

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА»
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
"КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ"
БИОРЕСУРСНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ
ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

На правах рукописи



ХОЗОВ
Андрей Александрович

**Исследование механизма транспорта L-треонина и L-серина
через цитоплазматическую мембрану *Escherichia coli* K-12**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
Доктор биологических наук, профессор
Нетрусов Александр Иванович

Кандидат биологических наук
Бубнов Дмитрий Михайлович

Москва

2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Общая характеристика бактериальных транспортных систем	14
1.1.1 Пассивный транспорт	16
1.1.2 Активный транспорт	18
1.2 Транспорт гидроксикаминокислот в клетку <i>E. coli</i>	30
1.2.1 TdcC – транспортер L-серина и L-треонина в симпорте с H^+	33
1.2.2 SstT – транспортер L-серина и L-треонина в симпорте с Na^+	35
1.2.3 SdaC – транспортер L-серина в симпорте с H^+	38
1.3 Регуляция транскрипции и трансляции транспортных белков	40
1.3.1 Глобальный регулятор лейцинового ответа Lrp	40
1.3.2 Регуляция посредством РНК	42
1.3.3 Hfq: медиатор активности мРНК	44
1.4 Биотехнологический аспект изучения транспорта аминокислот	45
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1 Среды и реагенты	49
2.2 Ферменты и наборы	49
2.3 Олигонуклеотиды	50
2.4 Бактериальные штаммы и плазмиды	50
2.5 Выделение тотальной ДНК из <i>Escherichia coli</i>	56
2.6 Приготовление электрокомпетентных клеток	56
2.7 Электропорация	57
2.8 Получение интегративных кассет	57
2.9 λ Red-зависимая интегративная трансформация	58

2.10 Удаление селективных маркеров из хромосомы посредством сайт-специфической системы рекомбинации фага λ	59
2.11 Общая неспецифическая трансдукция фагом P1	60
2.12 Электрофорез ДНК в агарозном геле	61
2.13 Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля	61
2.14 Конструирование геномной библиотеки.....	61
2.15 Секвенирование вставок хромосомной ДНК и хромосомы <i>E. coli</i>	63
2.16 Фенотипические тесты.....	63
2.17 Измерение активности поглощения аминокислот	64
2.18 Исследование активности промоторов.....	66
2.19 Сравнение активностей промоторов и RBS <i>in silico</i>	67
2.20 Структурное моделирование и визуализация белков	67
2.21 Филогенетический анализ последовательностей транспортных белков	68
2.22 Оценка способности штаммов к биосинтезу треонина	68
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	70
3.1 Поиск нового переносчика L-треонина.....	70
3.2 Исследования активности транспорта YifK, BrnQ и LIV-I по отношению к L-треонину и L-серину <i>in vitro</i>	80
3.2.1 YifK – H ⁺ -зависимый высокоаффинный переносчик L-треонина и L-серина.....	85
3.2.2 Активность LIV-I по отношению к L-серину.....	94
3.3 Механизмы поглощения L-треонина при нефизиологичных концентрациях субстрата в среде	96
3.3.1 Скрининг многокопийных супрессоров дефекта по транспорту L-треонина, вызванного инактивацией SstT, TdcC, YifK, LIV-I и BrnQ ..	96

3.3.2 Хромосомные супрессии дефекта по транспорту L-треонина	102
3.3.3 Исследование конкурентного ингибирования транспорта L-треонина	110
3.4 Исследование влияния аллельного состояния найденных генов на накопление L-треонина штаммом-продуцентом.....	112
3.4.1 Лизин-специфичный переносчик LysP – скрытая мишень для улучшения свойств штамма-продуцента L-треонина.....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ	126
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	127
ПРИЛОЖЕНИЯ	160
<i>Приложение 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе.....</i>	<i>160</i>
<i>Приложение 2. Конструирование штаммов, использованных в работе ..</i>	<i>162</i>
<i>Приложение 3. Конструирование плазмид, использованных в работе</i>	<i>165</i>
<i>Приложение 4. Патенты на изобретение, полученные по результатам настоящей работы</i>	<i>166</i>

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная оболочка является первичным барьером на пути поступления различных молекул в бактериальную клетку. У грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*) она включает внешнюю и внутреннюю цитоплазматическую мембрану (ЦПМ), а также периплазматическое пространство. По оценкам, около 20% открытых рамок считывания (ORF) *E. coli* кодируют белки, так или иначе связанные с ЦПМ (Boyd et al., 1998). Ввиду особенности строения и избирательной проницаемости ЦПМ, транспорт растворенных веществ через мембрану осуществляется с участием специализированных белков-транспортёров, или пермеаз. В настоящее время идентифицировано более 480 белков-переносчиков, что составляет около 11% от общего числа известных белков в клетках *E. coli* (Keseler et al., 2021). Различные пермеазы отличаются друг от друга по механизму и энергизации процесса транспорта, а также субстратной специфичностью (Saier et al., 2021). Несмотря на активное исследование транспортных механизмов в течение нескольких последних десятилетий, в промежуток между 2013 и 2021 годами, в клетке *E. coli* было найдено и описано 23 новых переносчика (Keseler et al., 2021). Интерес к поиску новых транспортных систем способствует тот факт, что геном *E. coli* все еще содержит несколько сотен неохарактеризованных «у»-генов (Ghatak et al., 2019). Среди них, на основании аминокислотной последовательности и предсказанной структуры, большую часть составляют мембранные белки-транспортёры с неизвестной субстратной специфичностью и функцией.

Исследование бактериальных транспортных систем преследует несколько целей. Во-первых, изучение механизмов трансмембранного транспорта в клетках бактерий является ключом к пониманию физиологических особенностей клетки, а также взаимодействия ее метаболических и регуляторных путей с внешней средой. Например, одна из основополагающих теорий образования АТФ путем окислительного фосфорилирования, за которую в 1978 году Питер Митчелл получил

Нобелевскую премию по химии (Roskoski, 2004), была во многом основана на результатах исследований механизма транспорта лактозы в клетках *E. coli*. В одной из своих совместных работ с Уэстом авторы пришли к выводу, что скорость поступления C^{14} -лактозы в клетку *E. coli* коррелирует со скоростью одновременного поступления H^+ (West and Mitchell, 1973; West, 1980). В дальнейшем его гипотеза была подтверждена открытием АТФ-синтазы, за которое в 1997 году Пол Делос Бойер, Джоном Э. и Йенсом К. Скоу также были награждены Нобелевской премией по химии (Shampo et al., 2011). АТФ-синтаза — это мембраносвязанный белок, относящийся к системе первичного транспорта, который использует потенциальную энергию электрохимического градиента для синтеза АТФ (Negrin et al., 1980). Таким образом знания, полученные в ходе изучения транспорта метаболитов, позволили описать один из важнейших физиологических процессов в живых системах.

Помимо вклада в фундаментальные исследования микробной физиологии, понимание механизмов транспорта растворенных веществ дает нам представление о возникновении и протекании различных болезней. В этом отношении особый интерес представляет изучение транспорта аминокислот. Так, при исследовании факторов вирулентности возбудителя чумы *Yersinia pestis* (*Y. pestis*) было показано, что активность транспортной системы BrnQ, опосредующей поглощение аминокислот с разветвленной цепью (ВСАА) L-лейцина, L-изолейцина и L-валина, абсолютно необходима для развития инфекции у мышей. Более того, мутантный штамм *Y. pestis* несущий делецию в гене *brnQ* вызывает иммунный ответ, предохраняющий животное от заражения исходным штаммом (Palace et al., 2014). Сходным образом способность потреблять из окружающей среды ВСАА оказывает влияние на патогенность возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) (Dutta et al., 2022). Авторы исследования показали, что инактивация переносчика ВСАА BrnQ3 приводит к значительному снижению вирулентности *B. Anthracis*. Так, девять из десяти подопытных мышей,

инфицированных *B. anthracis* с инактивированным геном *brnQ3*, выжили и не проявляли признаков заболевания. Другим примером может служить аминокислота L-пролин и ее роль во взаимодействии между патогенами и хозяевами (Christgen and Becker, 2019). Транспорт пролина абсолютно необходим для выживания и роста *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) при инфицировании человека (Schwan and Wetzel, 2016). Авторы установили, что экспрессия основного переносчика пролина *putP* активируется при низком уровне пролина и в условиях высокого осмотического давления как в мышинных, так и человеческих системах (Schwan et al., 2006). Считается, что PutP играет ключевую роль на ранних стадиях инфекционного процесса, способствуя адаптации патогена к условиям высокой осмолярности в организме хозяина (Schwan et al., 2004, 2006; Schwan and Wetzel, 2016). Другой патоген, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), возбудитель воспаления и рака желудка (Suerbaum and Josenhans, 2007), нуждается в PutP для успешной колонизации желудка монгольских песчанок *Mongolian gerbils* (Kavermann et al., 2003). Поскольку клетки *H. pylori* способны использовать пролин в качестве источника углерода, азота и энергии, активность PutP, по-видимому, имеет важное значение для выживания бактерий в желудке (Christgen and Becker, 2019). Эта идея подтверждается наблюдением, что *H. pylori* успешно колонизирует желудочную ткань человека, богатую пролином. Учитывая роль пролина для жизнеспособности клеток, нарушение его поглощения вследствие инактивации переносчика PutP снижает вирулентность различных патогенов, включая *Vibrio cholerae*, *S. aureus* и *H. pylori* (Jung et al., 2012). Таким образом, исследования мембранных переносчиков аминокислот имеют важное значение для клинической практики, в частности, для разработки новых стратегий борьбы с бактериальными инфекциями. Эти стратегии могут включать создание новых противомикробных препаратов, улучшение методов доставки лекарств, а также разработку рекомбинантных штаммов, которые могут быть использованы в качестве живых вакцин.

Наконец, исследование механизмов транспорта метаболитов особенно актуально для промышленной биотехнологии. Развитие микробиологической промышленности способствовало созданию высокоэффективных штаммов-продуцентов аминокислот, органических кислот, витаминов, каротиноидов и других экономически значимых продуктов (Kruse et al., 2002; Livshits et al., 2003; Park et al., 2007; Wang et al., 2021a). Особенно заметный рост наблюдается в области микробиологического производства незаменимых аминокислот, в частности L-треонина, что обусловлено его широким применением в сельском хозяйстве (Debabov, 2003; Li et al., 2021). Добавление треонина в ежедневный рацион откормочным птицам и свиньям играет ключевую роль в поддержании оптимального белкового баланса, способствуя более эффективному усвоению питательных веществ и укреплению здоровья кишечника. В свою очередь, это оказывает положительное влияние на общий физиологический статус животных, повышая их продуктивность, ускоряя прирост массы тела и укрепляя иммунную систему (Nichols et al., 2022). Одним из ключевых этапов создания предприятия по микробиологическому производству треонина является конструирование штамма-продуцента этой аминокислоты. Многие научные группы работают над поиском нетривиальных способов улучшения свойств штаммов продуцентов и на сегодняшний день известно, что продуктивность штаммов обратно пропорциональна активности транспорта конечного продукта в клетку. В связи с этим, при оптимизации продуцентов, стараются заблокировать все пути поступления продукта в клетку (Li et al., 2021). Вместе с тем в ряде работ имеются убедительные доказательства существования в *E. coli* все еще неидентифицированной и неохарактеризованной транспортной системы треонина, активность которой ингибируется избытком серина (Kruse et al., 2001). Основываясь на этих данных, и продолжая работу по изучению механизмов транспорта аминокислот в клетках *E. coli*, настоящая работа посвящена поиску и описанию ранее неидентифицированных генов, контролирующих захват треонина и серина.

Актуальность исследования определяется как его вкладом в фундаментальное понимание физиологии *E. coli*, так и возможностью практического использования полученных результатов в промышленной биотехнологии. Ввиду того, что *E. coli* является ключевым модельным объектом, знания о её биологии служат основой для изучения других микроорганизмов, включая патогенов, ответственных за тяжелые инфекционные заболевания. Исследование механизмов мембранного транспорта позволяет не только глубже понять взаимодействие патогена с организмом хозяина, но и может способствовать разработке новых методов целенаправленной антимикробной терапии, а также созданию рекомбинантных штаммов, пригодных для использования в качестве живых вакцин. Кроме того, поиск ранее неописанных транспортных систем треонина является актуальной задачей в контексте задач промышленной биотехнологии, поскольку манипулирование транспортными системами целевой молекулы с целью предотвращения ее повторного захвата из культуральной среды способствует улучшению свойств штамма-продуцента и является одной из ключевых стадий его конструирования.

Цель работы: исследование механизмов транспорта L-треонина и L-серина через цитоплазматическую мембрану в клетку *E. coli* K-12.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Идентифицировать прежде неописанные гены, контролирующие транспорт L-треонина и/или L-серина через цитоплазматическую мембрану в клетку *E. coli*.
2. Проанализировать влияние аллельного состояния найденных генов на способность клеток *E. coli* к потреблению гидроксиаминокислот из питательной среды.
3. Исследовать субстратную специфичность выявленных переносчиков и определить их кинетические параметры по отношению к соответствующим субстратам.

4. Выявить механизм энергетического сопряжения транспорта субстратов, характерный для идентифицированных транспортных систем.
5. Исследовать механизмы регуляции экспрессии идентифицированных транспортных систем.
6. Проанализировать влияние аллельного состояния найденных генов на свойства штамма-продуцента L-треонина.

Научная новизна работы

В ходе проведенной работы был идентифицирован и охарактеризован ранее неописанный ген *yifK*. Было показано, что его продукт является транспортной системой, специфичной по отношению к L-треонину и L-серину, а также был установлен механизм энергетического сопряжения транспортного процесса. Определены кинетические параметры YifK, такие как K_M и V_{max} , для обеих аминокислот. Выявлены основные закономерности регуляции экспрессии и транспортной активности переносчика. Помимо этого, была прямо показана активность переносчиков аминокислот с разветвленным радикалом BrnQ и LIV-I по отношению к L-треонину, для которых эта функция ранее не была известна. Кроме того, было показано, что LIV-I обладает активностью по отношению к L-серину.

Снижение специфической транспортной активности по отношению к треонину в результате инактивации основных переносчиков SstT, TdcC, YifK, BrnQ и LIV-I позволило идентифицировать 10 генов, которые, будучи амплифицированными на многокопийном векторе или в результате специфической мутации, способны супрессировать дефект по транспорту треонина в клетку.

Наконец, было продемонстрировано, что инактивация YifK, BrnQ, SdaC, YhjE, а также лизин-специфичного переносчика LysP, приводит к значительному увеличению способности штамма-продуцента *E. coli* к накоплению экзогенного треонина. Этот подход может быть использован для улучшения свойств штамма-продуцента L-треонина.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе настоящего исследования результаты дают законченную картину механизмов транспорта гидроксиаминокислот через цитоплазматическую мембрану в клетки *E. coli*, углубляя наше понимание физиологии микроорганизмов и механизмов взаимодействия их метаболических и регуляторных путей с внешней средой. Результаты исследования *у-генов*, многокопийных супрессоров дефекта транспорта треонина, способствуют сужению спектра их физиологически релевантных субстратов, что может быть полезно для их дальнейшей идентификации. Полученные данные могут быть использованы при изучении физиологии родственных *E. coli* бактерий, в том числе и патогенов, что может способствовать развитию новых стратегий антимикробной терапии.

Результаты настоящей работы имеют практическую ценность для промышленной биотехнологии, в частности для рационального конструирования штаммов-продуцентов аминокислот, позволяя оптимизировать их транспортные системы с целью повышения продуктивности и эффективности биосинтеза треонина.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования служила *Escherichia coli* K-12, тогда как предметом исследования были механизмы транспорта L-треонина и L-серина через цитоплазматическую мембрану.

Методология диссертационного исследования

В работе были использованы стандартные методы работы с культурами микроорганизмов и бактериофагов, а также методы молекулярного клонирования и биохимического исследования транспорта растворенных веществ.

Личный вклад автора заключается в выборе направлений исследования, дизайне, планировании и выполнении экспериментов, анализе

и интерпретации результатов, подготовке публикаций и диссертации и представлении результатов работы на конференциях.

Степень достоверности полученных данных подтверждается использованием современных общепринятых экспериментальных методик, актуальных методов анализа и статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту

1. YifK осуществляет протон-зависимый симпорт L-треонина и L-серина из среды в клетку *E. coli*.
2. Система транспорта LIV-I участвует в поглощении L-треонина.
3. Система транспорта аминокислот с разветвленным радикалом BrnQ принимает участие в потреблении L-треонина, однако обладает меньшей специфичностью по сравнению с YifK и LIV-I.
4. Гены *yhjE*, *yjeM*, *ydgI*, *ychE*, *yqeG*, *sdaC*, *alaE* и *proP* способны супрессировать дефект по транспорту L-треонина, будучи амплифицированными на многокопийной плазмиде, что свидетельствует о способности соответствующих белков переносить L-треонин. Мембранные белки MarC и CysA приобретают активность по отношению к L-треонину в результате специфических аминокислотных замен.
5. Инактивация YifK, SdaC, BrnQ, YhjE и LysP положительно сказывается на способности штамма-продуцента *E. coli* к накоплению L-треонина.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы опубликованы в высокорейтинговых журналах. Помимо этого, по результатам работы были получены патенты РФ на изобретение. Автором были сделаны доклады на конференциях: VIII Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Саратов, 2024), а также на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2023).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, среди которых 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова и 3 патента РФ на изобретение. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Структура работы

Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», «Приложения». Работа изложена на 166 страницах, содержит 6 таблиц, 27 рисунков и 4 приложения. Список литературы включает 290 источников.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. Бубнову Д.М. за помощь в планировании экспериментов, обсуждении и оформлении результатов, подготовке публикаций и диссертации. Автор благодарит научного руководителя д.б.н. Нетрусова А.И. за руководство и помощь в подготовке диссертации. Автор признателен д.б.н. Синеокому С.П. за помощь в материальном обеспечении исследования, а также Выборной Т.В., Степановой А.А. и Кудине М.Д. за помощь в выполнении работы. Автор благодарит к.б.н. Алексееву Н.В., д.х.н. Чернышеву М.Г. и к.х.н. Бадун Г.А. за помощь в измерении накопления меченых аминокислот в клетках *Escherichia coli*.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика бактериальных транспортных систем

Транспорт растворенных веществ через клеточную мембрану — это один из основополагающих процессов, обеспечивающих жизнедеятельность микроорганизмов. Каждый живой организм развивается в условиях динамичной внешней среды, что требует строгого контроля за тем, какие вещества попадают в клетку и какие удаляются из неё. Мембранный транспорт эффективно регулирует концентрацию ионов, таких как водород (H^+), калий (K^+), натрий (Na^+), кальций (Ca^{2+}), что позволяет поддерживать внутренний химический баланс клетки и избегать гипер- и гипоосмотического стресса (Stautz et al., 2021). Поскольку бактериальная клетка не может синтезировать все необходимые вещества самостоятельно, некоторые из них должны поступать из внешней среды через мембрану. Перенос питательных веществ — важнейший механизм, который позволяет поддерживать метаболизм, а также синтез белков, нуклеиновых кислот и других необходимых молекул (Jeckelmann et al., 2020). Многие бактерии образуют органические кислоты и другие токсичные соединения. Для предотвращения их накопления бактерии используют различные механизмы секреции, которые позволяют удалять эти вещества из цитозоля клетки (Sun et al., 2014). Микроорганизмы часто сталкиваются с экстремальными условиями, такими как изменение температуры, солёность, кислородный голод. В ответ на эти изменения они должны быть способны адаптироваться, и транспорт веществ через мембрану играет одну из ключевых ролей в этом механизме (Njenga et al., 2023). Все описанные процессы, будучи взаимосвязанными, поддерживают стабильность внутренней среды клетки и обеспечивают её выживаемость в изменяющихся условиях окружающей среды.

Бактериальные транспортные системы исторически ассоциируются с идеей о том, что пересечение клеточной мембраны осуществляется с помощью специализированных белков. Первоначально такая идея противоречила господствовавшему взгляду, согласно которому решающее значение для

транспорта имела проницаемость самой мембраны. Концепция существования специализированных транспортных белков получила широкое распространение и признание в первую очередь благодаря открытию новых методов молекулярной биологии и генной инженерии, например, методологии конструирования рекомбинантных плазмид и сайт-направленного мутагенеза, позволяющей анализировать и контролировать биосинтез мембранных белков (Cohen and Monod, 1957; Cohen et al., 1973).

На сегодняшний день достоверно известно, что все бактериальные транспортные системы так или иначе ассоциированы с клеточной мембраной. Цитоплазма бактерий отделена от окружающей среды клеточной оболочкой, состоящей из нескольких слоев. Самый внутренний слой - ЦПМ, присутствует у всех бактерий и является основной границей между цитоплазмой и окружающей средой. ЦПМ состоит из фосфолипидного бислоя, каждый из которых содержит два длинных гидрофобных углеводородных «хвоста», связанных с заряженной гидрофильной «головой». При образовании ЦПМ гидрофобные участки молекул оказываются обращены внутрь мембраны, а гидрофильные — наружу, с обеих внешних сторон мембраны. Таким образом, гидрофильные растворенные вещества не могут свободно пересекать ЦПМ ввиду наличия у нее гидрофобного ядра. Эта проблема решается с помощью специализированных мембранных белков, присутствующих в ЦПМ.

Механизм транспорта и энергетического сопряжения представляет собой основополагающий критерий для классификации переносчиков. Выделяют два основных механизма транспорта растворенных веществ: диффузия и активный транспорт. Диффузия, в свою очередь, подразделяется на пассивную и облегченную, а активный транспорт на первичный и вторичный. Большинство известных транспортных белков представлено и подробно описано в базе данных транспортеров (ТС) <http://www.tcdb.org/> (Saier et al., 2021). В этой базе все транспортеры подразделяются на шесть основных суперклассов: каналы/поры (ТС #1.), переносчики, зависящие от электрохимического потенциала (ТС #2.),

первичные активные транспортёры (ТС #3.), групповые транслокаторы (ТС #4.), трансмембранные электронные переносчики (ТС #5.), а также неполностью охарактеризованные транспортные системы и вспомогательные факторы (ТС #6.), (Saier et al., 2021).

1.1.1 Пассивный транспорт

Самый простой механизм, с помощью которого вещества могут пересекать плазматическую мембрану, — это пассивная диффузия. При пассивной диффузии молекула растворяется в фосфолипидном бислое, диффундирует через него и оказывается по другую сторону мембраны (Cooper, 2000). В этом процессе не участвуют мембранные белки, а направление переноса определяется концентрационным градиентом субстрата внутри и снаружи клетки. Поток молекул всегда направлен по градиенту концентрации - из области с высокой в область с более низкой. Таким образом, пассивная диффузия — это неизбирательный процесс, в результате которого любая молекула, способная раствориться в фосфолипидном бислое, может пересечь плазматическую мембрану.

Важно отметить, что только относительно гидрофобные вещества способны свободно диффундировать через фосфолипидный бислой ЦПМ. Большинство молекул все же нуждаются во вспомогательных факторах для преодоления гидрофобного ядра мембраны. В этом случае может протекать облегченная диффузия: молекула субстрата также перемещается в любом направлении в зависимости от концентрационного градиента, однако пересечение плазматической мембраны осуществляется через специализированный белковый канал, образующий гидрофильный туннель в мембране. Примером таких молекул являются полярные вещества, аминокислоты и моносахариды, а также заряженные частицы, например ионы. Несмотря на наличие концентрационного градиента и для этих веществ, они не способны самостоятельно пересечь фосфолипидный бислой мембраны из-за своей полярности или электрического заряда. В облегчённой диффузии

участвуют два основных класса белков: белковые каналы α - и β -типов (Stillwell, 2013).

