой бактериальной хромосомы [40]. Интегративная кассета может подвергаться сквозной транскрипции с хромосомы, хотя для снижения влияния этого эффекта в используемой конструкции был предусмотрен терминатор, предотвращающий эту сквозную транскрипцию [17]. Зная соотношение времени репликации ( $C$ ) ко времени удвоения ( $\tau$ ), для *E. coli* может быть рассчитан уровень экспрессии гена ( $E$ ) в зависимости от его положения на хромосоме относительно начала репликации ( $p$ ) по формуле

$$E = E_0 \cdot 2^{-p \cdot C/\tau},$$

где  $E_0$  – уровень экспрессии при  $p_0$ , т.е. в *oriC* [41]. Для подтверждения зависимости уровня экспрессии гена от его локализации в геноме *P. anantidis* была проведена интеграция плазмиды рАН162- $P_{tac}$ -FDH, несущей ген NAD-зависимой форматдегидрогеназы из *Candida boidinii* под контролем  $P_{tac}$ -промотора, в указанные локусы и измерена форматдегидрогеназная активность по описанному ранее протоколу [42]. Уровни экспрессии гена форматдегидрогеназы, интегрированного в локусы *bla* и *ampC*, расположенные рядом с терминатором репликации, совпадали в пределах погрешности  $36 \pm 4$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> и  $33 \pm 5$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>, соответственно, а в случае локуса *ampH* экспрессия возрастала в 1,3 раза до  $48 \pm 3$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>. Используя данные значения, было рассчитано соотношение  $C/\tau = 1,5$ , что совпадает с ранее опубликованным значением для *E. coli* [41]. Такой же как в *ampH*, уровень экспрессии наблюдался при интеграции в плазмиду рЕА320 и составил  $46 \pm 2$  нмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>. Вероятно, эта плаزمида присутствует в клетках в 1-2 копиях. Для локуса *gcd*, расположенного вблизи старта репликации, можно было ожидать еще большее увеличение активности для интегрированных в него кассет.

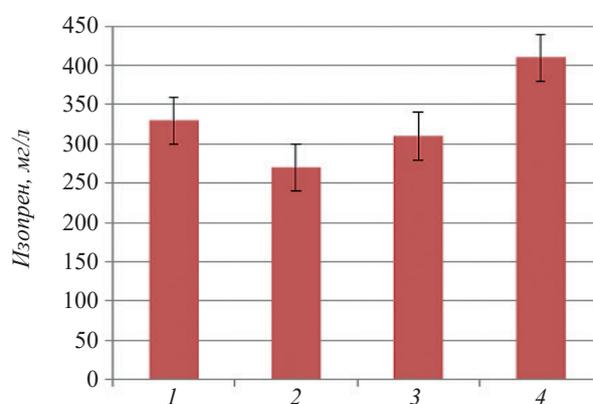
Таким образом, соотношение экспрессии генов в *P. anantidis* могло меняться в зависимости от их взаимного расположения в хромосоме. Соот-

ветственно, продуцирующая способность штаммов, несущих одно и то же число копий интегративных кассет, но по-разному расположенных в геноме, могла быть разной. Поэтому в нашем эксперименте мы сравнили продуцирующую способность штаммов, различавшихся не только числом копий интегративных кассет, но и их локализацией в хромосоме.

### Предварительное определение лимитирующей активности MVA-пути в модельном штамме

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

В одной из недавних работ проводился расчет лимитирующей активности для гетерологичного MVA-пути на основании известных кинетических параметров ферментов [43]. Эти расчеты хорошо согласуются с данными настоящей работы по продукции изопрена штаммами, полученными при интеграции вторых копий генов *mvaES*, *mvaS* и *mvk* в штамм IR5- $\Delta$ *gcd* (рис. 3). Расчеты также показали, что для увеличения выхода конечного



**Рис. 3.** Накопление изопрена штаммами с дополнительной копией одной из кассет ( $P_{tac}$ -*mvk*,  $P_{phoC}$ -*mvaS* или  $P_{phoC}$ -*mvaES*). 1 – IR5- $\Delta$ *gcd* (контроль); 2 – IR5- $\Delta$ *gcd*:: $P_{tac}$ -*mvk*; 3 – IR5- $\Delta$ *gcd*:: $P_{phoC}$ -*mvaS*; 4 – IR5- $\Delta$ *gcd*:: $P_{phoC}$ -*mvaES*. Штаммы были трансформированы мультিকопийной плазмидой рSTV- $P_{tac}$ - $\phi$ 10-*ispS*(M). Культивирование проводили на среде 1. Приведены усредненные данные для четырех плазмидных клонов каждого штамма

**Fig. 3.** Isoprene accumulation by the strains with additional copy of  $P_{tac}$ -*mvk*<sup>mpd</sup>,  $P_{phoC}$ -*mvaS* or  $P_{phoC}$ -*mvaES*. 1 – IR5- $\Delta$ *gcd* (control); 2 – IR5- $\Delta$ *gcd*:: $P_{tac}$ -*mvk*<sup>mpd</sup>; 3 – IR5- $\Delta$ *gcd*:: $P_{phoC}$ -*mvaS*; 4 – IR5- $\Delta$ *gcd*:: $P_{phoC}$ -*mvaES*. All strains carried the рSTV28- $P_{tac}$ - $\phi$ 10-*ispS*(M) plasmid

продукта необходимо одновременное увеличение активности гидроксиметилглутарил-КоА синтазы и гидроксиметилглутарил-КоА редуктазы, что соответствует амплификации генов *mvaES*.

Введение дополнительных копий *mvk* и *mvaS* не только не увеличило, но даже несколько снизило продукцию, что может быть связано с ингибированием ферментов мевалонатного пути каким-либо из его фосфорилированных интермедиатов или гидроксиметилглутарил-КоА. Увеличение продукции наблюдалось лишь при интеграции *mvaES* оперона.

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

Штамм IR5-3Δ был трансформирован смесью трех плазмид (0,5 мкг каждой плазмиды): рАН162-*P<sub>phoC</sub>-mvaES* и рАН162-*P<sub>tac</sub>-mvk*, несущих маркер тетрациклиновой устойчивости, и рАН162-*P<sub>tac</sub>-KDyI*, маркированной геном *kan*. Использование индивидуальных маркеров для всех кассет позволило бы осуществлять прямую селекцию интересующих нас сочетаний кассет по антибиотической устойчивости интегрантов. С другой стороны, если целью работы является проверка всех возможных вариантов, логично использовать один маркер устойчивости. Исходя из результатов вышеописанного опыта, можно было

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

В опыте настоящего исследования среди  $10^9$  выживших после электропорации клеток  $4,5 \cdot 10^5$  клонов выросли на чашках с добавлением канамицина,  $10^6$  клонов – на чашках с добавлением тетрациклина и  $1,5 \cdot 10^4$  клонов – на чашках с обоими антибиотиками (частота интеграции  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$ , соответственно). Среди устойчивых к канамицину клонов 10% клонов оказались устойчивыми к тетрациклину. В данных условиях эксперимента частота электропорации, определенная на основании частоты электропорации автономно-реплицирующейся плазмиды, составила  $10^{-2}$ . Следовательно, интеграция каждой дополнительной кассеты происходила с частотой  $>10^{-1}$ . Можно было ожидать, что в данных условиях эксперимента возможна интеграция 5-6 плазмид одновременно.

Для клонов, выросших на обоих антибиотиках, был проведен ПЦР-анализ (см. «Условия эксперимента»). Среди 95 проверенных клонов были отобраны 18 интегрантов, несущих вставки во всех трех локусах *gcd*, *ampC2* и *bla*. Детальный анализ тройных интегрантов показал, какая именно плаزمид интегрирована в каждый локус. Среди тройных интегрантов, были отобраны шесть групп клонов с разными генотипами (табл. 2).

Таблица 2

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

#### Isoprene accumulation by the IR5-3Δ strains with additional copies of expression cassettes

Номер штамма	Локус			Изопрен, мг/л
	<i>bla</i>	<i>ampC2</i>	<i>gcd</i>	
IR5-3Δ	-	-	-	215 ± 15
1	KDyI	<i>mvk</i>	<i>mvk</i>	170 ± 15
2	<i>mvk</i>	KDyI	<i>mvk</i>	180 ± 30
3	<i>mvk</i>	<i>mvk</i>	KDyI	190 ± 30
4	-	-	<b><i>mvaES</i></b>	240 ± 30
5	<i>mvk</i>	KDyI	<b><i>mvaES</i></b>	220 ± 40
6	<i>mvk</i>	<b><i>mvaES</i></b>	KDyI	260 ± 30
7	KDyI	<b><i>mvaES</i></b>	KDyI	280 ± 30

*Примечание:* штаммы были трансформированы мультикопийной плазмидой рHSG398-*P<sub>tac</sub>-φ10-ispS(M)*. Культивирование проводили в среде 2. Приведены усредненные данные для пяти плазмидных клонов каждого штамма. Прочерк – «пустая точка интеграции» (номер 4 – одинарный интегрант). Жирным шрифтом выделены дополнительные копии *mvaES* оперона, приводящие к увеличению накопления изопрена.