Белковые каналы α -типа пронизывают мембрану образуя гидрофильные туннели, которые обеспечивают избирательный транспорт молекул. Эти каналы в основном пропускают один тип молекул или несколько близкородственных веществ. Одним из ярких примеров являются аквапорины, которые широко распространены среди всех живых организмов, от прокариот до млекопитающих, и ответственны за высокую скорость транспорта воды через липидный бислой (Tong et al., 2019). Структурно аквапорины напоминают песочные часы и образуют тетрамеры, в которых каждая субъединица содержит центральную пору. Они характеризуются наличием шести трансмембранных α -спиралей, а также двух специфических NPA-мотивов (аспарагин-пролин-аланин), которые и определяют их форму. В узком участке поры располагается остаток аргинина (Arg-189), играющий роль в отторжении заряженных молекул. Помимо своей основной функции, они также участвуют в транспорте других веществ, таких как глицерин, H_2O_2 , мочевины, O_2 и CO_2 . В ряде исследований были найдены аквапорины, обладающие сродством к лактату (Schmidt et al., 2021). Первый идентифицированный бактериальный аквапорин — AqpZ из *E. coli* — играет важную роль в адаптации клеток к гипоосмотическим условиям и способствует быстрому росту в логарифмической фазе (Calamita et al., 1998).

Другой группой белков, участвующих в облегченной диффузии, является β -порины грамотрицательных бактерий, образующие гидрофильные туннели в их внешней мембране. Они представляют собой стабильные тримеры, субъединицей которых является β -баррель. В просвет барреля проникают петли разного размера и заряда (Schulz, 1993; Galdiero et al., 2012). Аминокислоты преодолевают внешнюю мембрану посредством низкоселективных поринов OmpA, OmpC, OmpF и PhoE (Endermann et al., 1978; Benz et al., 1985; Ingham et al., 1990; Sugawara and Nikaido, 1992; Fajardo et al., 1998). В большинстве случаев β -порины не проявляют специфичности к

субстрату. Например, фосфопорин PhoE из *E. coli* имеет сродство к анионам, что обусловлено накоплением положительно заряженных аминокислот в области входа в пору (Benz et al., 1984; Phoenix et al., 1996). Таким образом, PhoE действует не как специфичная транспортная система, а как водный канал, способствующий пассивной диффузии малых молекул массой до ~600 Да. Тем не менее, в ходе эволюции некоторые β -порины приобрели способность к селективному транспорту определённых веществ. Ярким примером является мальтопорин LamB, который облегчает прохождение полимеров глюкозы, таких как мальтотриоза, за счёт специфической формы и состава петель, выстилающих β -баррель, что способствует взаимодействию с пиранозным кольцом. β -порины, помимо своей основной функции, участвуют в поддержании осмотического давления в цитозоле и могут служить рецепторами для внешних элементов, таких как фаги, токсины или хелаты. Так, белковый токсин колицин E1, синтезируемый *E. coli* для уничтожения других родственных штаммов, проникает в клетку через канал наружной мембраны TolC, а затем блокирует его основную функцию выведения токсинов и антибиотиков (Budiardjo et al., 2022). Другим примером могут выступать порины FerA и FhuA, которые *E. coli* использует в качестве рецептора для железосодержащего сидерофорного комплекса или гидроксилатов железа (Hollifield and Neilands, 1978; Fiss et al., 1982; Lewis et al., 2023). Структурные исследования β -баррельных поринов, включая LamB, OmpA, OmpC и OmpF из *E. coli* показали, что эти белки демонстрируют сочетание консервативных и высоко вариабельных регионов, особенно в экстрацеллюлярных петлях, что связано с адаптацией к взаимодействию с бактериофагами и другими факторами окружающей среды (Chen et al., 2022).

1.1.2 Активный транспорт

Активный транспорт — это процесс перемещения растворенных веществ против градиента их концентрации, требующий наличия специфических интегральных мембранных транспортных белков и затрат энергии. Активный транспорт имеет несколько основных отличий от

пассивной и облегченной диффузии. Во-первых, активный транспорт осуществляется с затратой энергии, которая поступает либо в результате разрушения макроэргических химических связей, либо за счет трансмембранного ионного градиента, электрохимического потенциала или того и другого. Во-вторых, в процессе активного транспорта, в отличие от пассивной диффузии, белок-переносчик претерпевает ряд выраженных конформационных изменений, которые обычно связаны с перемещением трансмембранных сегментов или доменов. Следовательно, при активном транспорте скорость перемещения субстрата относительно низкая и может достигать до 50000 молекул в секунду. В отличие от активных переносчиков, открытый канал может не требовать каких-либо заметных конформационных изменений и, таким образом, способен пропускать через себя молекулы субстрата со скоростью до 10^8 в секунду, что близко к пределу свободной диффузии (Cooper, 2018). Однако, иногда граница между каналами и активными транспортерами может быть размыта, особенно для каналов с низкой активностью и пермеаз с высокой скоростью перемещения субстрата. В этом случае, между ними можно выделить еще одно ключевое отличие, которое заключается в том, что открытый канал одновременно поддерживает перемещение субстрата в обе стороны липидной мембраны в зависимости от градиента его концентрации, в то время как активные транспортеры способны катализировать перемещение субстратов как по градиенту их концентрации, так и против него (Gadsby, 2009). Транспортный белок, функционирующий по механизму активного транспортера, может переносить как единственный субстрат, так и иметь широкую субстратную специфичность. Сродство переносчика к определенному субстрату характеризуется константой Михаэлиса (K_M): чем выше сродство, тем меньше концентрация, при которой белок связывает субстрат, и, соответственно, ниже K_M (Alberts et al., 2002; Madigan et al., 2019). Среди многочисленного разнообразия активных транспортеров, в зависимости от способа энергизации транспорта, можно выделить несколько основных классов: (1) первично-активные транспортеры

(ТС #3.), (2) вторично-активные транспортеры (ТС #2.) и (3) групповые транслокаторы (ТС #4.).

1.1.2.1 Первичный активный транспорт

Первичный активный транспорт представляет собой процесс перемещения веществ через мембрану против их электрохимического градиента, осуществляемый за счет энергии, высвобождаемой при гидролизе макроэргических связей, например, АТФ. В зависимости от механизма энергетического сопряжения первичные транспортеры подразделяются на пять подклассов.

Первый подкласс (ТС #3.A, P-P-bond-hydrolysis-driven transporters) включает транспортеры, использующие энергию гидролиза дифосфатной (P-P) связи неорганического пирофосфата, АТФ или других нуклеозидтрифосфатов, для перемещения растворенного вещества. Транспортный белок может быть временно фосфорилирован, но субстрат не подвержен фосфорилированию. Этот подкласс охватывает несколько суперсемейств, включая: (1) АТФ-зависимые ABC-транспортеры (ТС #3.A.1), которые сопрягают реакцию переноса растворенного вещества с гидролизом АТФ; (2) F_0F_1 АТФазы (F-, V- или А-типа) (ТС #3.A.2), которые связывают транспорт H^+ или Na^+ в процессе гидролиза или синтеза АТФ (Deckers-Hebestreit and Altendorf, 1996); (3) E_1E_2 АТФазы Р-типа (ТС #3.A.3), которые транспортируют ионы H^+ , Na^+ , K^+ или Mg^{2+} , Ca^{2+} (Chan et al., 2010); (4) секреторные белки Sec (ТС #3.A.5), которые участвуют в процессе секреции белков у прокариот и эукариот.

Второй подкласс (ТС #3.B, Decarboxylation-driven transporters) объединяет транспортные системы, использующие энергию декарбоксилирования цитоплазматического субстрата для переноса ионов. Единственное известное семейство данного подкласса (ТС #3.B.1, The Na^+ -transporting carboxylic acid decarboxylase (NaT-DC) family) опосредует экспорт Na^+ из цитоплазмы за счет декарбоксилирования карбоновых кислот (Boiangiu et al., 2005).

Третий подкласс (ТС #3.C, Methyltransfer-driven transporters) представлен семейством NaT-МММ (ТС #3.C.1, The Na⁺-transporting methyltetrahydromethanopterin:coenzyme-M methyltransferase (NaT-МММ) family), и обнаружен исключительно у архей. Белки этого семейства переносят Na⁺ посредством метилтрансферазной активности.

Четвертый подкласс (ТС #3.D, Oxidoreduction-driven transporters) включает переносчики, контролирующие транспорт ионов за счет энергии, выделяемой в ходе окислительно-восстановительных реакций. Они распространены среди прокариот, а также представлены в эукариотических органеллах, таких как митохондрии и хлоропласты. В этом подклассе можно отметить: (1) никотинамидадениндинуклеотид (НАДН):убихиноновые оксидоредуктазы I-типа (ТС #3.D.1), которые связывают перенос электронов с транспортом протонов (Brandt, 1997) или ионов Na⁺ (Gemperli et al., 2007) и (2) протон-транслоцирующие трансгидрогеназы (ТС #3.D.2), катализирующие трансмембранную транслокацию одного протона в расчете на гидрид-ион, переносимый от НАДН к никотинамидадениндинуклеотидфосфату (НАДФ) (Weston et al., 2002).

К последнему подклассу (ТС #3.E, Light absorption-driven transporters) относятся свето-зависимые транспортёры, использующие свет в качестве источника энергии. Известны свето-зависимые бактерио- и галородопсины, транспортирующие H⁺ или Cl⁻ (Schobert and Lanyi, 1982; Drachev et al., 1987).

Среди всех перечисленных первично-активных транспортеров стоит подробнее остановиться на АТФ-зависимых АВС-переносчиках (ТС #3.A.1), поскольку это одно из крупнейших суперсемейств, представители которого встречаются как в про-, так и эукариотах (Higgins, 1992). Их функции варьируются от поглощения питательных веществ (АВС-импортеры) до экспорта токсичных соединений и придания устойчивости к антибиотикам (АВС-экспортеры). В суперсемействе АВС-транспортеров существует десятки семейств, и, как правило, семейство коррелирует с субстратной специфичностью. АВС-транспортеры состоят из двух интегральных

мембранных субъединиц, формирующих трансмембранный домен с двенадцатью α -спиралями, пронизывающими мембрану, а также двух цитоплазматических нуклеотид-связывающих домена, ответственных за гидролиз АТФ (Beis, 2015). У ABC-импортеров дополнительно присутствуют субстрат-связывающие белки, локализованные в периплазме у грамотрицательных бактерий и на поверхности мембраны у грамположительных бактерий. Эти белки подразделяются на шесть филогенетических кластеров, и они могут взаимодействовать кооперативно при связывании нескольких субстратов (Berntsson et al., 2010).

Состав и механизм работы ABC-переносчиков можно рассмотреть на примере транспортера мальтозы MalEFGK₂ из *E. coli*. Она включает субстрат-связывающий белок MalE, два трансмембранных домена (MalF и MalG) и димерный нуклеотид-связывающий домен MalK (Oldham et al., 2007). В исходном состоянии MalFG образуют канал, ориентированный внутрь клетки. Транспортный цикл начинается, когда связанный с мальтозой MalE взаимодействует с MalFG, что инициирует конформационные изменения и формирование предтранслокационного состояния (Oldham and Chen, 2011). Связывание АТФ приводит к димеризации субъединиц MalK и изменению конфигурации MalFG, высвобождая мальтозу внутрь полости канала (Oldham et al., 2007). Гидролиз АТФ завершает цикл, высвобождая субстрат в цитоплазму и возвращая транспортер в исходное состояние. Ключевой особенностью субстрат-связывающих белков является их чрезвычайно высокое сродство к субстрату, обеспечивающее эффективный транспорт даже при низких концентрациях вещества.

ABC-транспортеры аминокислот подразделяются на два подсемейства: транспортеры, участвующие в поглощении полярных аминокислот (ТС #3.A.1.3, Polar amino acid uptake transporter, ПААТ) и транспортеры, контролирующие перемещение гидрофобных аминокислот (ТС #3.A.1.4, Hydrophobic amino acid uptake transporter, НААТ). Семейство ПААТ является наиболее многочисленным и включает 30 переносчиков, тогда как к НААТ

относится лишь система поглощения аминокислот с разветвленным радикалом LIV в *E. coli* и ее гомологи, такие как Bra в *Pseudomonas* (Hoshino and Kose, 1990a; Saier, 2021).

Одним из наиболее изученных представителей аминокислотных ABC-транспортёров является гистидиновый переносчик HisJQMP (ТС #3.A.1.3.1) из *Salmonella enterica ser. typhimurium*. Это первый ABC-транспортёр, для которого была расшифрована полная нуклеотидная последовательность и определена кристаллическая структура АТФ-связывающей субъединицы (Higgins et al., 1982; Hung et al., 1998). Гистидиновый транспортёр кодируется опероном *hisJQMP*. Ген *hisJ* контролирует синтез субстрат связывающего белка, который имеет сродство к гистидину и аргинину (Ames and Lever, 1972). Дополнительно, клетки синтезируют субстрат-связывающий белок ArgT, имеющий сродство к аргинину, лизину и орнитину. Ген *argT* располагается непосредственно перед *hisJ*, однако транскрипция *hisJQMP* находится под контролем промотора *dhuA*, в то время как *argT* под контролем промотора *argTr* (Stern et al., 1984). Гены *hisQ* и *hisM* кодируют трансмембранные домены (Kerppola et al., 1991; Kerppola and Ames, 1992), а *hisP* отвечает за синтез АТФ-связывающей субъединицы, функционирующей в виде гомодимера в составе мембранного комплекса HisJQMP2 (Nikaido et al., 1997). Механизм работы HisJQMP можно представить следующим образом. В покое димер HisP плотно связан с HisQM. Транспортный цикл инициируется связыванием АТФ с одной из субъединиц HisP, что вызывает его конформационные изменения и частичное отсоединение от мембранного комплекса. Затем, вторая субъединица HisP также связывает АТФ, а HisJ, загруженный гистидином, взаимодействует с комплексом HisQM. Этот процесс вызывает высвобождение первой молекулы АДФ и гидролиз второй молекулы АТФ, что приводит к структурным перестройкам в HisQMP2, открытию канала для транслокации субстрата и его переносу через цитоплазматическую мембрану. После высвобождения субстрата HisJ

диссоциирует, а HisQMP2 возвращается в исходное состояние, готовое к новому циклу (Hosie and Poole, 2001).

1.1.2.2 Вторичный активный транспорт

В результате функционирования первичных активных транспортеров на мембране клеток формируется электрохимический градиент, представляющий собой разность концентраций ионов и электрического потенциала между внутренней и внешней сторонами мембраны. Этот градиент служит источником энергии для вторичных транспортных систем, которые обеспечивают перемещение различных веществ через мембрану. Вторичные транспортеры классифицируются в отдельные семейства на основании сходства их аминокислотных последовательностей и функциональных характеристик (Saier et al., 2021). В отличие от первичных транспортных систем, использующих энергию химических связей, вторично-активные транспортеры осуществляют перенос молекул против градиента их концентрации за счёт сопряжённого движения другого соединения или иона по его электрохимическому градиенту. Таким образом, движущей силой этого процесса является электрохимический потенциал, который определяется либо градиентом концентрации энергизующего субстрата, либо разностью электрических зарядов по обе стороны мембраны. В некоторых случаях, мембрана поддерживает циклический процесс, при котором ион сначала транспортируется внутрь клетки, а затем возвращается наружу в сопряжении с переносом другой молекулы. Этот механизм получил название хемиосмотической цепи (Nicholls, 1992). Вторичные транспортные системы играют ключевую роль в транспорте множества соединений, включая сахара, аминокислоты и неорганические ионы. Как правило, они представлены одним интегральным мембранным белком – пермеазой, формирующей высокоселективный канал для транспортируемых молекул. В зависимости от механизма работы вторичные активные транспортеры подразделяются на два типа: (1) симпортеры, транспортируют растворённое вещество совместно с другим соединением в одном направлении. Например, ряд симпортеров

сопрягает транспорт субстрата с переносом ионов натрия, что позволяет использовать электрохимический градиент натрия для перемещения молекул против их концентрационного градиента; (2) антипортеры, осуществляют обмен двух или более веществ в противоположных направлениях. Антипортный механизм лежит в основе работы различных транспортных систем. Так, Na^+/H^+ антипортер NhaA (TC #2.A.33; The NhaA $\text{Na}^+:\text{H}^+$ antiporter (NhaA) family), присутствующий у *E. coli* и других бактерий, играет важную роль в поддержании внутриклеточного pH за счёт обмена протонов на ионы натрия (Padan and Schuldiner, 1994). Другим примером является антипортер NarK (TC #2.A.1.8.1; The Nitrate/Nitrite porter (NNP) family), который обеспечивает поступление нитрата в клетку в обмен на выведение токсичного нитрита (DeMoss and Hsu, 1991). Среди антипортеров, транспортирующих аминокислоты, можно упомянуть аргинин:агматинный антипортер AdiC (TC #2.A.3.2.5; The amino acid transporter (AAT) family), задействованный в аргинин-зависимой системе кислотоустойчивости *E. coli*. Эта система позволяет бактерии выживать в условиях экстремального кислотного стресса и включает аргининдекарбоксилазу, кодируемую геном *adiA*, и антипортер AdiC, который контролирует обмен внеклеточного аргинина на внутриклеточный продукт его декарбоксилирования – агматин (Richard and Foster, 2004; Fang et al., 2007). Ещё одним примером антипортера является LeuE (TC #2.A.76.1.5; The resistance to homoserine/threonine (RhtB) family), который в *E. coli* осуществляет одновременный экспорт лейцина и захват протонов (Kutukova et al., 2005a).

Класс вторичных транспортеров включает три подкласса, представленных у прокариот. К первому подклассу (TC #2.A; Porters - uniporters, symporters, antiporters) относятся переносчики, осуществляющие симпорт и антипорт широкого круга растворённых веществ. Наиболее обширным суперсемейством данного подкласса является группа MFS (TC #2.A.1; The major facilitator superfamily, MFS), включающая более миллиона секвенированных транспортеров. Большинство белков этого суперсемейства

имеют длину от 400 до 600 аминокислотных остатков и содержат 12, 14 или 24 трансмембранные α -спирали. Пермеазы MFS обладают высокой специфичностью к различным субстратам, включая сахара, полиолы, лекарственные соединения, нейротрансмиттеры, метаболиты цикла Кребса, фосфорилированные интермедиаты гликолиза, аминокислоты, пептиды, осмопротекторы, сидерофоры, нуклеозиды, а также органические и неорганические анионы. Транспортёры суперсемейства MFS встречаются во всех трёх доменах жизни. Несмотря на то, что на сегодняшний день идентифицировано и классифицировано более 100 семейств мембранных транспортеров, ABC-транспортёры и MFS включают почти половину известных систем переноса растворённых веществ. Переносчик лактозы LacY является одним из первых охарактеризованных представителей MFS. Это был первый мембранный белок, ген которого был клонирован и секвенирован (Büchel et al., 1980). К суперсемейству MFS принадлежит множество переносчиков аминокислот, в качестве примера можно привести транспортер ProP, контролирующий поглощение L-пролина, глицин-бетаина и осмопротекторов в симпорте с протоном (MacMillan et al., 1999). Помимо MFS, в первом подклассе вторичных транспортеров присутствует более 20 других суперсемейств, многие из которых участвуют в транспорте аминокислот. Среди них можно выделить: (1) суперсемейство переносчиков аминокислот-полиаминов-органокатионов (TC #2.A.3; The amino acid-polyamine-organocation (APC) superfamily), в которое входят L-лизиновый (LysP) и L-пролиновый (ProY) транспортеры, опосредующие поглощение соответствующих аминокислот в ко-транспорте с протоном; (2) суперсемейство переносчиков растворенных веществ в симпорте с натрием (TC #2.A.21; The solute:sodium symporter (SSS) family). Среди них можно выделить транспортер PutP, катализирующий натрий-зависимое поглощение L-пролина в бактериальных клетках. Этот белок широко распространён среди прокариот, включая археи из порядков *Methanococcales*, *Archaeoglobales*, *Thermococcales*, *Halobacteriales*, а также в грамположительных и

грамотрицательных бактериях (Jung, 2002); (3) Суперсемейство дикарбоксилатных и аминокислотных транспортеров в симпорте с катионами Na^+ или H^+ (TC #2.A.23; The dicarboxylate/amino acid:cation (Na^+ or H^+) symporter (DAACS) family). Представители этой группы обеспечивают поглощение дикарбоксикислот цикла Кребса (малат, сукцинат, фумарат), глутамата, аспартата, небольших нейтральных аминокислот (L-аланина, L-серина, L-цистеина, L-треонина), а также большинства цвиттерионных и двухосновных аминокислот. В *E. coli* одним из представителей DAACS-семейства является транспортер SstT, ответственный за захват L-серина и L-треонина в симпорте с Na^+ (Kim et al., 2002); (4) Семейство транспортеров аланина и глицина в симпорте с Na^+ или H^+ (TC #2.A.25; The alanine or glycine:cation symporter (AGCS) family). Эти белки обнаружены у бактерий и архей. На основании гомологии аминокислотных последовательностей предполагается, что в *E. coli* к этому семейству относится потенциальный транспортер YaaJ, который, вероятно, функционирует как симпортер аланина с натрием (Riley et al., 2006); (5) семейство симпортеров аминокислот с разветвлённой цепью (TC #2.A.26; The branched chain amino acid:cation symporter (LIVCS) family). Охарактеризованные члены этой группы транспортируют три алифатические аминокислоты с разветвлённой цепью — L-лейцин, L-изолейцин и L-валин, функционируя в симпорте с Na^+ или H^+ . В *E. coli* к семейству LIVCS относится неохарактеризованный переносчик BrnQ, который, на основании гомологии с ранее описанным транспортером BrnQ из *Salmonella typhimurium*, вероятно, участвует в поглощении лейцина, валина и изолейцина (Ohnishi et al., 1998).

Два оставшихся подкласса вторичных транспортеров не участвуют в транспорте аминокислот. Ко второму подклассу (TC #2.B; Non-ribosomally Synthesized Porters) относятся нерибосомально синтезированные переносчики. Это особая категория транспортных белков, не синтезируемых рибосомами, а собираемых нерибосомальными пептидсинтазами — ферментами, которые строят молекулы пептидной природы без участия рибосом и матричной РНК.

В качестве примера можно привести антибиотик валиномицин - нерибосомальный циклический депсипептид, который синтезируют бактерии рода *Streptomyces* без участия рибосом, а с помощью ферментативного комплекса NRPS (nonribosomal peptide synthetase) (Huang et al., 2021). Валиномицин действует как ионофор: благодаря своей уникальной структуре он образует внутреннюю полярную полость, точно соответствующую размеру иона калия (K^+), и способен свободно переносить его через клеточную мембрану. Это становится возможным за счёт гидрофобной внешней поверхности молекулы, которая легко встраивается в липидный бислой.

К третьему классу (TC #2.C; Ion-gradient-driven energizers) принадлежит единственное суперсемейство TonB/TolA Family (TC #2.C.1; The TonB-ExbB-ExbD/TolA-TolQ-TolR outer membrane receptor energizers and stabilizers (TonB/TolA) family). У *E. coli* идентифицированы две функционально сходные системы: TonB-ExbB-ExbD и TolA-TolQ-TolR. Ключевые белки этих систем — TonB (239 аминокислотных остатков) и TolA (412 аминокислотных остатков) — не являются гомологичными, несмотря на частичное структурное и функциональное сходство. Система TonB передает протонную движущую силу цитоплазматической мембраны на активные транспортеры внешней мембраны, тем самым обеспечивая источник энергии, необходимый для импорта витамина B_{12} и комплексов железо-сидерофоров (Letain and Postle., 1977). В свою очередь TolA является мембранным компонентом системы Tol-Pal, которая включает группу взаимодействующих белков, охватывающих клеточную оболочку *E. coli* и играет роль в инвагинации внешней мембраны во время деления клетки, а также важна для поддержания целостности внешней мембраны (Hale et al., 2022).

1.1.2.3 Активный транспорт: транслокация групп

Групповые транслокаторы (TC #4; Group translocators) представляют собой последний крупный класс активных транспортеров, осуществляющих не только перенос растворенных веществ через клеточную мембрану, но и их химическую модификацию в процессе транслокации. Такая совокупность

функций отличает групповые транслокаторы от других систем мембранного транспорта и играет важную роль в регуляции клеточного метаболизма. Механизмы химической модификации субстратов включают несколько типов реакций, специфичных для различных подсемейств групповых транслокаторов.