*Note:* The strains were transformed with the рHSG398-*P<sub>tac</sub>-φ10-ispS(M)* multi-copy plasmid. The cultivation was performed in medium 2. The averaged data for five plasmid clones of each strain are shown. In bold, additional copies of the *mvaES* operon are highlighted. A dash means an empty integration point.

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

Для оценки продуцирующей способности штаммы были трансформированы плазмидой pHSG398-P<sub>lac</sub>-φ10-*ispS*(M), содержащей ген изопренсинтазы из *Mucuna bracteata*. Поскольку было установлено [37], что изопренсинтаза – малоактивный фермент, то для получения видимой продукции изопрена требуется введение соответствующего структурного гена на многокопийной плазмиде, под контролем высокоактивного промотора P<sub>lac</sub> и при образовании эффективно участка связывания рибосом (RBS) на основе этой области из гена *l0* бактериофага T7 [44, 45]. Культивирование проводилось в виалах для газовой хроматографии, в соответствии с протоколом, описанным в разделе «Условия эксперимента». Полученные результаты приведены в табл. 2.

Как и ожидалось, в этом эксперименте более высокой (по сравнению с родительским штаммом) продуцирующей способностью, обладали интегранты, содержащие дополнительную копию *mvaES*. Напротив, в штаммах с двумя дополнительными копиями *mvk* наблюдалось снижение продукции. Наилучший результат был получен для штамма с двумя дополнительными копиями KDyI и одной дополнительной копией *mvaES*. Хотя в этом опыте нам удалось отобрать и проверить только шесть из 27 возможных вариантов штаммов, было достигнуто увеличение продукции изопрена на 30%, что подтверждает потенциальные возможности выбранного подхода.

Таким образом, эффективность электропорации клеток *P. ananatis* и частота интеграции, обеспечиваемая плазмидой-помощником pAN123-cat, оказались достаточными для одновременной интеграции трех плазмид, несущих только два разных маркера антибиотической устойчивости. Очевидно, использование индивидуального маркера для каждой интегративной плазмиды, могло бы обеспечить более простой и эффективный отбор таких интегрантов. Нельзя исключать, что при использовании штамма-реципиента с большим числом сайтов B<sub>φ80</sub>, была возможна одновременная интеграция и большего числа плазмид. Однако в настоящем модельном эксперименте накопление изопрена измерялось методом газовой хроматографии, так как конечный продукт находился в газообразном состоянии, что делало невозможным использование современных высокопроизводительных систем культивирования.

Это накладывало жесткие ограничения на число анализируемых клонов. В общем случае, роботизация процесса с использованием биосенсоров на конечный продукт в сочетании с предложенным генно-инженерным подходом может стать высокоэффективным средством оптимизации экспрессии генов целевого биосинтетического пути.

Авторы чрезвычайно благодарны к.б.н. А.Д. Киверо (ЗАО АГРИ) за ценные замечания при работе с аналитическим оборудованием. Авторы выражают свою признательность за плодотворное сотрудничество и координацию совместных работ д-ру Уэхара (Нагаи) Юри.

#### Дополнительный материал

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Siebert D., Wendisch V.F. Metabolic pathway engineering for production of 1, 2-propanediol and 1-propanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Biofuels*, 2015, 8, 91. doi: 10.1186/s13068-015-0269-0
2. Atsumi S., Cann A.F., Connor M.R., et al. U. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.*, 2008, 10(6), 305–311. doi: 10.1016/j.ymben.2007.08.003
3. Qian Z.G., Xia X.X., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 104(4), 651–662. doi: 10.1002/bit.22502
4. Bentley F.K., Zurbriggen A., Melis A. Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene. *Mol. Plant.*, 2014, 7(1), 71–86. doi: 10.1093/mp/sst134
5. Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu. Rev. Genet.*, 2003, 37, 3–29. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.142807
6. Harshey R.M. Transposable Phage Mu. *Microbiol. Spectr.*, 2014, 2(5). doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0007-2014.
7. Link A.J., Phillips D., Church G.M. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.*, 1997, 179(20), 6228–6237.
8. Gu P., Yang F., Su T., et al. U. A rapid and reliable strategy for chromosomal integration of gene(s) with multiple copies. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 9684. doi: 10.1038/srep09684