Наиболее изученным является подсемейство PTS (ТС #4.A; phosphotransfer-driven group (PTS) translocators), представители которого у *E. coli*, как и у множества других бактерий, контролируют транспорт сахаров, обеспечивая их одновременную транслокацию через мембрану и фосфорилирование. Помимо этого, PTS участвует в углеродном и азотном обмене, а также выполняет функцию глобального регулятора клеточных процессов, таких как транскрипция и антитерминация, модификация клеточной поверхности и хемотаксис в направлении PTS-специфичных субстратов (Lux et al., 1999; Neumann et al., 2012; Lengeler, 2015). Базовая структура всех PTS-систем схожа у разных видов бактерий, что свидетельствует об их эволюционной значимости. Все PTS-комплексы содержат два универсальных цитоплазматических белка — фермент EI и белок HPr (Jeckelmann and Erni, 2019, 2020; Wang et al., 2021b). Специфичность к субстрату определяется ферментами EII. У *E. coli* идентифицировано 15 различных комплексов EII, отвечающих за транспорт углеводов (Deutscher et al., 2006). Каждый EII-комплекс состоит из трёх-четырёх доменов, обозначаемых EIIA, EIIB, EIIC и EIID. Эти структурные элементы выполняют согласованные функции и отвечают за транспорт и фосфорилирование конкретного углевода (Deutscher et al., 2006; Jeckelmann and Erni, 2020). EIIA и EIIB — участвуют в фосфорилировании субстрата. EIIC — интегральный мембранный белок, обеспечивающий селективный транспорт сахара. EIID, при наличии, выполняет вспомогательные функции в определенных PTS-системах.

Переносчики никотинамид рибонуклеозидов объединены во второе подсемейство групповых транслокаторов (ТС #4.B; Nicotinamide

ribonucleoside uptake transporters) и выполняют ключевую функцию в метаболизме никотинамида, являющегося предшественником никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). Эти транспортные системы обеспечивают захват рибонуклеозида из внеклеточной среды, сопровождающийся его фосфорилированием в процессе транслокации. Особенностью данной группы переносчиков является использование АТФ в качестве донора фосфатной группы. В результате внутриклеточно образуется никотинамидмонопнуклеотид (НМН) и АДФ, что является важным этапом в биосинтезе НАД⁺ (Merdanovic et al., 2005).

Третье подсемейство групповых транслокаторов, распространённых среди прокариот, представлено ацил-КоА-зависимыми транспортерами (ТС #4.C; Acyl-CoA ligase-coupled transporters). Эти белки используют энергию АТФ для этерификации жирных кислот (ЖК) в процессе их переноса через мембрану. Наиболее изученным представителем является семейство FAT (ТС #4.C.1; Fatty acid group translocation), включающее сотни секвенированных гомологов, кодирующих ацил-КоА-лигазы (ацил-КоА-синтазы), карнитин-КоА-лигазы (карнитин-КоА-синтазы) и предполагаемые транспортеры ЖК (Hirsch et al., 1998). Считается, что эти белки катализируют транспорт ЖК посредством работы канала или пермеазы, при этом захват ЖК в цитоплазме сопровождается их ковалентной модификацией за счёт этерификации. В частности, исследования показали, что ацил-КоА-синтетаза ЖК в дрожжевых клетках, функционирует как компонент унипортной системы, обеспечивающей импорт и активацию экзогенных ЖК (Saier and Kollman, 1999; Faergeman et al., 2001).

1.2 Транспорт гидроксиаминокислот в клетку *E. coli*

Системы транспорта аминокислот широко распространены в прокариотических и эукариотических клетках. Краткое описание многих из них уже было представлено в настоящей работе. Физиологическое преимущество наличия специализированных систем транспорта аминокислот в бактериальных клетках очевидно. С одной стороны, бактерии могут

использовать доступные извне аминокислоты непосредственно для синтеза белка, не затрачивая энергию на биосинтез, а с другой, поступившие извне аминокислоты могут быть катаболизированы, служа источником углерода, энергии и/или азота. Аминокислоты, содержащие одну или несколько гидроксильных (-ОН) групп в боковой цепи, объединяют в группу гидроксиаминокислот. К этой группе относятся серин, треонин и гомосерин.

Несмотря на то, что настоящая работа посвящена изучению механизмов поглощения L-треонина и L-серина, целесообразно в общих чертах рассмотреть и системы, обеспечивающие экспорт этих аминокислот. В *E. coli* транспортными системами, контролирующими экспорт L-треонина из клетки, являются белки RhtA, RhtB и RhtC. Указанные переносчики были идентифицированы на основании фенотипа устойчивости клеток к L-треонину и L-гомосерину при их оверэкспрессии, что свидетельствовало об активном выбросе из клеток данных соединений (Aleshin et al., 1999; Zakataeva et al., 1999; Livshits et al., 2003). Транспортёры RhtB и RhtC относятся к семейству RhtB (TC #2.A.76; Resistance to Homoserine/Threonine (RhtB) Family), представленному в геноме *E. coli* рядом других белков, включая YfiK, YahN и YeaS (Franke et al., 2003; Kutukova et al., 2005a). Транспортёры семейства RhtB опосредуют экспорт L-треонина, а также структурно схожих аминокислот, в частности L-гомосерина. Особого внимания заслуживает экспортер RhtA, первоначально аннотированный как ORF *ybiF* (Livshits et al., 2003). Авторы исследования показали, что *rhtA* кодирует мембранный белок, участвующий в экспорте как L-треонина, так и L-гомосерина и, предположительно, функционирует в качестве протон-зависимого антипортёра. Геном *E. coli* по меньшей мере содержит десять паралогов *rhtA* (Livshits et al., 2003), формирующих крупное семейство мембранных белков, относимое к суперсемейству DMT (TC #2.A.7; Drug/Metabolite Transporter Superfamily). Среди них выявлены экспортеры с широкой субстратной специфичностью. Например, белок YdeD, в дальнейшем переименованный в EamA, был идентифицирован как экспортер метаболитов цистеинового пути, в том числе

L-цистеина и О-ацетил-L-серина (Dassler et al., 2000). Параллельно был охарактеризован белок YfiK (EamB), выступающий в роли второго экспортёра тех же соединений (Franke et al., 2003). Интересно, что, EamA и EamB также способны участвовать в экспорте других аминокислот. В частности, было продемонстрировано, что система EamA участвует в экспорте L-серина, способствуя снижению его внутриклеточной концентрации (Mundhada et al., 2017). Таким образом, экспорт L-треонина и L-серина в клетках *E. coli* контролируется несколькими мембранными системами, преимущественно относящимся к семействам RhtB и DMT. Эти транспортёры играют важную роль в предотвращении накопления токсичных концентраций аминокислот в цитоплазме клетки.

Среди известных высокоспецифичных транспортных систем, контролирующих поглощение L-треонина или L-серина можно выделить 3 переносчика: SdaC, TdcC и SstT (рис. 1).

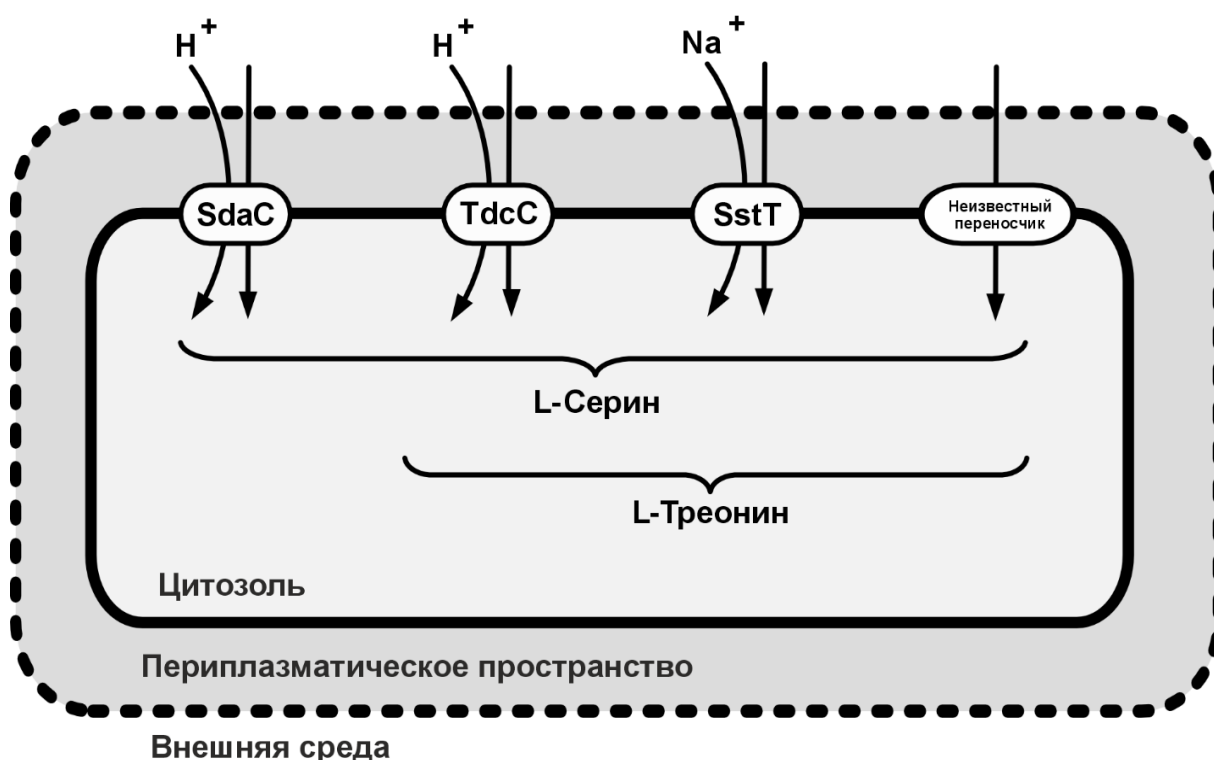


Рисунок 1. Охарактеризованные транспортные системы, контролирующие захват гидроксиаминокислот в клетку *E. coli*.

Первым идентифицированным и детально охарактеризованным транспортером этих аминокислот является TdcC, функционирующий в

анаэробных условиях (Sumantran et al., 1990). В аэробных условиях поглощение как треонина, так и серина опосредует симпортер SstT (Hama et al., 1987; Kim et al., 2002). Для SdaC показана активность исключительно в отношении серина (Hama et al., 1988; Kayahara et al., 1992). Помимо этого, на основе косвенных данных предполагается, что в захвате треонина может участвовать АТФ-зависимая высоко-аффинная транспортная система LIV-I, однако прямых доказательств этой активности представлено не было (Robbins and Oxender, 1973).

1.2.1 TdcC – транспортер L-серина и L-треонина в симпорте с H⁺

TdcC представляет собой серин/треонин-специфичную транспортную систему, принадлежащую к семейству переносчиков гидрокси и ароматических аминокислот (ТС #2.A.42; Hydroxy/Aromatic Amino Acid Permease, HAAAP). TdcC является частью оперона *tdcABCDEFG*, большая часть которого вовлечена в транспорт и метаболизм треонина и серина в анаэробных условиях (Simanshu et al., 2007). Функциональная значимость данного оперона обусловлена его ролью в катаболизме треонина, который используется бактериями как источник углерода, азота и энергии при отсутствии кислорода. Катаболизм треонина осуществляется в три последовательные стадии: (1) треониндегидратаза TdcB катализирует первую стадию анаэробной деградации треонина с образованием 2-оксобутаноата и аммиака (Umbarger and Brown, 1957; Hirata et al., 1965; Park and Datta, 1979); (2) TdcE представляет собой фермент, который катализирует превращение 2-оксобутаноата в пропионил-КоА и формиат (Hesslinger et al., 1998); (3) пропионаткиназа TdcD завершает процесс катаболизма треонина, катализируя превращение пропионилфосфата и АДФ в пропионат и АТФ (Hesslinger et al., 1998). Пермеаза TdcC функционирует по механизму симпорта с H⁺, контролируя захват серина и треонина из внешней среды. TdcC является гомологом серинового транспортера SdaC, что подтверждает их функциональную и эволюционную близость (Goss et al., 1988).

Система TdcC была идентифицирована в ходе экспериментов по анаэробному культивированию *E. coli* в среде, содержащей L-изомеры треонина, серина, валина, изолейцина, ц-АМФ и фумарата. Было известно, что оперон *tdcABCDEFG* индуцируется в анаэробных условиях при наличии треонина, что указывало на его участие в катаболизме последнего (Goss et al., 1988). Поскольку треонин должен попасть внутрь клетки, прежде чем подвергнуться катаболизму, авторы предположили, что рядом с ферментами катаболизма может находиться и специализированный переносчик треонина. Дальнейшие генетические исследования показали, что мутантные штаммы с делециями в локусе *tdc* демонстрируют значительное снижение уровня транспорта треонина. Анализ функционального вклада отдельных генов из состава *tdcABCDEFG* выявил, что *tdcC* оказывает доминирующее влияние на эту активность, что подтвердило его роль в импорте треонина. Измеренное значение K_M для треонина в качестве субстрата составило 6 мкМ, что свидетельствует о высокой аффинности переносчика к данной аминокислоте. Специфичность TdcC к серину была продемонстрирована с помощью ингибиторного анализа. Добавление 50-кратного молярного избытка серина полностью ингибировало транспорт треонина, что косвенно подтверждает двойную специфичность транспортера. При функциональной характеристике TdcC по отношению к треонину было показано, что его активность не подвержена влиянию Na^+ -разобщителя монензина, однако ингибируется в присутствии протонного разобщителя карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (CCCP) и ингибитора дыхательной цепи KCN. В совокупности эти данные позволили предположить, что движущей силой активного транспорта треонина системой TdcC, вероятнее всего, является протонный градиент (Sumantran et al., 1990).

Индукция экспрессии оперона *tdcABCDEFG* происходит анаэробно в отсутствии сахаров, вызывающих катаболитную репрессию и зависит от нескольких факторов транскрипции (Wu et al., 1992a; Sawers, 2001). Было показано, что полипептид TdcA действует как позитивный регуляторный

фактор, необходимый для инициации транскрипции генов *tdcABCDEFGF*. Структурный и функциональный анализ позволил отнести TdcA к семейству бактериальных транскрипционных регуляторов, сходных с LysR, широко распространенных среди прокариот и участвующих в активации множества метаболических путей (Ganduri et al., 1993). TdcR, предположительно, действует как сигнальный белок, активирующий экспрессию *tdcABCDEFGF* в ответ на переход к анаэробным условиям, истощение глюкозы и наличие треонина (Schweizer and Datta, 1989a). Клеточный фактор интеграции (Integration Host Factor, IHF) участвует в конформационных изменениях ДНК, способствующих связыванию других регуляторов (Wu et al., 1992b), а комплекс цАМФ-Crp (C-Reactive Protein, Crp), регулирует транскрипцию оперона в зависимости от уровня катаболитной репрессии (Wu et al., 1992a). Экспериментальные исследования с использованием футпринтинга ДНК показали, что очищенные IHF и Crp непосредственно связываются с сайтами в положениях -100 и -40 точки инициации транскрипции *tdcABCDEFGF*, тем самым активируя его транскрипцию (Wu et al., 1992a; Wu and Datta, 1992).

1.2.2 *SstT* – транспортер L-серина и L-треонина в симпорте с Na^+

Одновалентные катионы широко распространены в биологических системах и обнаружены как в эукариотических, так и в прокариотических клетках. В ходе изучения механизма поглощения ионов H^+ и Na^+ клетками *E. coli* К-12 было выявлено, что при физиологическом pH (~7,0) добавление серина или треонина в концентрации 1 мМ в культуральную среду приводит к резкому снижению концентрации ионов Na^+ . Этот факт позволил предположить, что транспорт данных аминокислот связан с ко-транспортом натрия. Для проверки гипотезы о наличии транспортной системы, ответственной за перенос как серина, так и треонина в симпорте с Na^+ , авторы провели серию экспериментов с использованием ионоселективного электрода для Na^+ . Так, было показано, что добавление 1 мМ серина или треонина вызывало резкое снижение концентрации Na^+ в

среде, что свидетельствовало о транспорте ионов натрия в клетку и подтверждало наличие Na^+ -зависимого транспортера. Однако если клетки предварительно инкубировали в течение нескольких минут с избытком одной из этих аминокислот (10 мМ), то последующее добавление другой уже не вызывало поглощения Na^+ . В частности, серин не индуцировал транспорт Na^+ в клетку после предварительной инкубации клеток с треонином, и наоборот — треонин не вызывал транспорт Na^+ после предварительной инкубации клеток серином. Эти данные указывали на конкурентные взаимоотношения между серином и треонином за связывание с одним и тем же переносчиком и позволили авторам работы предположить о существовании транспортера, контролирующего поглощение как треонина, так и серина в симпорте с Na^+ (Nama et al., 1987).

Для идентификации гена, кодирующего транспортную систему серина и треонина в симпорте с Na^+ , были подобраны селективные условия, при которых дефект в этом транспорте проявил себя на уровне фенотипа. Известно, что серин ингибирует рост штаммов *E. coli* в определенных условиях (Rowley, 1953; Amos and Cohen, 1954). В частности, при использовании глюкозы в качестве единственного источника углерода добавление низких концентраций серина (<1 мМ) подавляет рост бактерий (Nama et al., 1990). Этот эффект обусловлен ингибированием гомосериндегидрогеназы I, участвующей в биосинтезе треонина и изолейцина. Однако, если в среду вносить низкие концентрации изолейцина, глицина и треонина, клетки *E. coli* способны использовать серин в качестве единственного источника углерода (Ishikawa et al., 1987). Эти данные позволили подобрать селективные условия для отбора мутантов с дефектом в транспортной системе серина. Селекция мутантов была проведена на диком штамме *E. coli* W3133-2, чувствительном к серину. На первом этапе клетки мутагенизировали фагом-транспозоном Mu, что привело к инсерциям в случайных локусах генома. Среди отобранных мутантов, способных расти на лактате в присутствии 1 мМ серина, был выделен клон WAT9,

демонстрировавший сниженную способность использовать серин как единственный источник углерода даже при наличии изолейцина. Авторы работы предположили, что мутация в WAT9 затронула ген, кодирующий переносчик серина, что привело к снижению проницаемости клеточной мембраны для данной аминокислоты. Для идентификации этого гена был проведен скрининг геномной библиотеки родительского штамма W3133-2, клонированной на плазмиду pBR322, с целью поиска супрессора дефекта транспорта серина. В результате авторы установили, что супрессором является ген *tdcC*, кодирующий ранее охарактеризованный H^+ -симпортер треонина и серина (Ogawa et al., 1997). Найти и охарактеризовать ген *sstT* смогли лишь после скрининга геномной библиотеки, сконструированной на основе низкокопийного вектора pMW119. Оказалось, что оверэкспрессия мембранных транспортных систем, таких как *SstT* (Hama et al., 1987) и *SdaC* (Shao et al., 1994), на многокопийных плазмидах приводит к подавлению роста *E. coli*. В результате трансформации штамма W3133-2 геномной библиотекой WAT-9 на векторе pMW119 удалось отобрать клон, у которого транспорт Na^+ индуцировался при добавлении серина или треонина в культуральную среду. Ген, экспрессирующийся на выделенной из него плазмиде был назван *sstT* (Ogawa et al., 1998).

SstT принадлежит к симпортерам семейства DAACS и контролирует поглощение треонина и серина в симпорте с Na^+ . Интересно, что содержание остатков серина и треонина в его аминокислотном составе значительно выше, чем у других переносчиков аминокислот и сахаров. Подобная закономерность выявлена и у других транспортеров серина, таких как *SdaC* и *TdcC*, где доля Ser-Thr составляет 14,4% (Shao et al., 1994) и 16,4% (Schweizer and Datta, 1989b) соответственно. SstT является высокоаффинным переносчиком серина, поскольку рассчитанные значения K_M и V_{max} для SstT и серина в качестве субстрата составили 0,82 мкМ и 0,37 нмоль/мин*мг DCW (сухая биомасса; dry cell weight), соответственно (Kim et al., 2002). Вероятнее всего ген *sstT* подвержен регуляции репрессором TrpR, поскольку последовательность

нуклеотидов в области сайта -10 промотора *sstT* (TTATACTCG) почти идентична области гена *mtr* (TTGTACTCG), с которой связывается TrpR (Heatwole and Somerville, 1991; Czernik et al., 1994). Литературные данные указывают на то, что сочетание нуклеотидов CTAG и CTCG являются важной последовательностью для связывания TrpR с ДНК (Phillips and Stockley, 1996). Дополнительный уровень регуляции происходит на посттранскрипционном уровне. Использование технологии ДНК-микрочипов позволило установить, что мРНК *sstT* является мишенью для малой некодирующей РНК (мнРНК) GcvB, участвующей в регуляции трансляции белков при росте *E. coli* в богатой среде (Pulvermacher et al., 2009a). Область GcvB, комплементарная мРНК *sstT*, является той же самой последовательностью, которая регулирует мРНК ее основных мишеней *dppA* и *oppA* (Pulvermacher et al., 2008). Кроме того, для эффективного подавления экспрессии *sstT-lacZ* в условиях роста на LB и минимальной среде M9 с глюкозой и глицином GcvB требуется РНК-шаперон Hfq. Транскрипция *sstT* также находится под контролем Lrp. Однако механизм его действия остается спорным. В одном исследовании показано, что инактивация Lrp приводит к дерепрессии *sstT* (Ziegler and Freddolino, 2023), тогда как в другом сообщается, что Lrp, наоборот, активирует транскрипцию этого гена (Cho et al., 2011). Эти противоречивые данные указывают на сложную многокомпонентную регуляцию, требующую дальнейшего изучения.

1.2.3 *SdaC* – транспортер L-серина в симпорте с H^+

Существование моноспецифичного переносчика серина впервые было продемонстрировано в 1988 году на основе данных по ингибированию его транспорта другими аминокислотами. Авторы исследования (Nama et al., 1988) показали, что клетка экспрессирует высокоспецифичную транспортную систему, активную по отношению к серину, поскольку ни одна из тестируемых аминокислот не оказывала ингибирующего эффекта на транспорт серина даже при 50-кратном молярном избытке. Активность серин-специфичной транспортной системы оставалась стабильной в диапазоне pH 6,0–7,5, однако

при более щелочных значениях наблюдалось снижение накопления субстрата. Высокая активность транспорта серина наблюдалась в клетках, выращенных в присутствии смеси аминокислот, тогда как у клеток, культивируемых без аминокислот, активность отсутствовала. Это свидетельствовало о том, что система индуцируется определённой аминокислотой или их комбинацией. Впоследствии авторы установили, что индуктором является лейцин, а рассчитанные значения кинетических параметров для этой системы и серина в качестве субстрата составили $K_M = 50$ мкМ и $V_{max} = 23$ нмоль/мин*DCW (Nama et al., 1988). Дальнейшие исследования подтвердили, что электрохимический потенциал протонов (H^+) является движущей силой этой активности. В частности, внесение в реакционную смесь ингибитора дыхательной цепи KCN, в концентрации 5 мкМ, или разобщителя протонного градиента CCCP, в концентрации 20 мкМ, приводило к значительному подавлению активности транспорта серина. Прямые измерения с использованием H^+ -селективного электрода продемонстрировали, что добавление серина (1 мМ) в суспензию клеток, выращенных в присутствии аминокислот, сопровождалось поглощением H^+ , тогда как у клеток, выращенных в минимальной среде, этот эффект отсутствовал. Таким образом, стало ясно, что серин ко-транспортируется в симпорте с H^+ через серин-специфичную систему (Nama et al., 1988).

Ген *sdaC*, контролирующий эту активность идентифицировали лишь в 1994 году во время изучения сериндеаминазы *sdaB*. Так, в ходе этого исследования авторы показали, что оверэкспрессия *sdaC* на плазмиде значительно повышает уровень активности поглощения серина, причем эта активность не ингибируется в присутствии треонина (Shao et al., 1994). Согласно классификации транспортеров, SdaC является членом семейства НАААР. Экспрессия *sdaC* находится под контролем транскрипционного фактора Lgr, что согласуется с ранее установленным фактом индукции транспортной системы лейцином. В непосредственной близости от *sdaC*

расположены три сайта связывания IHF, однако их функциональная роль в регуляции экспрессии остаётся неопределённой. Ген *sdaC* демонстрирует высокую гомологию с *tdcC*, что указывает на возможные общие механизмы субстратной специфичности и регуляции. Интересно, что SdaC участвует в адаптации клетки в условиях голодания по источнику углерода. В отсутствие экзогенного серина делеция оперона *sdaCB* приводит к лизису клеток при истощении глюкозы (Kriner and Subramaniam, 2020).