9. Haldimann A., Wanner B.L. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J. Bacteriol.*, 2001, 183, 6384–6393. doi: 10.1128/JB.183.21.6384-6393.2001
10. Huang L.-C., Wood E.A., Cox M.M. Convenient and reversible site-specific targeting of exogenous DNA into a bacterial chromosome by use of the FLP recombinase: the FLIRT system. *J. Bacteriol.*, 1997, 179(19), 6076–6083.
11. Cregg J.M., Madden K.R. Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Molecular and General Genetics MGG*, 1989, 219, 320–323. doi: 10.1007/BF00261194
12. Albert H., Dale, E.C. Lee E., Ow D.W. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J.*, 1995, 7, 649–659. doi: 10.1046/j.1365-313X.1995.7040649.x
13. Hoess R.H., Wierzbicki A., Abremski K. The role of the loxP spacer region in PI site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14(5), 2287–2300. doi: 10.1093/nar/14.5.2287
14. Lambert J.M., Bongers R.S., Kleerebezem M. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73, 1126–1135. doi: 10.1128/AEM.01473-06
15. Peredelchuk M.Y., Bennett G.N. A method for construction of *E. coli* strains with multiple DNA insertions in the chromosome. *Gene*, 1997, 187, 231–238. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00760-3 doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06976.x
16. Каташкина Ж. И., Скороходова А. Ю., Зименков Д. В., и др. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме. *Молекулярная биология*. 2005, 39(5), 823–831.
17. Minaeva N.I., Gak E.R., Zimenkov D.V., et al. U. 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
18. Hara Y., Kadotani N., Izui H., et al. U. The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ13355, an organism with great biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93, 331–341. doi: 10.1007/s00253-011-3713-5
19. Katashkina J.I., Hara Y., Golubeva L.I., et al. U. Use of the lambda Red-recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis*. *BMC Mol. Biol.*, 2009, 10, 34. doi: 10.1186/1471-2199-10-34
20. Izui H., Hara Y., Sato M., Akiyoshi N. Method for producing L-glutamic acid. *United States Patent*. 2003, 6596517.
21. Takumi K., Ziyatdinov M.K., Samsonov V., Nonaka G. Fermentative Production of Cysteine by *Pantoea ananatis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2017, 83(5). doi: 10.1128/AEM.02502-16.
22. Yoon S.H., Lee S.H., Das A., et al. U. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of beta-carotene in *E. coli*. *J Biotechnol.*, 2009, 140(3-4), 218–226. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.01.008
23. Zurbruggen A., Kirst H., Melis A. Isoprene production via the mevalonic acid pathway in *Escherichia coli* (bacteria). *Bioenerg. Res.*, 2012, doi: 10.1007/s12155-012-9192-4
24. Tajima Y., Nishio Y., Katashkina J.Y., Bylino O.V. Method of producing isoprene compound. *Patent*, 2016, WO2016084963(A1).
25. Mihara Y., Rachi H., Nishio Y., et al. U. Method of producing isoprene monomer. *Patent*, 2015, US2015275233(A1).
26. Машко С. В., Скороходова А. Ю., Зименков Д. В., и др. Использование метаболической регуляции для оптимизации экспрессии генов в бактериальных клетках – новое направление биотехнологии XXI века. *Биотехнология*, 2002, (4), 3–14.
27. Martin V.J., Pitera D.J., Withers S.T., et al. U. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21(7), 796–802. doi: 10.1038/nbt833
28. Kizer L., Pitera D.J., Pfleger B.F., Keasling J.D. Application of functional genomics to pathway optimization for increased isoprenoid production. *Appl Environ Microb*, 2008, 74(10), 3229–3241
29. Primak Y.A., Du M., Miller M.C., et al. U. Characterization of a feed-back resistant mevalonate kinase from the archaeon *Methanosarcina mazei*. *Appl. Env. Microbiol.*, 2011, 77(21), 7772–7778. doi: 10.1128/AEM.05761-11
30. Kazieva E., Yamamoto Y., Tajima Y., et al. U. Characterization of feedback-resistant mevalonate kinases from the methanogenic archaeons *Methanosaeta concilii* and *Methanocella paludicola*. *Microbiology*, 2017, 163(9), 1283–1291. doi: 10.1099/mic.0.000510
31. Sanchez M.C., Krasnec K.V., Parra A.S., et al. U. Effect of praziquantel on the differential expression of mouse hepatic genes and parasite ATP binding cassette transporter gene family members during *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2017, 11(6), e0005691. doi: 10.1371/journal.pntd.0005691
32. George K.W., Thompson M.G., Kim J., et al. U. Integrated analysis of isopentenyl pyrophosphate (IPP) toxicity in isoprenoid-producing *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, 2018, 47, 60–72. doi: 10.1016/j.ymben.2018.03.004
33. Berthelot K., Estevez Y., Deffieux A., Peruch F. Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochim.*, 2012, 94(8), 1621–1634. doi: 10.1016/j.biochi.2012.03.021
34. Arraiano C.M., Maquat L.E. Post-transcriptional control of gene expression: effectors of mRNA decay. *Mol. Microbiol.*, 2003, 49, 267–276. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03545.x