1.3 Регуляция транскрипции и трансляции транспортных белков

1.3.1 Глобальный регулятор лейцинового ответа Lrp

Lrp является бактериальным транскрипционным регулятором, который, согласно транскриптомным данным, контролирует не менее 10% всех генов *E. coli* (Tani et al., 2002). Основными мишенями Lrp являются гены, кодирующие ферменты, участвующие в метаболизме и транспорте аминокислот, однако его влияние распространяется и на другие клеточные функции. В частности, установлено, что Lrp регулирует экспрессию генов, ответственных за биогенез фимбрий (*fimA*, *fimF*, *fimG*, *fimH*) (Baek et al., 2011). Lrp играет ключевую роль в регуляции метаболических путей, обеспечивая адаптацию бактерии к изменяющимся условиям окружающей среды. В частности, он, совместно с регулятором AsnC, координирует экспрессию генов, вовлечённых в метаболизм аминокислот и азотистых оснований, в ответ на их доступность в среде.

Lrp представляет собой относительно небольшой белок (18,8 кДа у *E. coli*), который может существовать как в димерной форме, так и в виде структур более высокого порядка, включая октамеры (Chen and Calvo, 2002) и гексадекамеры (Rios and Perona, 2007). Предполагается, что переход Lrp между форм октамеры ↔ гексадекамеры отражает метаболическое состояние клетки: в бедных средах доминируют гексадекамеры, тогда как в богатых — октамеры, образование которых стимулируется лейцином (Kawashima et al., 2008). Важность мультимерной структуры Lrp подчёркивается тем, что многие

промоторы, регулируемые этим белком, содержат несколько сайтов связывания. Хотя строго определённой консенсусной последовательности для связывания Lrp не существует, модифицированная процедура Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) позволила выделить предполагаемый мотив: YAGHAWATTWTDCTR (Cui et al., 1995).

Lrp *E. coli* состоит из 164 аминокислотных остатков и включает ДНК-связывающий домен и сайт связывания лиганда. Основным лигандом Lrp является лейцин, который, связываясь с регулятором, способен по-разному модулировать его активность. Lrp является двойным регулятором, то есть он может как активировать, так и репрессировать транскрипцию в зависимости от условий. Регуляторное воздействие может реализовываться различными способами: (1) активация или репрессия транскрипции в отсутствие лейцина, при этом добавление лейцина может отменять этот эффект; (2) активация или репрессия транскрипции только при связывании лейцина; (3) регуляция транскрипции независимо от присутствия лейцина. Помимо прямой регуляции, Lrp способен взаимодействовать с промоторами генов совместно с другими транскрипционными факторами, такими как CysB, LrhA, GadW, формируя комплексные регуляторные сети (Kroner et al., 2019).

В качестве примера транспортной систем аминокислот, подверженной влиянию Lrp, можно отметить H⁺-симпортер D-серина, D-аланина, D-циclosерина, L-аланина, глицина и β-аланина CysA (Hook et al., 2022). Первоначально ген *cysA* был идентифицирован как мишень Lrp на основании RNA-seq-анализа (Kroner et al., 2019). В дальнейшем было экспериментально показано, что инактивация Lrp изменяет экспрессию репортерного гена под контролем промотора *cysA*, причём лейцин устраняет эффект Lrp, подтверждая его участие в регуляции этого транспорта (Hook et al., 2022). Lrp также подавляет экспрессию экспортера L-лейцина LeuE, однако лейцин и ряд других аминокислот способны блокировать действие Lrp (Kutukova et al., 2005b). Напротив, экспрессия экспортера L-аланина AlaE в штамме *E. coli* MG1655 активируется Lrp в ответ на повышение внутриклеточного уровня L-

аланина (Ihara et al., 2017). Интересно, что лейцин также стимулирует транскрипцию *alaE*, что указывает на сложную регуляторную связь между метаболизмом этих аминокислот (Ihara et al., 2017). Эти примеры иллюстрируют, что Lrp является ключевым регулятором экспрессии генов, кодирующих транспортеры аминокислот, обеспечивая эффективную адаптацию бактериального метаболизма к изменяющимся условиям среды.

1.3.2 Регуляция посредством РНК

Малые некодирующие РНК участвуют в клеточном ответе на изменения состава питательной среды, реакциях на инфекцию, вызванную бактериофагами, а также адаптации к условиям окружающей среды. Большинство известных РНК-регуляторов функционируют на уровне транскрипции или посттранскрипционной регуляции. Механизм действия регуляторных РНК реализуется двумя основными путями: посредством прямого взаимодействия с комплементарными РНК-мишенями или через опосредованную регуляцию с участием белков, таких как Hfq, способствующих стабилизации и эффективному связыванию регуляторных РНК (Wagner and Romby, 2015).

В клетках *E. coli*, одним из известных представителей мРНК, которая способна ингибировать экспрессию генов, кодирующих транспортеры аминокислот, дипептидов и олигопептидов является GcvB (Pulvermacher et al., 2008, 2009b; Sharma et al., 2007, 2011). Кроме того, GcvB негативно регулирует экспрессию некоторых генов, кодирующих ферменты биосинтеза аминокислот (Sharma et al., 2007, 2011). Хотя точная физиологическая роль этой регуляции остается недостаточно изученной, предполагается, что она играет значимую роль в метаболизме аминокислот во время роста бактерий в среде, богатой питательными веществами (Sharma et al., 2011). GcvB был открыт случайно, во время изучения промоторной области гена *gcvA*, который кодирует основной транскрипционный регулятор системы катаболизма глицина *gcvTHP*. В результате этих исследований был идентифицирован ген *gcvB*, ориентированный в противоположную сторону относительно *gcvA*,

причем его промоторная область частично перекрывалась с промотором *gcvA* (Urbanowski et al., 2000). Исследование регуляции *gcvB* *in vivo* показало, что добавление глицина индуцирует его экспрессию, тогда как наличие пуринов, напротив, вызывает репрессию. Кроме того, активация промотора *gcvB* не зависит от Lrp, а мутация в *gcvR* приводит к высокой конститутивной экспрессии *gcvB* вне зависимости от условий культивирования клеток. В отсутствие репрессора GcvR, экспрессия *gcvB* остается зависимой от активатора GcvA, который связывается с областью между -29 и -76 относительно сайта начала транскрипции, активируя транскрипцию *gcvB*. Таким образом, экспрессия *gcvB* активируется посредством GcvA и репрессируется GcvR в ответ на наличие глицина (Urbanowski et al., 2000). При наличии глицина GcvA усиливает свою активность, что инициирует синтез GcvB. При отсутствии глицина GcvR действует как ко-репрессор, связывается с GcvA и подавляет его функцию и синтез GcvB. Максимальный уровень экспрессии *gcvB* наблюдается в начале лаг-фазы и снижается в последующие стадии роста (Argaman et al., 2001). Последовательность GcvB высококонсервативна у грамотрицательных бактерий, особенно в области, участвующей в сопряжении оснований с целевыми мРНК. Эта функционально значимая область, известная как R1, характеризуется чередующимися остатками G и U, тогда как большинство мРНК, регулируемых GcvB, содержат СА-богатые последовательности, расположенные на различном расстоянии от сайта инициации трансляции, иногда более чем на 40 нуклеотидов выше относительно инициаторного AUG-кодона (Sharma et al., 2007). Недавние исследования показали, что GcvB также оказывает негативное влияние на посттранскрипционный уровень экспрессии регулятора Lrp (Sharma et al., 2011). В целом, предполагается, что количество мишеней GcvB превышает 40, что подчеркивает его роль в регуляторных процессах клетки. Несколько доказательств убедительно свидетельствуют о том, что регуляторная активность GcvB осуществляется посредством белка Hfq, поскольку GcvB коиммунопреципитирует с Hfq в экстрактах *E. coli* (Zhang et al., 2003) и теряет

стабильность в *hfq*-мутантах (Urban and Vogel, 2007; Sharma et al., 2011). В *E. coli*, для эффективной репрессии синтеза периплазматических связывающих белков ABC-транспортеров *dppA*, *oppA* (Urban and Vogel, 2007), а также симпортеров *sstT* (Pulvermacher et al., 2009a) и *cysA* (Pulvermacher et al., 2009c) GcvB нуждается в Hfq. В случае с *dppA* этот механизм был подтвержден и для *S. typhimurium* (Sharma et al., 2007). Кроме того, было установлено, что Hfq способствует стабилизации мРНК и облегчает взаимодействие GcvB с мРНК-мишенями (Pulvermacher et al., 2009b).

1.3.3 Hfq: медиатор активности мРНК

Белок Hfq играет ключевую роль в регуляции экспрессии и стабильности мРНК. Первоначально он был идентифицирован как фактор, необходимый для репликации РНК-фага Q β *in vitro*, и был также известен как клеточный фактор интеграции (IHF-I), (Franze de Fernandez et al., 1968, 1972; Su et al., 1997). Филогенетический анализ показал, что ген *hfq* и его гомологи присутствуют примерно в половине всех секвенированных бактериальных геномов, причем некоторые организмы несут более одного *hfq*-подобного гена (Sun et al., 2002; Valentin-Hansen et al., 2004). Однако экспрессия и функциональная активность этих генов во многих случаях остаются неизученными. Белки семейства Hfq состоят из 70–110 аминокислот и формируют гомогексамерные структуры (Franze de Fernandez et al., 1972; Møller et al., 2002; Zhang et al., 2002). *E. coli* содержит от 50 000 до 60 000 мономеров Hfq, большинство из которых (от 80 до 90 %) находятся в цитоплазме в ассоциации с рибосомами (Vasil'eva and Garber, 2002). Значительное количество также локализуется в непосредственной близости от цитоплазматической мембраны (Diestra et al., 2009). Hfq является ключевым фактором, необходимым для эффективного взаимодействия мРНК с мРНК-мишенями (Pulvermacher et al., 2009b; Updegrove et al., 2016) и, следовательно, регулирует широкий спектр генов, включая гены, вовлеченные в ответ на стресс (Muffler et al., 1997), вирулентность (Ding et al., 2004; Sittka et al., 2007) и механизмы межклеточной коммуникации (Lenz et al., 2004; Meibom et al., 2009). Кроме того, Hfq играет

ключевую роль в клеточном ответе на токсичность сахарофосфатов и адаптации к низкому уровню железа (Massé and Gottesman, 2002; Vanderpool, 2007; Fantappiè et al., 2009). Он также играет важную роль в поддержании гомеостаза клеточной оболочки за счет взаимодействия с мРНК Mica и RybB, которые совместно репрессируют экспрессию белков наружной мембраны в стационарной фазе роста и при воздействии стрессовых факторов (Rasmussen et al., 2005; Papenfort et al., 2006; Figueroa-Bossi et al., 2006; Bossi et al., 2008).

1.4 Биотехнологический аспект изучения транспорта аминокислот

В настоящее время сформировалось устойчивое представление о том, что в продуценте любого соединения модификация его транспорта как в, так и из клетки, является неотъемлемой частью искусственно создаваемого пути биосинтеза. Отчасти это представление сложилось на основании опыта конструирования продуцентов аминокислот на основе *Corynebacterium glutamicum* и *E. coli*.

Активный экспорт продукта из клетки выполняет сразу несколько важных функций: (1) снижает токсичный эффект, вызванный накоплением продукта внутри клетки, одновременно повышая допустимый порог его содержания в среде; (2) предотвращает деградацию продукта; (3) минимизирует эффект ретроингибирования ферментов биосинтеза. Напротив, на поздних стадиях ферментации, в условиях избытка продукта, его обратный захват из культуральной среды в клетку может приводить к снижению эффективности синтеза в результате возникновения циклического транспорта через мембрану. Поскольку каждая из стадий этого цикла обычно энергозависима, такой процесс может расходовать избыточное количество энергии электрохимического потенциала без совершения полезной работы. Кроме того, увеличение внутриклеточной концентрации продукта, в результате работы транспортных систем, осуществляющих его поглощение, может вызвать ингибирование его биосинтеза конечным продуктом реакции. В связи с этим, при создании штаммов-продуцентов аминокислот, стремятся

активировать механизмы, обеспечивающие эффективный экспорт целевого соединения, одновременно инактивируя мембранные переносчики, регулирующие его обратный захват из окружающей среды в клетку.

В одной из первых работ, связанных с модификацией транспортных систем в продуценте аминокислот, было показано, что изменение проницаемости клеточной мембраны путем инактивации транспортеров целевого соединения способствовало повышению уровня продукции L-триптофана в штамме-продуценте *C. glutamicum*. С помощью случайного мутагенеза и последующей селекции был отобран мутант с дефектом транспорта триптофана и фенилаланина. Экспериментально было установлено, что продукция триптофана в мутантном штамме увеличилась на 10–20 % (Ikeda and Katsumata, 1994). Аналогичный эффект наблюдался при культивировании продуцента L-изолейцина, дефектного по его транспорту. В частности, направленная инактивация мембранного транспортера изолейцина BrnQ в *C. glutamicum*, являющегося гомологом BrnQ *E. coli*, позволила повысить продукцию аминокислоты с 154,3 до 170,3 мМ. Дальнейшее улучшение продуктивности было достигнуто за счёт инактивации *brnQ* в сочетании с оверэкспрессией генов *brnEF*, кодирующего мембранный экспортер изолейцина, метионина, лейцина и валина, что обеспечило увеличение выхода целевого продукта до 221 мМ (Xie et al., 2012).

Изучение механизмов транспорта треонина из цитозоля клетки *E. coli*, начатое в конце 70-х годов прошлого века во ВНИИГенетика и продолженное в научно-исследовательском институте Аджиномото-Генетика, под руководством профессора Дебабова В.Г., Козлова Ю.И. и Лившица В.И., позволило значительно улучшить свойства штамма-продуцента этой аминокислоты. В ходе исследований были идентифицированы и охарактеризованы экспортеры треонина и гомосерина RhtA (Livshits et al., 2003; Lee et al., 2009), RhtB (Aleshin et al., 1999; Лившиц и др., 2000), RhtC (Zakataeva et al., 1999). Важным шагом в этих работах был отбор мутантов, устойчивых к токсичным концентрациям треонина и гомосерина. Авторы

показали, что мутация *rhtA*²³, которая не затрагивает структурный ген, а представляет собой замену А на G в положении -1 относительно стартового кодона ATG, увеличивает его экспрессию в *E. coli* примерно в десять раз и тем самым повышает активность экспорта треонина из клеток *E. coli* (Aleshin et al., 1999). Примерно такой же эффект был достигнут при оверэкспрессии дикого *rhtA* на многокопийной плазмиде. Помимо RhtA, можно выделить второй предполагаемый экспортер треонина RhtC. Было показано, что экспрессия *rhtC* придает клеткам устойчивость к треонину (Zakataeva et al., 1999). Более того, гетерологичная экспрессия *rhtC* из *E. coli* в *C. glutamicum* приводит к увеличению скорости экспорта треонина по сравнению с родительским штаммом (Diesveld et al., 2009). Полученные данные свидетельствуют о важности *rhtA* и *rhtC* при оптимизации штаммов-продуцентов треонина, а их оверэкспрессия активно используется в современных стратегиях метаболической инженерии (Kruse et al., 2002; Закатаева et al., 2006).

Среди мембранных переносчиков *E. coli*, контролирующих захват треонина из культуральной среды, при конструировании продуцента инактивируют как H⁺-симпортер TdcC, так и Na⁺-симпортер SstT. Интересно, что, хотя активность TdcC подтверждена только в анаэробных условиях (Sumantran et al., 1990), его инаktivация привела к увеличению продукции треонина на 15,6% культурой штамма-продуцента (Lee et al., 2007). Замена открытой рамки считывания двух генов *tdcC* и *sstT* на мутантный аллель *rhtA*, привела к 15-кратному увеличению продукции треонина по сравнению с родительским штаммом MG1655 (Lee et al., 2009). Таким образом, способность штамма-продуцента к накоплению экзогенного треонина коррелирует с активностью поглощения этого субстрата из культуральной среды. Поскольку в литературе представлены данные о том, что в *E. coli* все еще активна ранее неохарактеризованная транспортная система треонина (Kruse et al., 2001), то снижение проницаемости клеточной мембраны для этого субстрата, в результате инаktivации все еще активной, но ранее

неидентифицированной транспортной системы, является актуальной задачей, которую предстоит решить в настоящей работе.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Среды и реагенты

Для культивирования клеток *E. coli* использовали жидкую среду LB (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлорид натрия – 10 г/л). Твердую питательную среду, LB агар, готовили путем добавления к жидкой LB агар-агара до концентрации 20 г/л. При необходимости в среду вносили антибиотики: ампициллин – 200 мг/л, хлорамфеникол – 25 мг/л, спектиномицин – 50 мг/л, канамицин (100 мкг/мл).

Для исследования скорости роста дефектных по синтезу и транспорту треонина клеток, а также измерения транспорта треонина и серина *in vitro*, использовали твердую и жидкую минимальную среду M9 (дигидрофосфат калия – 3 г/л, гидрофосфат натрия двенадцативодный – 15 г/л, хлорид натрия – 0,5 г/л, хлорид аммония – 1 г/л, хлорид кальция – 0,1 мМ, сульфат магния – 2 мМ, агар-агар – 20 г/л) (Sambrook et al., 1989) с 2 г/л глюкозы. В среду вносили L-треонин, L-изолейцин, L-аланил-L-треонин, L-серин и L-лейцин, если было необходимо. Концентрации этих добавок указаны в разделе "Результаты и обсуждение", а также к подписям к рисункам. Способность к утилизации L-арабинозы и лактозы в качестве единственного источника углерода тестировали на минимальной среде M9 с добавлением 2 г/л арабинозы или 2 г/л лактозы, соответственно.

Для исследования механизма энергизации транспорта использовали модифицированную M9, в которой ионы Na^+ заменили на эквимоллярное количество ионов K^+ : дигидрофосфат калия – 3 г/л, гидрофосфат калия трёхводный – 9,58 г/л, хлорид калия – 0,63 г/л, хлорид аммония – 1 г/л, хлорид кальция – 0,1 мМ, сульфат магния – 2 мМ.

Все среды стерилизовали автоклавированием при 0,8 ати в течение 15 минут.

2.2 Ферменты и наборы

Эндонуклеазы рестрикции, T4 ДНК лигаза, T4 ДНК полимераза и DreamTaq ДНК полимераза были получены из Thermo Fisher Scientific

(Вильнюс, Литва). Для клонирования фрагменты ДНК амплифицировали с помощью Кара HiFi ДНК полимеразы (Кара Biosystems, Вилмингтон, Массачусетс, США).

Плазмидную ДНК из клеток и фрагменты ДНК из агарозного геля выделяли при помощи наборов реагентов GeneJet Plasmid Miniprep Kit и GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва), соответственно.

2.3 Олигонуклеотиды

Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия) и стандартным образом очищены, обессолены и лиофилизированы. Их номера и последовательности приведены в приложении 1.

2.4 Бактериальные штаммы и плазмиды

Все бактериальные штаммы, использованные в настоящей работе, включая их генотипы и фенотипы, перечислены в таблице 1. Штаммы были сконструированы с использованием λ Red-рекомбинации (Datsenko and Wanner, 2000; Ellis et al., 2001) и трансдукции фагом P1vir (Thomason et al., 2007). Способ конструирования каждого штамма, а именно, пара праймеров и матрица для амплификации интегративной кассеты, или пара донор-реципиент для трансдукции, указан в приложении 2. Рекомбинантов отбирали на селективной среде, после чего устойчивые колонии рассеивали и подтверждали структуру локуса с помощью ПЦР с колоний.

Использованные в работе плазмиды перечислены в таблице 2. Конструирование плазмид, полученных в ходе настоящей работы описаны в приложении 3.

Таблица 1. Бактериальные штаммы, использованные в работе

Название штамма	Генотип	Фенотип	Источник и ссылка
MG1655	<i>F⁻ λ⁻ ilvG⁻ rfb-50 rph-1</i>		Лабораторная коллекция (Blattner et al., 1997)
XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96 thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17</i>	Nal ^R Thi ⁻ Lac ⁻ Tet ^R	Лабораторная коллекция
B514	<i>supE ilvA⁴⁴² rhtA²³ tdh::Tn5 aadA1 -P_{A1}-thrA^{fbr}BC</i>	Sp ^R	
B516	<i>supE ilvA⁴⁴² rhtA²³ tdh::Tn5 aadA1 - P_{H207}-thrA^{fbr}BC</i>	Sp ^R	
B1044	<i>supE ilvA⁴⁴² rhtA²³ tdh::Tn5 ΔthrBC ΔtdcBCDE::neo ΔsstT</i>	Km ^R	
B1175	<i>Δtdh P_{H207}-thrA^{fbr}BC-TrrnB ΔlacI supE ΔpoxB-ltaE ΔsstT ΔtdcBCDE ΔytfG-P_{trc}-pysA P_{LtetO-1}- rhtA</i>	-	
B1426	MG1655 <i>ΔthrBC ΔsstT ΔtdcBCDE::neo</i>	Km ^R	
B1709	MG1655 <i>ΔlacZ::cat</i>	Lac ⁻	
B1710	MG1655 <i>ΔaraB::cat</i>	Ara ⁻	
B1713	B1175 <i>ΔdapA::cat</i>	Cm ^R	
B1778	B1175 <i>ΔlysA:: cat</i>	Sp ^R	
B2137	MG1655 <i>Δ[araC-araBAD]::P_{H207}-lacI- P_{A10304}-ocr-γβexo-P_L-cat-luxCDABE</i>	Cm ^R	
B1082	<i>ilvA⁴⁴² rhtA²³ ΔthrBC ΔtdcBCDE::neo ΔsstT yifK^{frameshift}</i>	Km ^R	Настоящая работа
B1734	B1175 <i>lysC^{E250K}</i>	-	
B1792	B1175 <i>ΔyifK::aadA1</i>	Sp ^R	
B1794	B1175 <i>ΔsdaC:: aadA1</i>	Sp ^R	
B1796	B1175 <i>ΔydgI:: aadA1</i>	Sp ^R	
B1798	B1175 <i>ΔyhjE::cat</i>	Cm ^R	
B1800	B1175 <i>ΔychE:: aadA1</i>	Sp ^R	
B1802	B1175 <i>ΔyjeM:: aadA1</i>	Sp ^R	
B1805	B1175 <i>ΔbrnQ::aadA1</i>	Sp ^R	

B1806	B1426 Δ sdaC::aadA1	Km ^R Sp ^R
B1817	B1426 Δ yifK::aadA1	Km ^R Sp ^R
B1818	B1426 Δ brnQ::aadA1	Km ^R Sp ^R
B1851	B1426 Δ yifK Δ brnQ::aadA1	Km ^R Sp ^R
B1893	B1426 Δ livKHMGF::cat	Km ^R Cm ^R
B1895	B1426 Δ yifK Δ brnQ Δ livKHMGF::cat	Km ^R Cm ^R
B1950	B1426 Δ yifK Δ brnQ Δ livKHMGF Δ yjeM Δ sdaC Δ ydgl Δ ychE	Km ^R
B2055	B1950 <i>lrp</i> ^{T134A}	Km ^R
B2058	B1950 <i>marC</i> ^{S140SS}	Km ^R
B2059	B1950 <i>marC</i> ^{V145E}	Km ^R
B2061	B1950 <i>cycA</i> ^{V226A}	Km ^R
B2063	B1950 <i>marC</i> ^{L10Q}	Km ^R
B2068	B1950 <i>marC</i> ^{G11E}	Km ^R
B2071	B1950 <i>cycA</i> ^{C110S}	Km ^R
B2075	B1426 Δ lysP::aadA1	Km ^R Sp ^R
B2092	B1175 Δ lysP::aadA1	Sp ^R
B2101	B1895 Δ lysP::aadA1	Km ^R Sp ^R
B2102	B1175 <i>cat-sacB</i> -P _{L-tac} -lysC ^{E250K}	Cm ^R
B2110	B1175 Δ lysC::aadA1	Sp ^R
B2115	B1175 <i>aadA1</i> -P _{H207} - <i>asd</i>	Sp ^R
B2120	B1175 <i>aadA1</i> -P _{A1} - <i>asd</i>	Sp ^R
B2288	B1817 Δ livKHMGF::cat	Km ^R Cm ^R
B2289	B1818 Δ livKHMGF::cat	Km ^R Cm ^R

B2370	B1851 <i>thrABC</i> ^{wt}	Km ^R	
B2374	B1426 <i>thrABC</i> ^{wt}	Km ^R	
B2394	B1895 <i>thrABC</i> ^{wt}	Km ^R	
B2395	B2288 <i>thrABC</i> ^{wt}	Km ^R	
B2396	B2289 <i>thrABC</i> ^{wt}	Km ^R	
B2429	B2394 <i>AsdaC::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2430	B2396 <i>AsdaC::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2458	B2370 <i>AsdaC::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2460	B2394 <i>Δlrp::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2462	B2396 <i>Δlrp::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2468	B1426 <i>ΔyqeG::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2469	B1426 <i>ΔyhjE::cat</i>	Km ^R Cm ^R	
B2678	MG1655 <i>Δlrp::aadA1</i>	Sp ^R	
B2722	MG1655 <i>ΔthrBC ΔsstT ΔtdcBCDE::neo ΔyifK ΔbrnQ ΔlivKHMGE ΔyhjE::cat</i>	Km ^R Cm ^R	
B2738	B2396 <i>Δhfq::tetA</i>	Km ^R Tc ^R	
B2739	B2396 <i>ΔgcvB::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2753	B2739 <i>Δhfq::tetA</i>	Km ^R Tc ^R Sp ^R	
B2769	MG1655 <i>ΔthrBC ΔsstT ΔtdcBCDE::neo ΔyifK ΔbrnQ ΔlivKHMGE ΔyhjE::cat ΔyjeM::aadA1</i>	Km ^R Cm ^R Sp ^R	
B2789	MG1655 <i>ΔthrBC ΔsstT ΔtdcBCDE::neo ΔyifK ΔbrnQ ΔlivKHMGE ΔyhjE ΔyjeM ΔalaE::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2792	MG1655 <i>ΔthrBC ΔsstT ΔtdcBCDE::neo ΔyifK ΔbrnQ ΔlivKHMGE ΔyhjE ΔyjeM ΔalaE::aadA1 ΔproP::cat</i>	Km ^R Cm ^R Sp ^R	
B2794	MG1655 <i>ΔthrBC ΔsstT ΔtdcBCDE::neo ΔyifK ΔbrnQ ΔlivKHMGE ΔyhjE ΔyjeM ΔalaE ΔproP ΔsdaC::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	
B2797	MG1655 <i>ΔthrBC ΔsstT ΔtdcBCDE::neo ΔyifK ΔbrnQ ΔlivKHMGE ΔyhjE ΔyjeM ΔalaE ΔproP ΔsdaC ΔychE::aadA1</i>	Km ^R Sp ^R	

B2800	MG1655 $\Delta thrBC \Delta sstT \Delta tdcBCDE::neo \Delta yifK \Delta brnQ \Delta livKHMGF \Delta yhjE \Delta yjeM \Delta alaE \Delta proP \Delta sdaC \Delta ychE \Delta ydgI::aadA1$	Km ^R Sp ^R	
B2818	MG1655 $\Delta thrBC \Delta sstT \Delta tdcBCDE::neo \Delta yifK \Delta brnQ \Delta livKHMGF \Delta yhjE \Delta yjeM \Delta alaE \Delta proP \Delta sdaC \Delta ychE \Delta ydgI \Delta yqeG::aadA1$	Km ^R Sp ^R	
B2820	B2055 $\Delta lrp::aadA1$	Km ^R Sp ^R	
B2824	B2055 $\Delta yhjE::cat$	Km ^R Cm ^R	
B2827	B2055 $\Delta yhjE \Delta proP::cat$	Km ^R Cm ^R	
B2873	B2055 $\Delta yhjE \Delta alaE::aadA1$	Km ^R Sp ^R	
B2875	B2055 $\Delta yhjE \Delta proP::cat \Delta yqeG::aadA1$	Km ^R Cm ^R Sp ^R	

Таблица 2. Плазмиды, использованные в работе

Название	Описание и назначение	Источник	Ссылка
pISA	Матрица для амплификации кассеты <i>aadA1</i> . Содержит ориджин репликации pSC101 и ген устойчивости к ампициллину <i>bla</i> .	Лабораторная коллекция	(Vybornaya et al., 2020)
pKD46	Вспомогательная плаزمида для экспрессии генов λ Red. Содержит ориджин репликации pSC101ts, маркер устойчивости к ампициллину <i>bla</i> , оперон λ Red под контролем промотора <i>P_{araB}</i> и активатора AraC.	Лабораторная коллекция	(Scholz et al., 1989) (K. A. Datsenko and Wanner, 2000) (Cox and Schildbach, 2017)
pACYC184	Содержит ориджин репликации p15A, ген устойчивости к хлорамфениколу - <i>cat</i> и тетрациклину - <i>tetA</i> .	Лабораторная коллекция	(Chang and Cohen, 1978) (Bolivar et al., 1977a) (Bierman et al., 1992)
pBR322	Среднекопийный вектор, содержит маркеры устойчивости к ампициллину (Ap ^R) и тетрациклину (Tc ^R) и ориджин репликации – pMB1.	Лабораторная коллекция	(Chang and Cohen, 1978) (Bolivar et al., 1977a) (Bierman et al., 1992)
pMW118	Содержит ориджин репликации pSC101 и маркер <i>bla</i> (Ap ^R); малокопийный вектор	Лабораторная коллекция	(Bolivar et al., 1977a) (Bierman et al., 1992)
pICA	Содержит ориджин репликации pMB1, ген устойчивости к ампициллину - <i>bla</i> , а также сцепленные маркеры <i>cat</i> и <i>sacB</i> .	Лабораторная коллекция	(Bubnov et al., 2022a; D. M. Bubnov et al., 2018) (Bierman et al., 1992)
pITA	Содержит ориджин репликации pMB1, и сайты λ attR и λ attL, фланкирующие маркер <i>cat-sacB</i> (Cm ^R). Несет ген устойчивости к ампициллину – <i>bla</i> (Ap ^R).	Лабораторная коллекция	(Vybornaya et al., 2020)
pMW-att-Cm-att- <i>ter rrnB</i>	Содержит ориджин репликации pSC101 и сайты λ attR и λ attL, фланкирующие маркер <i>cat</i> (Cm ^R). Несет ген устойчивости к ампициллину – <i>bla</i> (Ap ^R).	Любезно предоставлена Машко С.В. (АГРИ, Москва)	(Katashkina et al., 2005)

pLA	Содержит ориджин репликации pSC101 и сайты λ attR и λ attL, фланкирующие маркер <i>tet</i> (Tc ^R). Несет ген устойчивости к ампициллину – <i>bla</i> (Ap ^R).	Лабораторная коллекция	
pMW-Int-Xis	Плазмида несет гены: <i>int</i> - для рекомбинации между λ attP и attB, <i>xis</i> - для экзизии генов профага. Используется для удаления маркеров.	Любезно предоставлена Сливинской Е.И. (АГРИ, Москва)	(Каташкина, 2003)
pSC-P _L -tac	Содержит ориджин репликации pMB1, ген устойчивости к ампициллину <i>bla</i> , а также сцепленные с промотором P _{L-tac} маркеры <i>cat</i> и <i>sacB</i> . Последовательность плазмиды приведена в разделе «Нуклеотидная последовательность pSC-P _L -tac»	Лабораторная коллекция	
pDEW201	ori репликации pBR322, в вектор встроена беспромоторная кассета <i>luxCDABE P. luminescens</i> ; Ap ^r .	Любезно предоставлена Мелькиной О.Е. (НИЦ «Курчатовский институт», Москва).	(Van Dyk and Rosson., 1998)
pDEW- <i>yifK</i>	Плазмида для экспрессии транскрипционного фьюжна P _{yifK} - <i>luxCDABE</i> . Промотор гена <i>yifK</i> клонирован перед опероном <i>luxCDABE</i> в плазмиде pDEW201.	Настоящая работа	
pDEW- <i>yhjE</i>	Плазмида для экспрессии транскрипционного фьюжна P _{yhjE} - <i>luxCDABE</i> . Промотор гена <i>yhjE</i> клонирован перед опероном <i>luxCDABE</i> в плазмиде pDEW201.		
pMW- <i>liv</i>	Плазмида для оверэкспрессии транспортной системы LIV-I; содержит весь локус <i>livJ-panZ-livKHMGE</i> , клонированный в вектор pMW118.		
pMW- <i>gdhA</i>	Плазмида для оверэкспрессии глутаматдегидрогеназы; содержит дикий аллель <i>gdhA</i>		
pBR- <i>sdaC</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 2927439–2930367. Вставка содержит ORF гена <i>sdaC</i>		
pBR- <i>ychE</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 1297744–1301027. Вставка содержит ORF гена <i>ychE</i>		
pBR- <i>brnQ</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 419330–421331. Вставка содержит ORF гена <i>brnQ</i>		
pBR- <i>yjeM</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 4383331–4385560. Вставка содержит ORF гена <i>yjeM</i>		
pBR- <i>yhjE</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 3673707–3676353. Вставка содержит ORF гена <i>yhjE</i>		
pBR- <i>alaE</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 2798554–2800143. Вставка содержит ORF гена <i>alaE</i>		
pBR- <i>proP</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 4328041–4332207. Вставка содержит ORF гена <i>proP</i>		
pBR- <i>yqeG</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 2984996–2987940. Вставка содержит ORF гена <i>yqeG</i>		
pBR- <i>ydgl</i>	Плазмида, производная pBR322, несущая область хромосомы <i>E. coli</i> K-12, соответствующая координатам 1679357–1681299. Вставка содержит ORF гена <i>ydgl</i>		

2.5 Выделение тотальной ДНК из *Escherichia coli*

Клетки из 120 мл ночной культуры, выращенной до ранней стационарной фазы, осаждали центрифугированием при $6000 \times g$ в течение 5 минут в полипропиленовых пробирках объёмом 50 мл при комнатной температуре. Супернатант сливали и осадок суспендировали в 12 мл буфера для выделения хромосомной ДНК, содержащего (г/л): 1% додецилсульфат натрия – 10, 100 мМ NaCl – 5,8, 10 мМ Tris – 2,1, 1 мМ EDTA – 0,35 и 2% Triton x100 – 20 мл. Затем добавляли раствор протеиназы К до конечной концентрации 200 мкг/мл. Смесь инкубировали в течение 2 часов при 37°C и 1 час при 65 °C. За 30 мин до окончания реакции добавляли РНКазу А до концентрации 100 мкг/мл. ДНК экстрагировали последовательно равным объёмом смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) 3 раза и отмывали от фенола раствором хлороформа 2 раза. Затем ДНК осаждали раствором 80% этилового спирта и растворяли в стерильной деионизированной воде.

2.6 Приготовление электрокомпетентных клеток

Клетки растили в течение ночи в 5 мл LB. Штаммы, несущие вспомогательные плазмиды для экспрессии λ Red, растили в LB с добавлением 200 мг/л ампициллина. Ночную культуру разбавляли в 200 раз в 10 мл свежей LB. Культуры инкубировали в пробирках объёмом 50 мл до тех пор, пока OD₆₀₀ не достигало 0,3–0,4 (100–110 минут). Все дальнейшие манипуляции выполняли на льду. Клетки осаждали при $8000 \times g$ в течение 2 минут в полипропиленовых пробирках объёмом 50 мл. Супернатант сливали, пробирки центрифугировали 20 секунд и остатки среды удаляли насухо. Клетки аккуратно ресуспендировали и промывали в 35 мл деионизированной ледяной воды. Затем, к клеткам добавляли 1 мл воды и переносили в пробирку объёмом 1,5 мл. Клетки центрифугировали 45 секунд в охлаждённой микроцентрифуге при $12000 \times g$. Супернатант удаляли насухо, после чего осадок клеток ресуспендировали в 80 мкл ледяной деионизированной воды и

использовали для электропорации в течение 1 часа. Во всех экспериментах по интегративной трансформации использовали только свежеприготовленные компетентные клетки.

2.7 Электропорация

Образец ДНК (1–5 мкл) добавляли к 50 мкл компетентных клеток на льду. Затем суспензию клеток с ДНК помещали в ледяную кювету с зазором между электродами 1 мм. Электропорацию проводили с использованием Eppendorf Electroporator 2510 (Eppendorf AG, Гамбург, Германия), работающего при 1,8 кВ, 10 мкФ и 600 Ом. Сразу же после импульса добавляли 1 мл среды LB комнатной температуры и клетки переносили в 1,5-мл пробирку для восстановления жизнеспособности.

2.8 Получение интегративных кассет

Гены инактивировали путем интеграции в целевой локус кассеты, содержащей маркер устойчивости к антибиотику. Все интегративные кассеты были получены с помощью ПЦР. Использованные матрицы и пары праймеров для амплификации интегративных кассет перечислены в таблице 3. Кассеты амплифицировали с использованием специфических олигонуклеотидов длиной 65–75 нуклеотидов. Из них 20 оснований с 3'-конца отжигались на плазмидной ДНК выше и ниже области гена устойчивости. Остальные 50 оснований служили областью гомологии, по которой происходила рекомбинация на хромосомной ДНК. Кассету конструировали таким образом, чтобы при интеграции она полностью замещала открытую рамку считывания целевого гена в хромосоме штамма-реципиента. Перед электропорацией, все фрагменты ПЦР осаждали этанолом, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции DpnI для того, чтобы избавиться от следов плазмидной ДНК, и очищали с помощью препаративного гель-электрофореза и набора GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва). Чтобы избежать повреждения ДНК, для визуализации использовали УФ излучение с длиной волны 365 нм. Чистоту и концентрацию ДНК определяли путем деления образцов в гель-

электрофорезе вместе с маркером длин фрагментов ДНК 1 kb GeneRuler (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва). Аликвоты хранили при -20°C.

Таблица 3. Интегративные кассеты, использованные в работе

Кассета	Прямой праймер	Обратный праймер	Матрица
<i>cat-sacB-PL-tac</i>	997	1416	pSC-PL-tac
$\Delta dapA::cat$	3896	3897	pACYC184
$\Delta lysA::cat$	3393	3394	pICA
$\Delta lysC::aadA1$	5672	5673	pISA
$\Delta lysP::aadA1$	4550	4551	pISA
<i>asd::aadA1-P_{H207}</i>	3501	3502	Геномная ДНК B516
<i>asd::aadA1-P_{A1}</i>	3501	3502	Геномная ДНК B514
$\Delta sdaC::aadA1$	4190	4191	pISA
$\Delta ydgI::aadA1$	4194	4195	pISA
$\Delta ychE::aadA1$	4202	4203	pISA
$\Delta yjeM::aadA1$	4186	4187	pISA
$\Delta yifK::aadA1$	4206	4207	pISA
$\Delta brnQ::aadA1$	4327	4328	pISA
$\Delta livKHMGF::cat$	4348	4349	pMW-att-Cm-att-ter <i>rrnB</i>
$\Delta lrp::aadA1$	5039	5040	pISA
$\Delta yqeG::aadA$	4931	4932	pISA
$\Delta yhjE::cat$	4927	4928	pITA
$\Delta hfq::tetA$	5851	5852	pLA
$\Delta gcvB::aadA1$	5847	5848	pISA
$\Delta alaE::aadA1$	4919	4920	pISA
$\Delta proP::cat$	4923	4924	pITA

2.9 λ Red-зависимая интегративная трансформация

Интегративную трансформацию проводили при помощи λ Red системы (Datsenko and Wanner, 2000). Вспомогательная плазмида pKD46 несет ген *bla*, придающий клеткам устойчивость к ампициллину, и гены *gam*, *beta* и *exo* бактериофага λ . В качестве фрагмента для интеграции использовали линейные продукты ПЦР, несущие на концах области гомологии к целевому локусу размером ~50 п.н.

Все процедуры, в которых необходима экспрессия плазмиды pKD46, проводили при 30°C, так как она содержит температурочувствительный

репликон pSC101. Для проведения трансформации линейной ДНК из клеток целевого штамма готовили компетентную культуру и трансформировали ее pKD46. Трансформантов отбирали на агаризованной среде LB с добавлением ампициллина. Затем готовили компетентную культуру из трансформантов. Функции λ Red в них индуцировали путём добавления L-арабинозы до конечной концентрации 15 мМ сразу после разбавления ночной культуры в свежей LB. К суспензии компетентных клеток добавляли ПЦР-продукт и проводили электропорацию, инкубировали клетки в LB в течение 2-х часов после чего клетки высевали на агаризованную LB с добавлением антибиотика, ген устойчивости к которому интегрировали. Чашки инкубировали в течение суток при 30°C. Для удаления вспомогательной плазмиды pKD46 трансформантов рассеивали на агаризованной LB и растили сутки при 37°C. Для проверки наличия pKD46 рекомбинантов тестировали на устойчивость к ампициллину. Структуру рекомбинантного локуса анализировали с помощью ПЦР с колоний.

2.10 Удаление селективных маркеров из хромосомы посредством сайт-специфической системы рекомбинации фага λ

Для вырезания маркеров устойчивости к антибиотикам *aadA1* и *cat*, фланкированных сайтами *attR* и *attL* фага λ из хромосомы *E. coli* использовали плазмиду pMW-Int-Xis (Каташкина, 2003). Данная плаزمида несет в себе ген устойчивости к ампициллину и температурочувствительный ориджин репликации. По этой причине трансформантов культивировали при 30°C во избежание ее утраты. С плазмиды экспрессируются гены *int* и *xis* фага λ , необходимые для его интеграции в хромосому бактериальной клетки и вырезания из нее. Эти гены находятся под контролем промотора P_R и температурочувствительного репрессора CI^{857} .

Для удаления маркера клетки трансформировали плазмидной ДНК pMW-Int-Xis, после чего ресуспендировали в 1 мл LB и инкубировали в полипропиленовой пробирке объёмом 1,5 мл в течение 1 часа при 30°C. Затем клетки высевали на LA с добавлением ампициллина. На следующий сутки

трансформантов переносили в жидкую LB и культивировали 24 часа при 37°C для индукции Int/Xis и излечения клеток от плазмиды. Затем ночную культуру из жидкой LB рассеивали до отдельных колоний на агаризованной среде LB без антибиотика и культивировали сутки при 37°C. На следующий день отдельные колонии тестировали на наличие плазмидного маркера и маркера в хромосоме, который предполагалось удалить с помощью Int/Xis. Чувствительные к антибиотикам клоны использовали в дальнейшей работе.

2.11 Общая неспецифическая трансдукция фагом P1

Для получения фаговых частиц, содержащих необходимую конструкцию, отдельную колонию штамма-донора растили 18–20 часов в 5 мл среды LB с добавлением необходимых антибиотиков. Отбирали 50 мкл ночной культуры и вносили в 5 мл свежей среды LB, содержащей 0,2% глюкозы и 5 mM CaCl₂. Клетки растили при 37°C в течение 30–90 минут до появления видимого роста. В пробирку вносили 100 мкл суспензии фаговых частиц фага P1_{vir} и инкубировали до полного лизиса клеток. К полученному фаголизату добавляли 2 мл хлороформа и интенсивно перемешивали, после чего центрифугировали 10 минут при 10000 × g. Затем, верхнюю фазу отбирали и переносили в новую пробирку на 1,5 мл. Полученную суспензию фаговых частиц хранили при 4°C.

Для проведения неспецифической трансдукции отдельную колонию штамма-реципиента растили 18–20 часов в 5 мл среды LB. Из полученной культуры отбирали 200 мкл и засеивали в 10 мл свежей среды LB и растили до достижения OD₆₀₀ = 0,6. Биомассу осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 1 мл MC буфера следующего состава: 100 mM MgSO₄, 5 mM CaCl₂. Готовили серию десятикратных разведений суспензии фаговых частиц, полученных в результате инфекции штамма-донора. В пробирке на 1,5 мл смешивали 200 мкл суспензии клеток штамма-реципиента и 100 мкл суспензии фаговых частиц, смесь инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Ровно через 20 минут в суспензию добавляли 1,2 мл LB с цитратом натрия (готовили заранее, смешивая 1 мл LB с 200 мкл 1M цитрата натрия) и

инкубировали 2 часа при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием, промывали 1 мл физиологического раствора и ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора, содержащего цитрат натрия в концентрации 100 мМ. Суспензию клеток высевали на агаризованную LB с 2,5 мМ цитратом натрия и антибиотиком, устойчивость к которому переносили из донора в реципиент. Чашки инкубировали при 37°C. В качестве контроля высевали фаговую суспензию и суспензию клеток реципиента. Структуру целевого геномного локуса анализировали с помощью ПЦР с колоний.

2.12 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Гель-электрофорез проводили в форезных камерах Sub Cell GT (Bio-Rad, США). Анализ плазмидной ДНК и фрагментов ДНК проводили в 1 % агарозных гелях в горизонтальных блоках при напряженности электрического поля не более 14 В/см. Разделение проводили в TAE буфере следующего состава (г/л): Трис основание – 4,84, ЭДТА – 0,29 и ледяная уксусная кислота – 1,14 мл/л. После электрофоретического разделения гель окрашивали в растворе бромистого этидия и ДНК визуализировали в проходящем УФ-свете при помощи системы гель-документирования Gel-Doc (BioRad, США). Для оценки размеров фрагментов ДНК использовали маркерные фрагменты «1 kb DNA Ladder» (Thermo Fisher Scientific, США).

2.13 Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля

Фрагмент геля с необходимым фрагментом ДНК вырезали скальпелем и переносили в пробирку. Элюцию ДНК проводили с помощью набора реагентов и колонок «QIAquick Gel Extraction Kit» (QIAGEN, США) согласно протоколу производителя.

2.14 Конструирование геномной библиотеки

Геномная библиотека – это коллекция произвольных фрагментов ДНК, экспрессирующиеся с идентичных векторов и представляющие весь геном определенного организма в виде перекрывающихся фрагментов. Для конструирования геномной библиотеки в качестве ДНК использовали

хромосому штамма B1817. В качестве вектора была выбрана среднекопийная плаزمида pBR322 (Bolivar et al., 1977b; Watson, 1988). Хромосомную ДНК выделяли согласно протоколу, описанному в пункте 2.5. Количество выделенной хромосомной ДНК анализировали с помощью гелеэлектрофореза. Выделенную хромосомную ДНК обрабатывали рестриктазой Bsp143I таким образом, чтобы основная часть получаемых фрагментов хромосомной ДНК имела длину 1–6 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.), после чего эти фрагменты вырезали и очищали с помощью препаративного гелеэлектрофореза. Этот размер ДНК-фрагментов был выбран исходя из того, что кодирующая область (открытая рамка считывания) большинства функциональных генов находится в пределах 1,5–4 т.п.н. Линеаризованную по уникальному сайту *Bam*HI pBR322 лигировали с ранее выделенными фрагментами хромосомной ДНК по липким концам. Полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL1 Blue. После электропорации клетки ресуспендировали в 200 мл среды LB, содержащей 200 мг/л ампициллина, и растили до стационарной фазы. Далее выделяли плазмидную ДНК из выращенной культуры и разбавляли до концентрации 10 нг/мкл.

Репрезентативность полученной геномной библиотеки pBR-B1817 анализировали по ее способности комплементировать мутации, вызывающие неспособность утилизации лактозы и L-арабинозы. Этот эксперимент проводили с использованием двух штаммов B1709 и B1710. Штамм B1709 несет мутацию в гене *lacZ*, которая вызывает неспособность клеток использовать лактозу в качестве единственного источника углерода, тогда как B1710 дефектен по *araB*, что нарушает способность клеток утилизировать арабинозу. В результате трансформации геномной библиотеки pBR-B1817 в штаммы B1709 и B1710 и последующего отбора трансформантов на агаризованной M9, содержащей либо лактозу, либо арабинозу в качестве единственного источника углерода, были отобраны трансформанты, восстановившие способность утилизировать лактозу в случае с B1709, и арабинозу, в случае с B1710 (данные не представлены). Полученные

результаты подтвердили репрезентативность pBR-B1817 и позволили использовать сконструированную геномную библиотеку для ее дальнейшего скрининга многокопийных супрессоров дефекта по транспорту треонина в условиях избытка изолейцина.