35. de Smit M.H., van Dui J. Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*. A quantitative analysis of literature data. *J. Mol. Biol.*, 1994, 244, 144–150.
36. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1951, 62, 293–300.
37. Hayashi Y., Harada M., Takaoka S., et al. Isoprene synthase and polynucleotide encoding same, and method for producing isoprene monomer. 2013. WO2013179722A1
38. Herrero M., de Lorenzo V., Timmis K.N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 1990, 172 (11), 6557–6567.
39. Andreeva I.G., Golubeva L.I., Kuvaeva T.M., et al. 2011. Identification of *Pantoea ananatis* gene encoding membrane pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase and *pqqABCDEF* operon essential for PQQ biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011, 318(1), 55–60. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02240.x
40. Zimenkov D.V., A.Yu. Skorokhodova, Zh. I. Katashkina, et al. *E. Coli* chromosome regions that are more preferable for gene insertion, when the phage mu-driven system is used for integration. *Biotekhnologiya*, 2004, (6), 3–18.
41. Block D.H.S., Hussein R., Liang L.W., Lim H.N. Regulatory consequences of gene translocation in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40(18), 8979–8992. doi: 10.1093/nar/gks694
42. Schüte H., Flossdorf J., Sahm H., Kula M.R. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.*, 1976, 62(1), 151–160.
43. Dalwadi M.P., Garavaglia M., Webb J.P., et al. U. Applying asymptotic methods to synthetic biology: Modelling the reaction kinetics of the mevalonate pathway. *J. Theor. Biol.* 2018, 439, 39–49. doi: 10.1016/j.jtbi.2017.11.022
44. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 1990, 185, 60–89.
45. 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.

## Balanced Amplification of Mevalonate Pathway Genes Increased Isoprene Production by *Pantoea ananatis* Recombinant Strain

J.I. KATASHKINA<sup>1</sup>, E.D. KAZIEVA\*<sup>1</sup>, Y. TAJIMA<sup>2</sup>, and S.V. MASHKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Closed Joint-Stock Company Ajinomoto-Genetika Research Institute (AGRI), 117545 Moscow Russia

<sup>2</sup>Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc., 210-8681, Kawasaki-ku, Kawasaki Japan

\*e-mail: ekaterina\_kazieva@agri.ru

Received December 11, 2018

Revised February 08, 2019

Accepted March 15, 2019

**Abstract**—Uncoordinated expression of a target biosynthetic pathway often results in low growth and productivity of a producing strain due to the accumulation of toxic metabolic intermediates. In this study, we report an increase in the isoprene accumulation by an engineered strain of *Pantoea ananatis* possessing foreign artificial mevalonate pathway genes. It was achieved owing to a simultaneous  $\phi 80$ -independent integration of a mixture of conditionally replicated plasmids carrying the genes for the upper and lower mevalonate pathways and for mevalonate kinase followed by the selection according to isoprene accumulation of clones with optimal copy numbers of the integrative cassettes. The previously developed Dual In/Out method was modified to accelerate constructing of the recipient strains containing several *attB* sites of  $\phi 80$  phage in their genomes.

**Keywords:** coordinated expression, Dual In/Out method, mevalonate pathway, *Pantoea ananatis*, isoprene, integration of heterologous pathway.

**Acknowledgements**—The authors are extremely grateful to Dr. A.D. Kivero (CJSC AGRI) for the valuable comments while working with analytical equipment. The authors express their appreciation of Dr. Uehara (Nagai) Yuri for the fruitful cooperation and coordination of the joint work.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-2-3-15