Скрининг сконструированной геномной библиотеки pBR-B1817 на предмет наличия многокопийных супрессоров дефекта по транспорту треонина проводили следующим образом: библиотеку pBR-B1817 трансформировали в дефектный по синтезу и транспорту треонина штамм с последующим высевом на агаризованную M9 с добавлением непермиссивной концентрацией треонина для отбора трансформантов, восстановивших способность поглощать треонин. Чашки инкубировали в течение 3 дней и отобранные колонии повторно рассеивали на той же среде для выделения плазмиды с последующим секвенированием вставок.

2.15 Секвенирование вставок хромосомной ДНК и хромосомы *E. coli*

Нуклеотидную последовательность вставок хромосомной ДНК на плазмидном векторе pBR322 определяли секвенированием по Сэнгеру (Sanger et al., 1977) с использованием праймеров 999 и 1891. Полученные риды анализировали с помощью breseq - инструмента для поиска мутаций относительно эталонной последовательности (Deatherage and Barrick, 2014). Он сообщает об однонуклеотидных мутациях, точечных вставках и делециях в аннотированном формате HTML.

2.16 Фенотипические тесты

Для оценки скорости роста дефектных по синтезу и транспорту треонина клеток, одиночную колонию тестируемого штамма инокулировали в 5 мл LB с соответствующими антибиотиками, после чего пробирку инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем, биомассу из 1 мл ночной культуры осаждали центрифугированием в течение 5 мин при $4000 \times g$, дважды отмывали средой M9, ресуспендировали в 1 мл той же среды с добавлением 0,2% глюкозы и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. После инкубирования, культуру

повторно отмывали М9, определяли OD₆₀₀, после чего суспензию разбавляли М9 до получения OD₆₀₀ ≈ 0,1. Готовили разведения от 10⁰ до 10⁻⁵. Капли суспензий объемом 4 мкл наносили на агаризованную среду М9 с 0,2% глюкозой и добавками различных аминокислот, в зависимости от условий эксперимента. Затем, чашки инкубировали при 37°C в течение 2 дней и отслеживали динамику роста анализируемых штаммов.

2.17 Измерение активности поглощения аминокислот

Меченые L-[U-¹⁴C]-треонин и L-[U-¹⁴C]-серин были получены из Moravek Biochemicals (США). Карбонилцианид м-хлорфенилгидразон (CCCP) и натриевая соль монензина (Монензин А) были получены из Sigma-Aldrich (США).

Для измерения активности транспорта L-[U-¹⁴C]-треонина и L-[U-¹⁴C]-серина клетки растили в течение ночи при 37°C в среде М9 с 0,2% глюкозы и, при необходимости, антибиотиков. Штаммы, несущие плазмиды, растили в той же среде с добавлением 100 мг/л ампициллина. При выращивании ауксотрофных по треонину штаммов в среду добавляли 50 мМ треонина. На следующий день измеряли оптическую плотность ночной культуры при OD₆₀₀ и на основании полученного значения культуру разбавляли в 20 мл той же среды до OD₆₀₀ ≈ 0,0625. Клетки растили до OD₆₀₀ ≈ 0,5. Все последующие действия выполняли на льду. Клетки осаждали центрифугированием в полипропиленовых пробирках объемом 50 мл при 5000 × g и 4°C в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а клетки дважды промывали 25 мл среды М9. Затем биомассу ресуспендировали в 1 мл среды М9 и переносили в предварительно охлажденную пробирку объемом 1,5 мл. Затем клетки собирали центрифугированием в течение 45 с в охлажденном до 4°C роторе микроцентрифуги при 12000 × g и удаляли супернатант. Осадок суспендировали в 400–600 мкл среды М9, измеряли оптическую плотность и разбавляли в М9 с 0,2% глюкозы до OD₆₀₀ ≈ 6,4. Добавляли хлорамфеникол до конечной концентрации 50 мкг/мл для остановки синтеза белка. Клеточную суспензию и растворы, содержащие меченые субстраты, растворенные в среде

М9 с 0,2% глюкозы, предварительно инкубировали отдельно в течение 20 мин при 37°C. Для изучения влияния СССР или монензина, их добавляли к суспензии клеток за 15 минут до начала реакции до конечной концентрации 10 мкМ. Поглощение аминокислот инициировали смешиванием клеточной суспензии и раствора субстрата таким образом, чтобы конечное значение оптической плотности культуры в реакционной смеси при $OD_{600} \approx 2$. Реакционную смесь инкубировали при 37°C. Затем периодически, в зависимости от условия эксперимента, отбирали образцы объемом 25 мкл и немедленно фильтровали через нитроцеллюлозные 13-мм мембраны с диаметром пор 0,45 мкм (GVS North America, США), с последующей промывкой 1 мл среды М9. Мембраны высушивали при температуре 37°C в течение 18-20 часов и измеряли радиоактивность, используя 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-106 (4 г 2,5-дифенилоксазола и 0,1 г 2,2'-(1,4-фенилен)бис(5-фенил-1,3-оксазола), растворенных в 1 л толуола, на жидкостном сцинтилляционном спектрометре RackBeta1215 (LKB, Финляндия). В качестве контроля определяли количество радиоактивности, которое адсорбирует мембрана: для каждой концентрации субстрата реакционную смесь без клеток инкубировали, фильтровали, промывали и подсчитывали активность идентично экспериментальным реакциям. Измеренные значения вычитали из значений, полученных в соответствующем эксперименте. Транспортную активность выражали в наномолях субстрата, поглощенного 1 мг сухой биомассы (DCW) за 1 минуту. Величину DCW рассчитывали на основе оптической плотности OD_{600} клеточной суспензии. Соотношение рассчитывали следующим образом: 10 мл аликвоты клеточной суспензии с $OD_{600} \approx 6,4$ готовили для измерения поглощения, как описано выше, и центрифугировали в течение 10 мин при $4000 \times g$. Осадок биомассы промывали один раз 10 мл деионизированной воды, суспендировали в 1 мл воды и переносили в предварительно взвешенную пробирку объемом 2 мл. Пробирку центрифугировали в течение 45 секунд при $12000 \times g$ и насухо отбирали супернатант. Биомассу высушивали при температуре 90°C с

использованием анализатора влажности Ohaus MB120 (Ohaus, США). Соотношение составило 437 мг DCW на литр клеточной суспензии при OD₆₀₀, равном 1.

Для определения кинетических параметров, начальную скорость поглощения строили в двойных обратных координатах против концентрации субстрата, а значения K_M и V_{max} рассчитывали по уравнению Лайнуивера-Берка (Johnson, 2013):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

где S - концентрация субстрата, V_{max} - максимальная скорость реакции, K_M - константа Михаэлиса. Все сравнения проводили с помощью двухстороннего *t*-теста Стьюдента с неравными дисперсиями при уровне значимости 5%.

2.18 Исследование активности промоторов

Для измерения активности промоторов использовали штаммы, несущие на плазмиде транскрипционный фьюжн исследуемого промотора с опероном *luxCDABE Photobacterium luminescens*. Таким образом, мерой активности промотора служила величина RLU/OD₆₀₀ (интенсивность люминесценции (relative luminescens units), нормированная на оптическую плотность культуры). Отдельную колонию такого штамма инокулировали в 5 мл среды LB с добавлением соответствующих антибиотиков, после чего пробирку инкубировали в течение ночи. Биомассу из 1 мл ночной культуры осаждали центрифугированием в течение 1 минуты при 12000 × *g* и промывали средой M9, после чего ресуспендировали в той же среде. Затем, в лунки 96-луночного планшета вносили по 196 мкл среды M9 с 0,2% глюкозы и добавками аминокислот, соответствующими условиям эксперимента. По 4 мкл полученной суспензии клеток вносили в лунки планшета. Планшет инкубировали в течение 18–20 часов при температуре 37°C. Аликвоты по 4 мкл полученной культуры вносили в лунки планшета с прозрачным дном и непрозрачными стенками, содержащие 196 мкл M9 с 0,2% глюкозой и

аминокислотами (точный состав указан в подписях к рисункам). Планшет помещали в спектрофотометр/люминометр BMG CLARIOstar (BMG, Германия), где рост при 37°C с перемешиванием сопровождался измерением OD₆₀₀ и люминесценции культуры через каждые 15 минут в течение 20 часов. Результаты экспериментов анализировали и визуализировали с помощью программных пакетов BMG Mars (BMG, Германия), Microsoft Excel (Microsoft, США) и библиотеки Matplotlib (Hunter, 2007).

2.19 Сравнение активностей промоторов и RBS *in silico*

Для анализа активностей промоторов использовали программное обеспечение «Promoter Calculator» (LaFleur et al., 2022), доступное по адресу https://www.denovodna.com/software/predict_promoter_calculator (дата обращения 30.08.2023, версия ПО 1.0). Анализировали последовательность длиной 200 п.н., предшествующую старт-кодону рамки считывания. В качестве активности промотора использовали величину «Transcription Rate», соответствующую точке начала транскрипции, которая, согласно предсказанию модели, обладает наибольшей активностью из приведённых в списке.

Активность нативных и гетерологичных сайтов связывания рибосом (Ribosome-binding site, RBS) перед генами *asd* и *lysC* сравнивали с помощью программного обеспечения «RBS Calculator» (https://salislab.net/software/predict_rbs_calculator, дата обращения 15.09.2023, версия ПО 2.1). Для анализа использовали последовательность, включающую в себя 50 п.н. перед старт-кодоном, рамку считывания и 50 п.н. после стоп-кодона. Результаты анализа представлены в таблице 6.

2.20 Структурное моделирование и визуализация белков

Структуры белков, предсказанные с помощью AlphaFold 2 (Jumper и др., 2021), были получены из базы данных AlphaFold Protein Structure Database (Varadi и др., 2022). Структуру белка визуализировали с помощью программы UCSF ChimeraX (Pettersen и др., 2021).

2.21 Филогенетический анализ последовательностей транспортных белков

Эволюционное древо было составлено с использованием метода максимального правдоподобия и модели Уилана и Голдмана + Freq. Model (Whelan and Goldman, 2001). Начальные деревья для эвристического поиска были автоматически получены путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененные с использованием модели JTT, а затем выбора топологии с наибольшим значением логарифмического правдоподобия. Дискретное гамма-распределение использовали для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами (пять категорий (+G, параметр = 8,5853)). Эволюционный анализ проводили с использованием MEGA11 (Tamura et al., 2021). Филогенетическую принадлежность транспортеров определяли в соответствии с базой данных классификации транспортеров TCDB (Saier и др., 2021).

2.22 Оценка способности штаммов к биосинтезу треонина

Для изучения накопления треонина, отдельную колонию переносили при помощи стерильной зубочистки в 50-мл пробирку, содержащую 2 мл посевной среды, г/л: дрожжевой экстракт (Biospringer, Франция) – 35; глюкоза – 2,5; NaCl (Химмед, Россия) – 2,5; KH_2PO_4 (Химмед, Россия) – 2,5, pH – 7,2. Посевные культуры растили в течение ночи при 37°C. На следующий день 100 мкл посевной культуры переносили в 50-мл пробирку с 2 мл ферментационной среды, г/л: глюкоза (Roquette Freres, Франция) – 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Химмед, Россия) – 30; кукурузный экстракт (Roquette Freres, Франция) – 10; KH_2PO_4 (Химмед, Россия) – 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Химмед, Россия) – 2; лимонная кислота (Sigma-Aldrich, США) – 0,192; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Химмед, Россия) – 0,03; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Химмед, Россия) – 0,021; CaCO_3 (Sigma, США) – 20, pH 7,2. В зависимости от эксперимента, при необходимости, в среду вносили L-лизин или *meso*-диаминопимелат (Sigma-Aldrich, США). Инокулированные пробирки инкубировали в течение 24 часов при 37 °C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 13000 x g. Супернатант

разбавляли в 3 раза дистиллированной водой и анализировали содержание аминокислот с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ проводили с использованием системы Waters Alliance 2695, оснащенной колонками YMC-Pack Polyamine II (YMC, Киото, Япония) и смесью этилацетат:ацетонитрил:H₂O (4:46:50) в качестве подвижной фазы. Концентрацию треонина определяли с помощью рефрактометра Waters 2414 при 420 нм.

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ¹

3.1 Поиск нового переносчика L-треонина

Впервые вопрос о существовании ранее неизвестной транспортной системы, контролирующей захват треонина, был поднят японскими учеными, которые изучали ростовые потребности и активность ключевых ферментов биосинтеза треонина у промышленного штамма продуцента, полученного в результате случайного мутагенеза и селекции (Okamoto et al., 1997). В ходе исследования было установлено, что повышение продукции треонина у мутантного штамма *E. coli* KY10935 связано с дефектом его транспорта в клетку. Авторы предположили, что этот эффект был достигнут в результате инактивации известных транспортных систем треонина, таких как TdcS и SstT, что привело к снижению внутриклеточной концентрации треонина и, как следствие, к снятию ретроингибирования ключевых ферментов биосинтетического пути. Спустя несколько лет, Крузе с соавторами продемонстрировали, что инактивация TdcS и SstT не вызывает полного исчезновения активности поглощения треонина (Kruse et al., 2001). В частности, при анализе мутантных штаммов с делецией *sstT* было показано,

¹ Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора:

1. Khozov A.A., Bubnov D.M., Plisov E.D., Vybornaya T.V., Yuzbashev T.V., Agrimi G., Messina E., Stepanova A.A., Kudina M.D., Alekseeva N.V., Netrusov A.I., Sineoky S.P. A study on L-threonine and L-serine uptake in *Escherichia coli* K-12 // *Frontiers in Microbiology*. — 2023. — V. 14. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1151716 (JIF – 4; SJR – 1.065, Q1) Вклад автора в печатных листах: (1,5/1,05) (здесь и далее в скобках приведён объем публикаций в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. Хозов А.А., Бубнов Д.М., Выборная Т.В., Кудина М.Д., Степанова А.А., Мелькина О.Е., Молев С.В., Филиппова С.С., Нетрусов А.И., Синеокий С.П. Исследование L-лизина и его транспортера LysP на свойства штамма-продуцента L-треонина // *Биотехнология*. — 2023. — Т. 39. — № 4. — С. 102-108. EDN: OVUMMD (ИФ РИНЦ – 0,5) (0,8/0,64). [Khozov A., Bubnov D., Vybornaya T., Kudina M., Stepanova A., Melkina O., Molev S., Filippova S., Netrusov A., Sineoky S. A Study of the influence of L-lysine and its transporter LysP on the characteristics of the L-threonine producer strain // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2024. — V. 59. — P. 1214-1219. (JIF – 1; SJR – 0,244, Q 3)]

3. Bubnov D.M., Khozov A.A., Vybornaya T.V., Stepanova A.A., Molev S.V., Melkina O.E., Badun G.A., Chernysheva M.G., Skob I.A., Netrusov A.I., Sineoky S.P. Multiple routes for nonphysiological L-threonine uptake in *Escherichia coli* K-12 // *Frontiers in Microbiology*. — 2025. — V. 16. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1579813 (JIF – 4; SJR – 1.065, Q1) (1,27/0,95).

что даже в аэробных условиях они способны поглощать экзогенный треонин. Более того, эта активность ингибируется избытком серина и не зависит от ко-транспорта ионов Na^+ , как в случае с SstT. Исходя из этих результатов авторы пришли к выводу, что клетки *E. coli* содержат по крайней мере еще одну, ранее неидентифицированную транспортную систему, способную поглощать как треонин, так и серин в аэробных условиях. При этом ее активность не связана с переносом Na^+ . Таким образом, совокупность существующих результатов не только подтверждает существование ранее неизвестного переносчика треонина и серина, но и ставит перед исследователями новый вопрос: какая именно транспортная система продолжает функционировать в клетках после инактивации известных пермеаз?

В настоящей работе первым модельным микроорганизмом был выбран штамм *E. coli* B1044. Этот дефектный по синтезу и транспорту треонина мутант был ранее сконструирован в лаборатории с применением как случайного мутагенеза, так и направленных модификаций. В результате B1044 несет в своем геноме как множество неизвестных случайных мутаций, так и направленные модификации: $\Delta thrBC$ $ilvA^{442}$ $rhtA^{23}$ $tdh::\text{Tn5}$ $\Delta tdcBCDE$ $\Delta sstT$. Среди них мутация в гене *rhtA* ($rhtA^{23}$) усиливает экспрессию основного экспортера треонина и гомосерина из клетки RhtA (Livshits et al., 2003). Мутация в гене $ilvA^{442}$ снижает активность треониндеаминазы IlvA, катализирующую первую реакцию пути превращения треонина в изолейцин, тем самым нарушая биосинтез изолейцина, а инактивация гомосеринкиназы *thrB* и треонинсинтазы *thrC* блокирует биосинтез треонина и вызывает ауксотрофность по этой аминокислоте, в результате чего рост полученного мутанта на минимальной среде (M9) зависит от наличия и концентрации экзогенного изолейцина и треонина (Umbarger, 1956; Patrick et al., 2007). Делеция оперона *tdcBCDE* и гена *sstT* ведет к инактивации известных транспортных систем, контролирующих поглощение треонина из культуральной среды (Sumantran et al., 1990; Kim et al., 2002), в результате чего

сконструированный мутант теряет способность эффективно усваивать экзогенный треонин при низких концентрациях, что обуславливает необходимость его повышенного содержания в М9 для поддержания роста.

На первом этапе была исследована способность *E. coli* B1044 потреблять экзогенный треонин путем анализа скорости его роста в зависимости от состава питательной среды. Для этого B1044 протестировали на агаризованной среде М9, дополненной как изолейцином и треонином, так и смесью изолейцина, треонина и серина. В качестве положительного контроля была использована агаризованная М9, содержащая дипептид L-аланил-L-треонин. Результаты фенотипического теста показали, что пороговая концентрация треонина, при которой штамм B1044 начинает расти, составляет 40 мкМ (рис. 2). Добавление серина в 125-кратном избытке по сравнению с треонином подавляет рост тестируемого мутанта, однако при замене треонина на дипептид L-аланил-L-треонин этот эффект не наблюдается, поскольку дипептиды поступают в клетку *E. coli* через другие специфичные для них пермеазы. Таким образом, на штамме B1044 было показано, что в нем все еще присутствует ранее неидентифицированная транспортная система, способная поглощать экзогенный треонин, а ее активность по отношению к треонину ингибируется в присутствии избытка серина.

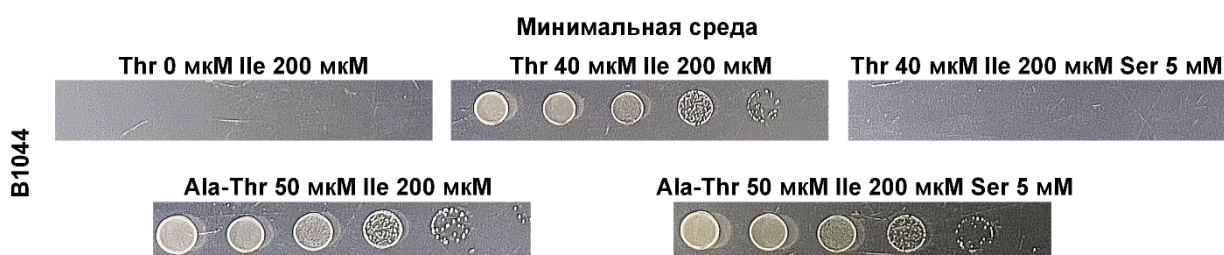


Рисунок 2. Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1044 на агаризованной М9 с добавлением L-треонина или L-аланил-L-треонина в качестве источника L-треонина. В среду добавляли L-изолейцин, поскольку B1044 не способен синтезировать эту аминокислоту. Серин добавляли для оценки его ингибирующего эффекта на транспорт треонина. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин; Ile – L-изолейцин; Ala-Thr – L-аланил-L-треонин; Ser – L-серин.

Поиск гомологов основных транспортеров треонина TdcC и SstT позволил выявить белки с высокой степенью структурного и функционального сходства, которые, потенциально, могут выполнять аналогичные функции. Используя последовательности этих генов и алгоритм *tblastn* (McGinnis and Madden, 2004), было идентифицировано несколько потенциальных кандидатов в геноме штамма *E. coli* MG1655 (идентификатор в GenBank: U00096). Среди них, для *tdcC* было найдено четыре гомолога: (1) *sdaC* (51% гомологии); (2) *yqeG* (31% гомологии); (3) *yhjV* (24% гомологии); (4) *сууР* (25% гомологии). Для *sstT* был обнаружен один гомолог: (1) *gltP* (24% гомологии). YqeG и YhjV являются неохарактеризованными мембранными белками, которые на основании их аминокислотной последовательности и предсказанной структуры относятся к предполагаемым транспортерам семейства НАААР, к которому также принадлежат TdcC и SdaC. Ген *сууР* кодирует L-цистеин-специфическую пермеазу, которая входит в семейство НАААР и, вместе с L-цистеин-десульфидазой (СууА), поддерживает рост в анаэробных условиях с цистеином в качестве единственного источника азота или углерода/энергии (Zhou and Imlay, 2022). GltP контролирует H⁺-зависимое поглощение L-глутамата и L-аспартата и принадлежит семейству DAACS, в которое входит и ранее охарактеризованный переносчик SstT (Schellenberg and Furlong, 1977). Среди них, только для SdaC было косвенно показано, что этот белок обладает исключительным сродством к серину и не проявляет активности по отношению к треонину, поскольку усиление экспрессии клонированного *sdaC* приводит к увеличению скорости захвата серина, и эта активность не подвержена ингибированию избытком треонина (Hama et al., 1988; Shao et al., 1994). В результате, на основании анализа базы данных Есосус (<https://ecocyc.org>; дата доступа: 10.07.2019) и литературных данных было установлено, что ни для одного из этих генов функции переноса треонина ранее показано не было. Это указывало на необходимость экспериментальной проверки их возможного участия в поглощении треонина.

Учитывая количество возможных кандидатов, была выдвинута гипотеза, что в захвате треонина может быть задействовано более одного из выбранных транспортеров. В этом случае инактивация одного из выбранных генов может не вызвать фенотипических изменений в скорости роста мутантов. Поэтому, для одновременного получения всех возможных комбинаций мутаций, был использован подход, подразумевающий введение стоп-кодонов во все пять генов посредством λ -Red-опосредованной рекомбинации (Ellis et al., 2001; Wang et al., 2009; Sawitzke et al., 2011). В результате трансформации клеток B1044 смесью мутагенизирующих олигонуклеотидов и анализа роста нескольких тысяч мутантов на агаризованной M9, содержащей треонин в концентрации 40 мкМ, был отобран клон, обозначенный как B1082, который не был способен расти в этих условиях. B1082 показал значительное повышение пороговой концентрации и стал требовать более 700 мкМ треонина для роста (рис. 3). В то же время, фенотип на M9 с дипептидом L-аланил-L-треонином, в качестве источника треонина, остался неизменным (рис. 3). Полученные результаты указывали на то, что у мутанта нарушена функция поглощения треонина.



Рисунок 3. Сравнение скорости роста дефектного по синтезу и транспорту треонина B1044 и его мутантного производного B1082 на агаризованной M9 с добавлением L-треонина или L-аланил-L-треонина в качестве источника L-треонина в присутствии изолейцина. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин; Ile – L-изолейцин, Ala-Thr – L-аланил-L-треонин.

Неожиданно, в результате секвенирования целевых локусов, на которые был направлен мутагенез, не было выявлено никаких генетических изменений. Вероятнее всего, это было связано с тем, что в ходе мутагенеза для экспрессии генов Red была использована плаزمида pDL14 (Bubnov et al., 2018), несущая

доминантно-негативный аллель *mutS*^{K622A}, продукт которого приводит к нарушению активности системы репарации неспаренных оснований в клетках *E. coli* (Bubnov et al., 2018; Iyer et al., 2020). Следовательно, отобранный мутант мог нести спонтанную мутацию в произвольном локусе генома. Действительно, при секвенировании всего генома B1082 было идентифицировано четыре мутации по сравнению с родительским штаммом, а именно замены C→T, C→T и A→T в координатах 127840, 1123865, и 3691123, соответственно, и делецию одного нуклеотида в координате 3980951 (все координаты соответствуют последовательности хромосомы с идентификатором GenBank U00096.3). Среди них только последняя делеция затрагивала транспортный белок, поскольку представляла собой сдвиг рамки считывания в 22-м кодоне ORF *yifK*. Этот ген кодирует предполагаемый мембранный белок, который, на основании его аминокислотной последовательности и предсказанной структуры, относится к суперсемейству симпортеров аминокислот APC. YifK имеет 46% гомологии аминокислотной последовательности с ProY из *E. coli*, который, вероятнее всего, опосредует захват пролина (Liao et al., 1997). Кроме того, YifK на 44% гомологичен пермеазе ароматических аминокислот AroP, контролирующей поглощение L-фенилаланина ($K_M = 0,47$ мкМ), L-тирозина ($K_M = 0,57$ мкМ) и L-триптофана ($K_M = 0,4$ мкМ) в симпорте с H⁺ (Brown, 1970; Young et al., 1999). Учитывая описанные функции гомологов YifK, а также его предсказанную локализацию в цитоплазматической мембране, было выдвинуто предположение, что ухудшение способности мутанта B1082 поглощать экзогенный треонин связано с инактивацией YifK.

Для исключения влияния нелокализованных мутаций, а также изолейциновой ауксотрофности, дальнейшее исследование гена *yifK* было продолжено на ранее сконструированном штамме B1426, изогенном производном дикого штамма MG1655, несущего делеции генов *thrBC sstT* и *tdcBCDE*. В результате инактивации гена *yifK* в B1426 был получен штамм B1817. Неожиданно, но анализ фенотипа B1817 не показал ухудшения его

роста по сравнению с B1426 на агаризованной M9 с треонином, как это наблюдалось для пары B1044 и B1082. Подавление роста B1817 происходило только если в среду был внесен изолейцин (рис. 4). Это могло указывать на то, что, некоторые специфичные для изолейцина транспортные системы, все еще функционируют в B1817 и они проявляют свою активность по отношению к треонину при условии отсутствия изолейцина в среде.



Рисунок 4. Анализ скорости роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1426 и его одинарных, двойных и тройных мутантных производных, лишенных систем YifK, BrnQ и LIV-I, на агаризованной M9 с L-треонином или L-аланил-L-треонином в качестве источника L-треонина. В качестве обозначений модификаций генов: wt – дикий тип, Δ - делеция. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин; Ile – L-изолейцин; Ala-Thr – L-аланил-L-треонин.

Основываясь на полученных результатах, была предпринята попытка идентифицировать транспортную систему активную в штамме B1817. Была выдвинута гипотеза, что амплификация гена, кодирующего этот неизвестный переносчик на многокопийной плазмиде приведет к увеличению его экспрессии и, следовательно, повышению его транспортной активности, чего может быть достаточно для захвата треонина даже в условиях ингибирования или репрессии в присутствии изолейцина. Для проверки этой гипотезы была сконструирована геномная библиотека на основе среднекопийной плазмиды pBR322 и хромосомной ДНК штамма *E. coli* B1817, согласно протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы». Использование этого штамма позволило сконструировать геномную библиотеку, не содержащую как ранее охарактеризованных транспортных систем *sstT* *tdcBCDE*, так и идентифицированного в настоящей работе гена *yifK*.

Библиотеку pBR-B1817 трансформировали в штамм B1817 с последующим отбором трансформантов, способных расти при

непермиссивных условиях, а именно на агаризованной среде М9 в присутствии 40 мкМ треонина и 200 мкМ изолейцина. На втором этапе, из отобранных трансформантов были выделены плазмиды для последующего секвенирования геномных вставок с использованием праймеров 999 и 1891. В результате был идентифицирован ген *brnQ* как многокопийный супрессор дефекта транспорта треонина в условиях избытка изолейцина. Согласно базе данных транспортеров, BrnQ принадлежит к семейству симпортеров ВСАА-аминокислот (#2.A.26; The branched chain amino acid:cation symporter (LIVCS/LIV-II) family). Белки этого семейства участвуют в поглощении ВСАА в симпорте с Na^+ или H^+ (Saier et al., 2021). Так, например, BraV из *P. aeruginosa* и близкий гомолог BrnQ из *S. typhimurium* контролируют поглощение ВСАА, среди них для BraV показано сопряжение реакции переноса с Na^+ (Anderson and Oxender, 1978; Hoshino et al., 1990b). Ввиду его высокой аминокислотной гомологии с транспортером BrnQ из *S. typhimurium* считается, что в клетках *E. coli* он участвует в поглощении L-лейцина, L-валина и L-изолейцина в симпорте с Na^+ (Ohnishi et al., 1998), тем не менее, экспериментально эта функция не была подтверждена. Исходя из полученных результатов была сформулирована гипотеза, что *brnQ*, будучи специфичным для изолейцина переносчиком, также участвует в процессе поглощения треонина, когда изолейцин исключается из среды. В этом случае инактивация BrnQ в штамме B1817 должна привести к ухудшению его способности поглощать экзогенный треонин и сдвинуть вверх пороговую концентрацию треонина, необходимую для его роста. Однако, результаты фенотипического анализа B1851, изогенного производного B1817, в котором был инактивирован *brnQ*, не показали каких-либо изменений в динамике его роста, включая ингибирование роста изолейцином (рис. 4).

Наиболее вероятным объяснением наблюдаемого фенотипа являлась возможная активность по отношению к треонину транспортной системы LIV-I. В клетках *E. coli* система LIV-I относится к семейству ABC-транспортеров, кодируется опероном *livKHMGF* и геном *livJ* и представляет

собой высокоаффинную АТФ-зависимую транспортную систему L-лейцина ($K_M = 2,3$ мкМ), L-изолейцина ($K_M = 8,0$ мкМ), L-валина ($K_M = 2,4$ мкМ) и L-фенилаланина ($K_M = 19$ мкМ) (Koynagi et al., 2004). Ранее было показано, что треонин незначительно ингибирует активность LIV-I по отношению к фенилаланину (Koynagi et al., 2004). Эти наблюдения служат косвенным подтверждением того, что система LIV-I может быть вовлечена в захват треонина. Действительно, экспериментальное подтверждение этой гипотезы было получено при фенотипическом анализе роста тройного мутанта B1895, являющегося изогенным производным B1851, в котором дополнительная инактивация LIV-I привела к значительному ухудшению способности клеток поглощать экзогенный треонин. Сконструированный мутант стал требовать более 1,3 мМ субстрата для своего роста на агаризованной М9, вне зависимости от содержания изолейцина в среде, что в 32,5 раза превышает концентрацию треонина, необходимую для роста его предков B1426, B1817 и B1851 (рис. 4).

Для фенотипической оценки вклада каждой из идентифицированных транспортных систем в поглощение треонина были сконструированы штаммы, в геноме которых сохранён лишь один активный переносчик — YifK (B2289), BrnQ (B2288) или LIV-I (B1851). В качестве положительного и отрицательного контроля были использованы B1426 (*yifK^{wt} brnQ^{wt} livKHMGF^{wt}*) и B1895 ($\Delta yifK \Delta brnQ \Delta livKHMGF$). В результате анализа их способности к росту на агаризованной М9, в зависимости от концентрации треонина, а также смеси треонина и изолейцина, треонина и серина, было сделано несколько выводов (рис. 5). Во-первых, как и ожидалось, контрольный штамм B1426, в котором активны все три транспортные системы, демонстрировал нормальный рост при 40 мкМ L-треонина в М9. В то же время штамм B1895, лишенный всех трёх переносчиков, показал значительное снижение способности поглощать экзогенный треонин и стал требовать более 1,3 мМ для своего роста. Полученные результаты свидетельствуют о значительном снижении проницаемости клеточной

мембраны клеток для треонина вследствие инактивации YifK, LIV-I и BrnQ. Штамм B2289, в котором функционирует YifK, рос при всех протестированных концентрациях треонина (рис. 5). Этот результат свидетельствует о способности клеток эффективно поглощать треонин при посредстве YifK. Внесение в среду избытка серина, но не изолейцина, подавляло рост B2289, что указывало на то, что серин может выступать в роли конкурентного ингибитора и, соответственно, второго субстрата для YifK. Таким образом, YifK, вероятнее всего, обладает двойной субстратной специфичностью и способен переносить как треонин, так и серин, что согласуется с результатами исследования Крузе (Kruse et al., 2001).

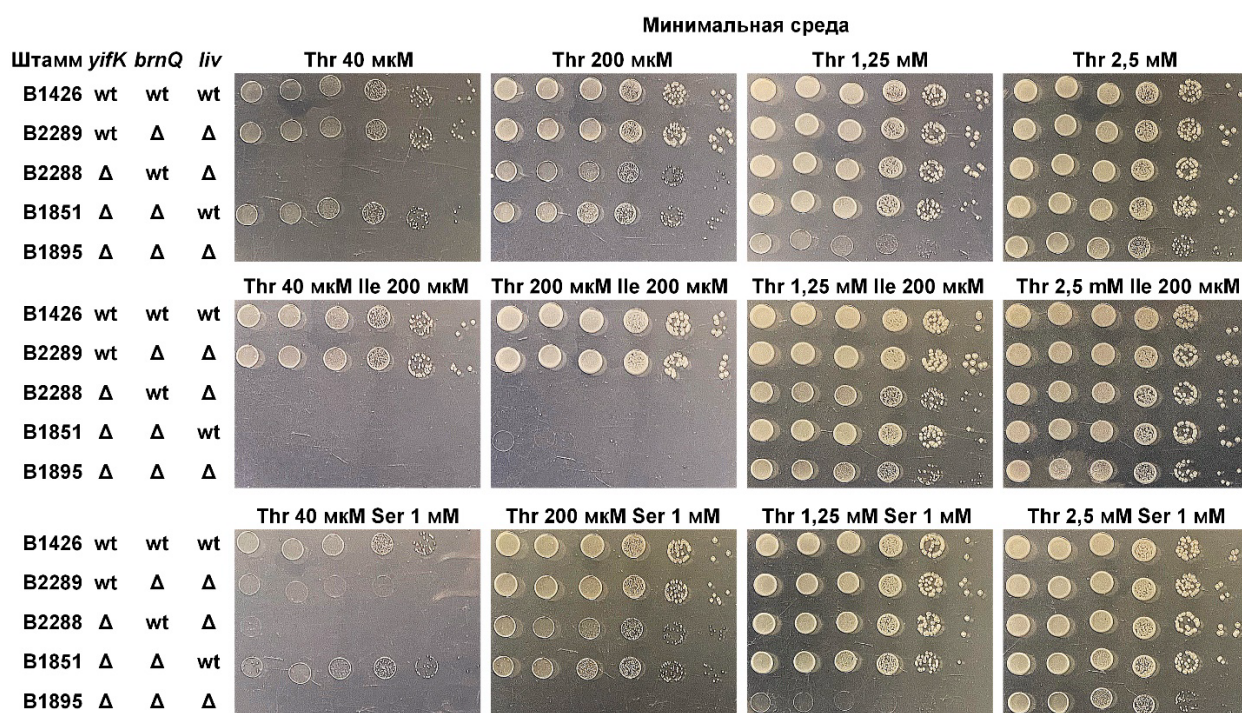


Рисунок 5. Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1426 и его двойных мутантных производных, несущих YifK, BrnQ и LIV-I в качестве единственной транспортной системы треонина, при постепенном увеличении концентрации L-треонина на агаризованной M9. Влияние конкурирующих субстратов (L-изолейцина и L-серина) оценивали по их способности ингибировать рост клеток. В качестве отрицательного контроля был взят штамм B1895, несущий делеции во всех трёх исследуемых генах. Обозначений мутаций: wt – дикий тип, Δ - делеция. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин; Ile – L-изолейцин; Ala-Thr – L-аланил-L-треонин; Ser - серин.

Из результатов фенотипического анализа также следовало, что транспортные системы YifK и LIV-I вносят сопоставимый вклад в процесс захвата треонина, поскольку соответствующие мутанты B2289 и B1851 росли схожим образом (рис. 5). Однако следует отметить, что избыток серина лишь незначительно влияет на рост клеток, транспортирующих треонин через систему LIV-I, а изолейцин выражено подавляет рост штамма вследствие конкурентного ингибирования транспорта основным субстратом. Вклад BrnQ, в качестве единственного транспортера в штамме B2288, был виден только при концентрации треонина в среде, превышающей 200 мкМ (рис. 5). Этот фенотип, вероятнее всего означает, что BrnQ обладает более низким сродством к треонину по сравнению с YifK и LIV-I и его активность проявляется при высоких концентрациях субстрата в среде. Отсутствие влияния серина на транспортную активность BrnQ свидетельствует о его неспособности выступать в качестве субстрата для данного переносчика, а подавление роста в присутствии избытка изолейцина, напрямую связано с конкурентным ингибированием, поскольку BrnQ является транспортером ВСАА-аминокислот. Полученные данные подтверждают, что все три системы, YifK, BrnQ и LIV-I, вносят вклад в потребление экзогенного треонина. Среди них YifK обладает дополнительным сродством к серину, а BrnQ эффективно функционирует только при высоких концентрациях субстрата в среде, что указывает на его ограниченную роль в поглощении этой аминокислоты при физиологически нормальных условиях.

3.2 Исследования активности транспорта YifK, BrnQ и LIV-I по отношению к L-треонину и L-серину *in vitro*

В отличие от фенотипических тестов, которые дают только общее представление о росте и способности клеток усваивать субстрат, прямое измерение активности транспорта позволяет точно оценить количество захваченного субстрата, а также измерить ее скорость. Измерение активности транспорта *in vitro* были проведены в соответствии с описанием в разделе «Материалы и методы». Перед началом измерений, во всех исследуемых

штаммах была восстановлена способность к биосинтезу треонина. Благодаря тому, все этапы приготовления клеток, включая выращивание ночных культур, были выполнены в M9 без добавления этого субстрата. Для этого, с помощью P1vir-трансдукции, дикий оперон *thrABC* был восстановлен в штаммах B2289, B1851, B2288, B1895 и B1426, в результате чего были получены их изогенные прототрофные производные, в которых активны YifK (B2396), LIV-I (B2370) или BrnQ (B2395), а также B2374 (*yifK^{wt} brnQ^{wt} livK^{HMGF}*) и B2394 ($\Delta yifK \Delta brnQ \Delta livK^{HMGF}$), в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. В ходе прямого измерения активности YifK, BrnQ и LIV-I по отношению к треонину *in vitro* с использованием живых клеток и меченого L-[U-¹⁴C]-треонина, была измерена динамика накопления треонина клетками полученных мутантов (рис. 6А).

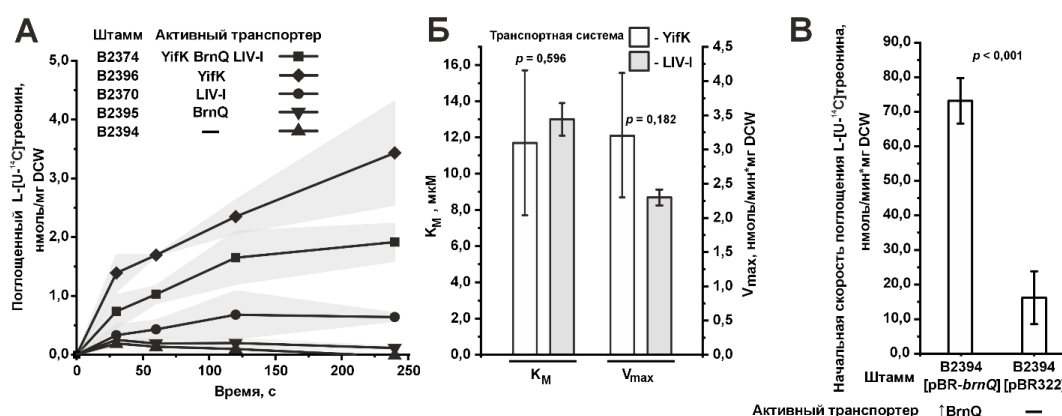


Рисунок 6. Биохимическое исследование транспортных систем YifK, BrnQ и LIV-I. Планки погрешностей обозначают SD. Показанные значения *p* были рассчитаны с использованием двустороннего *t*-критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. Измерения были выполнены в трёх биологических повторах. **А** - Динамика накопления L-треонина клетками штамма B2374 и его двойных мутантных производных, несущих YifK, BrnQ и LIV-I в качестве единственной транспортной системы треонина. В качестве отрицательного контроля был использован штамм B2394, несущий делеции во всех трёх исследуемых генах. Время реакции составляло 240 с, концентрация треонина в среде – 50 мкМ. Затененная область обозначает SD. **Б** - Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции для транспортных систем YifK и LIV-I по отношению к L-треонину. **В** – Сравнение активности транспорта L-треонина в штамме B2394 с инактивированными транспортерами YifK, BrnQ и LIV-I, с активностью в штамме B2394[pBR-brnQ], гиперэкспрессирующего *brnQ* благодаря мультикопийной плазмиде pBR-brnQ. Символ ↑ обозначает гиперэкспрессию. Время реакции составляло 1 мин, концентрации треонина в среде – 800 мкМ.

Согласно результатам, приведенным на рисунке 6А, при концентрации 50 мкМ треонина в реакционной смеси, тройной мутант B2394 полностью потерял способность накапливать экзогенный треонин. При анализе клеток, в которых активна одна из идентифицированных транспортных систем, было обнаружено, что в условиях этого эксперимента активность наблюдается только у клеток, несущих YifK и LIV-I в штаммах B2396 и B2370, соответственно. В то же время низкий уровень поглощения в штамме B2395 был ожидаем, поскольку в фенотипических тестах активность BrnQ проявлялась лишь при концентрации треонина, превышающей 200 мкМ в среде. Полученные результаты согласуются с фенотипическими тестами, подтверждая вывод о том, что транспортные системы YifK, BrnQ и LIV-I ответственны за основную активность по отношению к треонину в клетках, лишенных SstT и TdcC. Среди них YifK и LIV-I вносят наибольший вклад в эту активность. Интересно, что B2396 с YifK в качестве единственного транспортера накапливал треонин даже быстрее, чем положительный контроль B2374. Это несоответствие, возможно, основано на взаимодействии транспортных систем, связанном с регуляцией экспрессии, зависящей от внутриклеточного пула аминокислот.

Ключевыми характеристиками транспортных систем являются K_M (константа Михаэлиса), V_{max} (максимальная скорость), субстратная специфичность, а также механизм регуляции синтеза и активности переносчика, которые, в совокупности, описывают кинетику реакции и дают важную информацию о функциональных особенностях транспортера. Ввиду высокой скорости поглощения треонина системами YifK и LIV-I, для этих систем удалось измерить и рассчитать кинетические параметры. Для YifK и треонина в качестве субстрата измеренное значение K_M составило $11,7 \pm 4,0$ мкМ, а V_{max} было определено как $3,2 \pm 0,9$ нмоль/мин*мг DCW (рис. 6Б). Сравнив эти данные с системой TdcC, для которой K_M составляет 6,0 мкМ (Sumantran et al., 1990), можно сделать вывод, что YifK обладает чуть меньшим сродством к треонину по сравнению с TdcC.

При определении кинетических параметров системы LIV-I не удалось получить результатов, на основании которых можно было бы определить K_M и V_{max} с помощью построения графика в двойных обратных координатах. Вероятно, это было обусловлено значительным вкладом некоторых неспецифических транспортных систем в поглощение треонина. Для повышения активности LIV-I и увеличения чувствительности анализа систему оверэкспрессировали, клонировав локус *livJ-panZ-livKHMGF* в малокопийный вектор pMW118, в результате чего была получена плаزمиды pMW-*liv*. Измеренные значения K_M и V_{max} для LIV-I по отношению к треонину в штамме B2394 несущем плазмиду pMW-*liv* составили $13,0 \pm 0,9$ мкМ и $22,2 \pm 0.09$ нмоль/мин*мг DCW, соответственно (рис. 6Б). Очевидно, что данная оценка V_{max} была сильно завышена из-за оверэкспрессии генов LIV-I на плазмиде pMW118. Чтобы скорректировать это значение, было измерено отношение удельной скорости поглощения треонина в клетках штаммов B2394[pMW-*liv*] и B2370[pMW118] с одной хромосомной копией локуса *livJ-panZ-livKHMGF*. Скорость поглощения треонина в штамме B2394[pMW-*liv*] была в 9,65 раз выше по сравнению с B2370[pMW118]. На основании этой оценки, скорректированное значение V_{max} LIV-I системы, в штамме, несущем дикий локус в одной копии, составило $2,3 \pm 0.09$ нмоль/мин*мг DCW (рис. 6Б). Таким образом, сравнение данных по кинетическим параметрам LIV-I позволяет заключить, что в дополнение к своим основным функциям, она также является высокоаффинной транспортной системой треонина, что подтверждается значениями K_M .

Получение достоверных значений K_M и V_{max} для транспортной системы BrnQ и треонина в качестве субстрата в рамках данного исследования оказалось невозможным, поскольку при измерении кинетических параметров B2395 скорость реакции не достигала насыщения даже при концентрации треонина 1 мМ в среде. Однако, при данной концентрации наблюдалась значительная активность поглощения треонина в клетках тройного мутанта, что приводит к искажению результатов. В связи с этим, вклад системы BrnQ в

процесс захвата треонина был подтвержден альтернативным методом. Как и в случае с LIV-I, для улучшения чувствительности, измерение активности BrnQ было проведено в штамме B2394, гиперэкспрессирующем *brnQ* на плазмиде pBR-*brnQ*, полученной при скрининге геномной библиотеки. В качестве контроля был использован штамм B2394, несущий пустой вектор pBR322. Измерение активности поглощения треонина, при концентрации субстрата 800 мкМ в реакционной смеси, показало увеличение скорости транспорта в клетках B2394[pBR-*brnQ*] примерно в 4,5 раза по сравнению с контрольным штаммом B2394[pBR322] (рис. 6B). Кроме того, фенотипический анализ штаммов, несущих дикий аллель *brnQ* (B1426, B2288) и мутантный Δ *brnQ* (B1818, B1895) на агаризованной M9 с добавлением высоких концентраций треонина показал, что инактивация *brnQ* придает клеткам устойчивость к треонину (рис. 7), что свидетельствует о снижении проницаемости клеточной мембраны к этому субстрату в результате инактивации BrnQ. Совокупность полученных результатов однозначно подтверждает участие BrnQ в поглощении треонина. Во-первых, BrnQ является многокопийным супрессором дефекта транспорта треонина. Во-вторых, инактивация BrnQ придает клеткам устойчивость к токсичным концентрациям треонина. Наконец, активность по отношению к треонину возрастает в штамме, гиперэкспрессирующем этот транспортер.

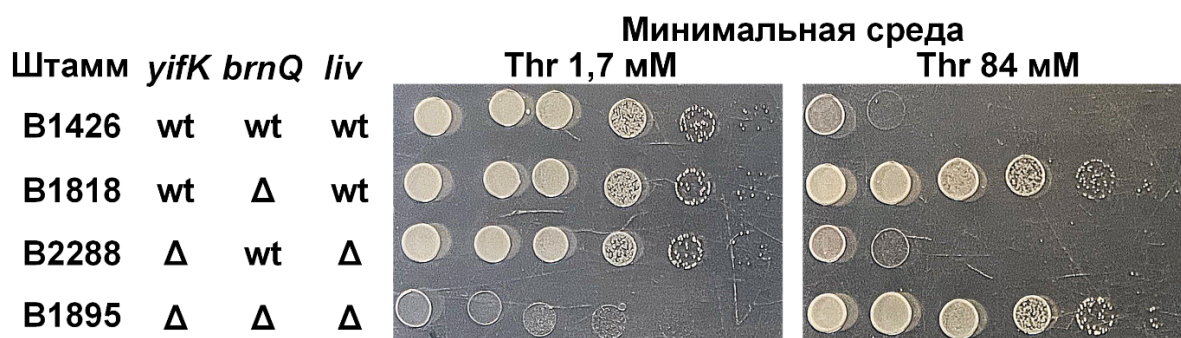


Рисунок 7. Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1426 и его одинарных, двойных и тройных мутантных производных, лишенных систем BrnQ (B1818), YifK и LIV-I (B2288), YifK BrnQ и LIV-I (B1895) на агаризованной M9 с L-треонином в качестве источника L-треонина в концентрации 1,7 и 84 мМ. В качестве обозначений модификаций генов: wt – дикий тип, Δ - делеция. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов прямо указывают на то, что наряду с YifK и LIV-I, BrnQ вносит значимый вклад в поглощение треонина при его физиологичной концентрации в среде, а его активность при нефизиологично высоком содержании треонина становится доминирующей.

3.2.1 YifK – H⁺-зависимый высокоаффинный переносчик L-треонина и L-серина

Ранее, в ходе фенотипических тестов было установлено, что избыток серина подавляет рост мутанта, в котором YifK является единственной активной транспортной системой треонина (рис. 5). Этот факт указывал на конкурентное ингибирование серином активности YifK по отношению к треонину и возможность того, что серин также является субстратом YifK. В результате прямого измерения активности по отношению к меченому треонину было показано, что трёхкратный избыток немеченого серина практически полностью ингибирует активность YifK, что подтверждает его способность взаимодействовать с двумя субстратами (рис. 8А). Наконец, анализ активности в паре B2429 ($\Delta sstT \Delta tdcC \Delta sdaC \Delta yifK$) и B2430 ($\Delta sstT \Delta tdcC \Delta sdaC yifK^{wt}$), изогенных производных B2394 и B2396, в которых инактивированы все известные транспортеры серина, показал, что активность транспорта в B2429 незначительна, тогда как штамм с диким аллелем *yifK* эффективно накапливает серин (рис. 8Б). Интересно, что при концентрации серина 50 мкМ скорость потребления этого субстрата системой YifK оказалась даже выше, чем скорость потребления треонина. Это позволило определить кинетические параметры системы YifK по отношению к серину. Измеренное значение K_M составило $89,4 \pm 7,9$ мкМ, а V_{max} $14,4 \pm 0,6$ нмоль/мин*мг DCW. Сравнительный анализ транспортных систем показал, что YifK обладает наименьшей субстратной специфичностью к серину по сравнению с SdaC и SstT, что позволяет расположить его в ряду: YifK < SdaC < SstT (Hama et al., 1988; Kim et al., 2002).

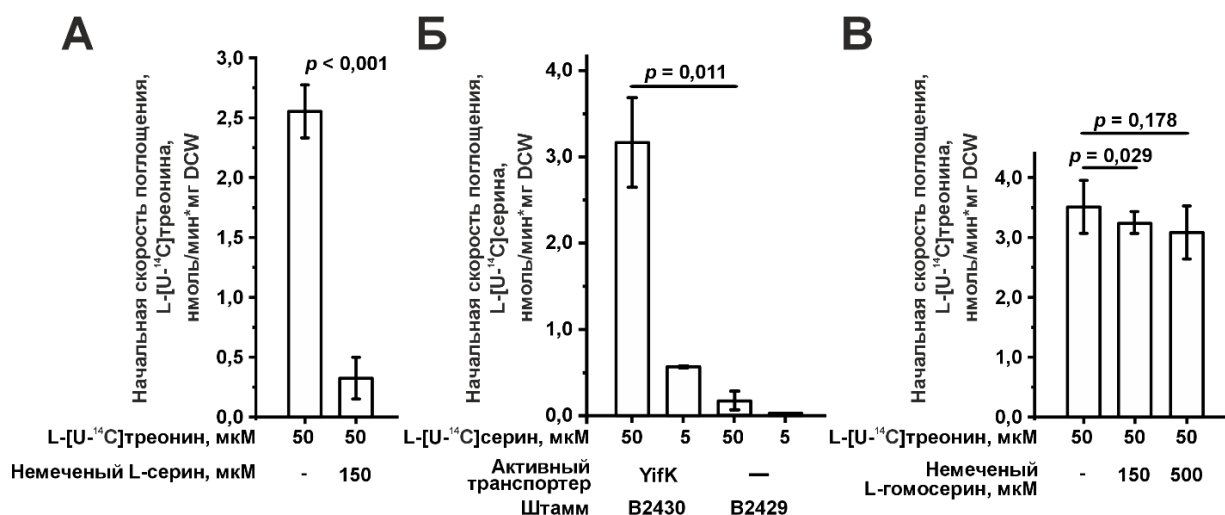


Рисунок 8. Анализ активности YifK по отношению к серину. **А** - Влияние избытка немеченого серина на скорость транспорта треонина, опосредуемого YifK. Измерения были проведены в клетках штамма B2396. Время реакции составляло 1 мин. **Б** – Активность YifK по отношению к серину. Эксперименты были проведены на клетках штамма B2430, лишённого всех известных транспортеров L-серина, и его производного Δ*yifK* штамма B2429 при указанных концентрациях L-серина и времени реакции 1 мин. **В** - Влияние избытка L-гомосерина на транспорт треонина, опосредуемый YifK. Измерения были проведены в клетках штамма B2396. Время реакции составляло 1 мин. Показанные значения представляют собой среднее значение трёх биологических повторов. Планки погрешностей обозначают SD. Показанные значения p были рассчитаны с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента с неравными дисперсиями.

Ввиду структурного сходства серина и гомосерина, была проанализирована способность YifK транспортировать последний. При измерении скорости транспорта меченого треонина системой YifK, в присутствии избытка немеченого гомосерина, не было выявлено снижения его активности (рис. 8В), что свидетельствует об отсутствии конкурентного ингибирования и сродства переносчика к этому субстрату.

Для выявления возможного сродства YifK к другим аминокислотам была проведена оценка его активности по отношению к треонину в присутствии 10-кратного избытка каждой из 19 немеченых аминокислот. Согласно полученным данным (рис. 9), ни одна из протестированных аминокислот, за исключением серина, не оказывала значимого ингибирующего эффекта на активность YifK. Полученные результаты однозначно подтверждают, что YifK обладает высокой специфичностью

исключительно к треонину и серину. Вместе с тем можно заметить, что валин, метионин и, в большей степени, глутамин, напротив, способствовали увеличению скорости транспорта треонина, повышая его накопление почти в два раза. Этот эффект может указывать на наличие механизмов аллостерической регуляции или косвенного влияния данных аминокислот на активность YifK. Однако природа этого взаимодействия пока остаётся неясной и требует дальнейших детальных исследований.

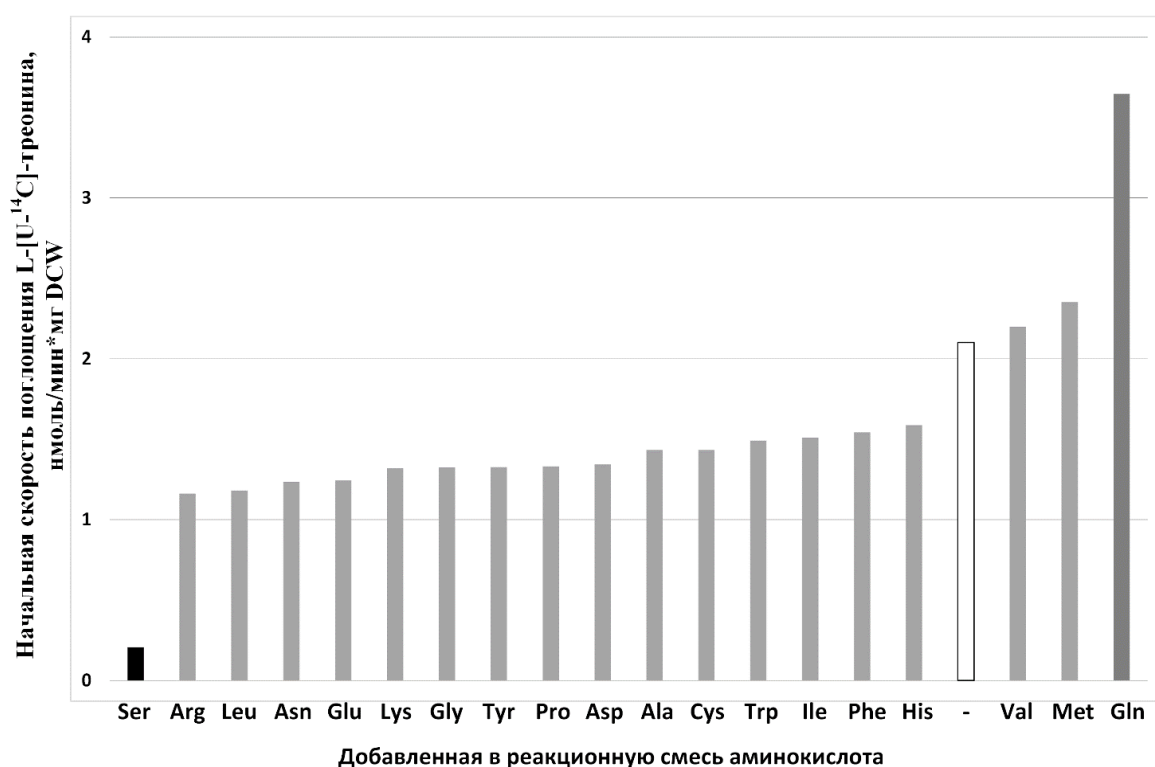


Рисунок 9. Результаты ингибиторного анализа активности YifK по отношению к треонину в присутствии 10-кратного избытка 19 немеченых аминокислот в реакционной смеси. Белым обозначена удельная скорость транспорта треонина в реакционной смеси без добавления других аминокислот, черным – максимальное ингибирование активности при добавлении немеченого серина в реакционную смесь. Время реакции составляло 1 мин, аминокислоты добавляли до конечной концентрации 500 мкМ при концентрации треонина в смеси 50 мкМ. Обозначения аминокислот: Ser – L-серин; Arg – L-аргинин; Leu – L-лейцин; Asn – L-аспарагин; Glu – L-глутамат; Lys – L-лизин; Gly – L-глицин; Tyr – L-тирозин; Pro – L-пролин; Asp – L-аспарагиновая кислота; Ala – L-аланин; Cys – L-цистеин; Trp – L-триптофан; Ile – L-изолейцин; Phe – L-фенилаланин; His – L-гистидин; Val – L-валин; Met – L-метионин; Gln – L-глутамин.

Следующим шагом стало изучение механизма энергизации транспорта YifK. Ввиду того, что YifK относится к суперсемейству APC, он, вероятнее всего, наиболее близок к транспортерам, использующим ионный градиент в качестве источника энергии. Среди известных механизмов ионного энергозависимого транспорта аминокислот у бактерий наиболее распространены Na^+ и H^+ зависимый симпорт. Чтобы установить, какой из них характерен для YifK, был проведён ряд экспериментов, направленных на изучение влияния ионного состава среды, а именно катионов Na^+ и K^+ , и специфических ионофоров на его активность. Для этого B2396 растили в стандартной M9, однако этапы промывки клеток и реакцию поглощения меченого треонина проводили в модифицированной среде M9, содержащей либо K^+ , либо только Na^+ , в качестве единственного моновалентного катиона, или их смесь. В ходе экспериментов было выявлено, что ни замена Na^+ на K^+ , ни добавление в реакционную смесь, содержащую K^+ вместо Na^+ , различных концентраций Na^+ существенно не влияют на активность YifK (рис. 10А). Полученные результаты свидетельствуют о том, что перенос треонина с участием YifK не сопряжён с переносом ионов Na^+ и, вероятнее всего, осуществляется за счёт протонного симпорта.

Для подтверждения этой гипотезы был исследован эффект специфических ионофоров — монензина и CCCP — на активность YifK. Монензин является ионофором, способным образовывать комплексы с моновалентными катионами (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Ag^+ , Tl^+) и переносить их через мембрану в результате Na^+/H^+ -обмена (Pinkerton and Steinrauf, 1970; Huczyński et al., 2007; Nakazato and Hatano, 1991). Следовательно, монензин переносит катионы Na^+ внутрь клеток и снижает их концентрацию на внешней стороне мембраны. В свою очередь, CCCP действует как протонофор, разрушая протонный градиент (Kaback и др., 1974). Внесение монензина к клеточной суспензии в концентрации 10 мкМ за 15 минут до измерения реакции поглощения треонина, не оказало влияния на активность YifK (рис. 10Б), в то время как добавление CCCP в аналогичной концентрации, привело к

трёхкратному снижению активности транспорта треонина (рис. 10В). Полученные результаты прямо указывают на то, что активность YifK не зависит от Na^+ градиента, а транспорт субстратов происходит в симпорте с H^+ .

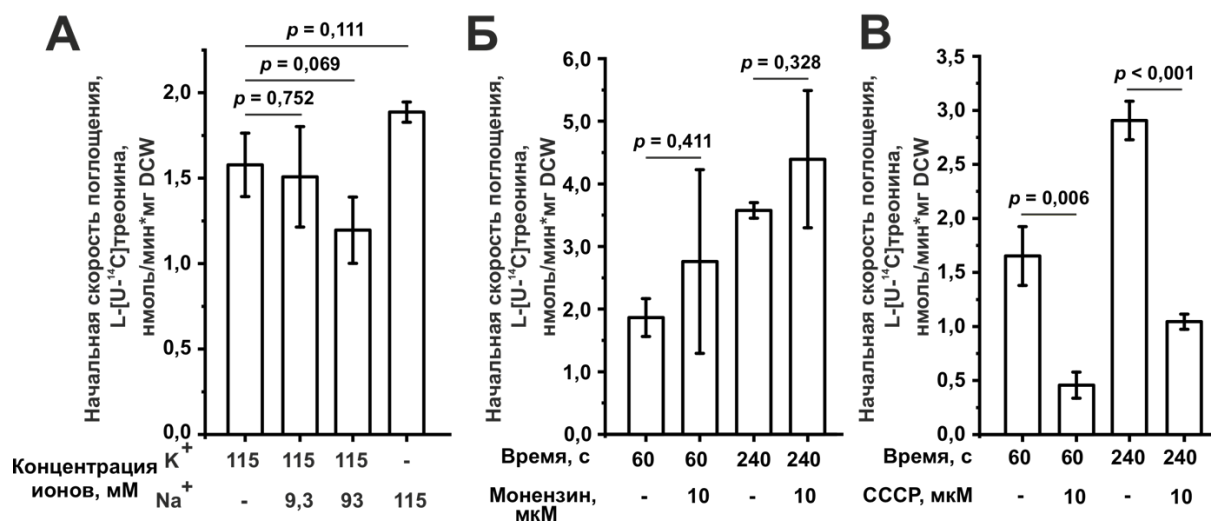


Рисунок 10. Исследование механизма энергизации транспорта треонина посредством YifK. Показанные значения представляют собой среднее значение трёх биологических повторов. Планки погрешностей обозначают SD. Показанные значения p были рассчитаны с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. Эксперименты были проведены с использованием клеток штамма B2396 при 50 мкМ треонина в реакционной смеси. **А** - Влияние ионного состава реакционной смеси на транспорт L-треонина, опосредуемый YifK. Время реакции – 60 сек. **Б** - Влияние монензина на транспорт L-треонина, опосредуемый YifK. **В** - Влияние CCCP на транспорт L-треонина, опосредуемый YifK.

Описание YifK было продолжено анализом регуляции синтеза данной системы. В одной из недавних работ было показано, что транскрипция ортолога *yifK* из *S. enterica* репрессируется регуляторным белком Lrp (Yang et al., 2014). В настоящей работе этот механизм был проверен для *E. coli* с использованием репортерного транскрипционного фьюжна P_{yifK} -*luxCDABE*, позволяющего количественно оценить уровень экспрессии гена в различных условиях. Для этого была сконструирована плазмида pDEW-*yifK*, содержащая транскрипционный фьюжн промотора *yifK* с опероном *luxCDABE* из *Photobacterium luminescens*, обеспечивающим биолюминесцентный сигнал, пропорциональный уровню экспрессии. Плазмида pDEW-*yifK* была трансформирована в клетки штамма MG1655, несущего дикий аллель *lrp*, и в

его изогенный производный штамм B2678, несущий делецию в гене *lrp*. Уровень экспрессии оценивали в среде M9 без добавок, а в случае с диким *lrp* также анализировали влияние на экспрессию 1 мМ смеси лейцина и изолейцина, изолейцина и треонина. Для количественной оценки уровня экспрессии рассчитывали величину удельной люминесценции (RLU/OD_{600}) и строили графики её зависимости от оптической плотности клеточной культуры (OD_{600}) (рис. 11).

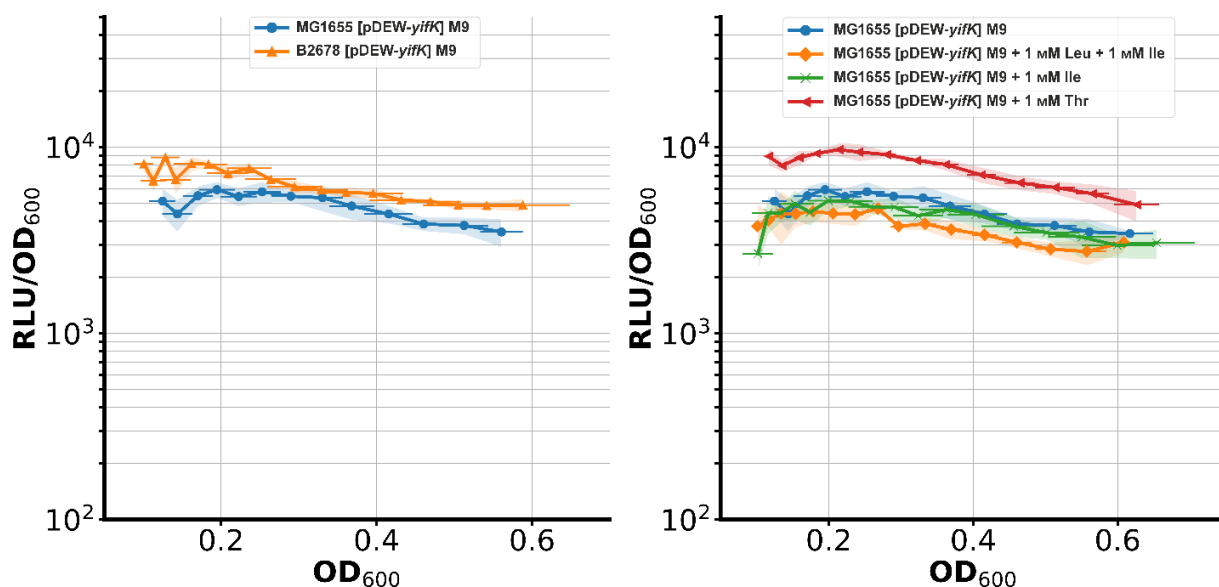


Рисунок 11. Зависимости удельной биолуминесценции (RLU/OD_{600}) культуры штаммов MG1655 и мутантного производного B2678 (Δlrp) несущих плазмиду $P_{yifK-luxCDABE}$ от их оптической плотности (OD_{600}) в среде M9 без добавок, и штамма MG1655 в среде M9 и присутствии смеси лейцина и изолейцина, изолейцина, и треонина. Концентрации вносимых добавок обозначены на рисунке. Обозначения: Leu – лейцин, Ile – изолейцин, Thr – треонин. RLU – Relative Luminescence Unit. Каждый эксперимент был выполнен в 3-х биологических повторностях. Горизонтальные планки погрешностей обозначают стандартное отклонение для величины OD_{600} , затемненные области – для отношения RLU/OD_{600} .

Полученные результаты указывают на то, что Lrp не участвует в регуляции транскрипции *yifK* в M9 (рис. 11A). В клетках, несущих дикий аллель *lrp*, внесение лейцина и изолейцина также не оказывает влияния на уровень экспрессии *yifK*, в то время как культивирование клеток с треонином несколько повышает уровень транскрипции.

На следующем этапе было проведено исследование влияния наличия функционального Lrp в клетках и лейцина в питательной среде на скорость потребления треонина клетками, несущими YifK в качестве единственного транспортера треонина. В отличие от предыдущего эксперимента, полученные таким образом результаты отражают непосредственно уровень экспрессии YifK, как функционального белка, а не только уровень транскрипции соответствующего гена. В эксперименте были использованы штамм B2396 (*yifK^{wt} ΔbrnQ ΔlivKHMGF*) и его изогенный мутант B2462 (*yifK^{wt} ΔbrnQ ΔlivKHMGF Δlrp*), а также контрольный штамм B2394 (*ΔbrnQ ΔyifK ΔlivKHMGF*) и его изогенный мутант B2460 (*ΔbrnQ ΔyifK ΔlivKHMGF Δlrp*). Неожиданно, но инактивация Lrp, а также внесение лейцина на фоне *lrp^{wt}*, способствовало увеличению активности поглощения треонина клетками *yifK*-мутанта B2460 (рис. 12А, 12Б). Это указывает на существование дополнительных, неидентифицированных, но все еще функционирующих транспортных систем, активность которых находится под негативным контролем Lrp. При анализе действия Lrp и лейцина на скорость потребления треонина было установлено, что лейцин не оказывает влияния на уровень экспрессии YifK, что соответствует результатам, полученным в ходе анализа активности промотора. Однако, инактивация Lrp приводит к снижению активности поглощения треонина системой YifK (рис. 12А), в то время как ранее было показано (рис. 11), что Lrp не влияет на уровень ее транскрипции. Таким образом, можно допустить, что Lrp влияет на уровень активности YifK косвенно с участием других регуляторных факторов, которые, вероятно, влияют на эффективность трансляции или стабильность YifK.

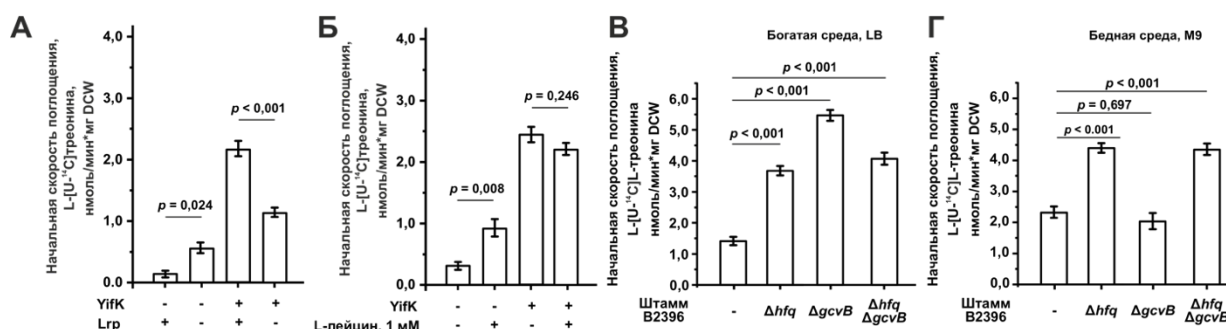


Рисунок 12. Исследование механизмов регуляции экспрессии YifK. Показанные значения представляют собой среднее значение трёх биологических повторов. Планки погрешностей обозначают SD. Показанные значения p были рассчитаны с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. Время реакции при измерении активности транспорта составляло 1 мин, концентрации треонина в среде – 50 мкМ. Обозначения: (-) или Δ – ген инактивирован, (+) – ген активен. **А** - Влияние аллельного состояния транскрипционного регулятора Lrp на активность поглощения треонина в B2394 ($yifK^-$) и B2396 ($yifK^+$). **Б** – Влияние присутствия лейцина в реакционной смеси на активность поглощения треонина клетками B2394($yifK^-$) и B2396($yifK^+$). **В** - Влияние аллельного состояния регуляторов hfq и $gcvB$ на активность YifK по отношению к L-треонину в штамме B2396 в богатой среде LB. **Г** - Влияние аллельного состояния регуляторов hfq и $gcvB$ на активность YifK по отношению к L-треонину в штамме B2396 в бедной среде M9.

В продолжение исследования механизма регуляции синтеза YifK был изучен вклад мРНК GcvB и РНК-шаперона Hfq. Согласно ранее опубликованному исследованию, GcvB ингибирует трансляцию $yifK$ в *S. enterica* путем взаимодействия с последовательностью мРНК, расположенной непосредственно перед сайтом Шайна-Дальгарно. Генетический анализ взаимодействия GcvB с $yifK$ *S. enterica* показал, что целевая последовательность GcvB в мРНК $yifK$ содержит энхансерный элемент. Мутации, нарушающие структуру энхансера и снижающие уровень транскрипции $yifK$, приводят к полной нечувствительности $yifK$ к репрессии GcvB (Yang et al., 2014). В рамках настоящей работы было исследовано влияние аллельного состояния $gcvB$ и hfq на активность YifK по отношению к треонину в богатой среде LB и минимальной (бедной) среде M9. В качестве контроля был использован штамм B2396, а опытными служили его изогенные производные, несущие мутации hfq (B2738), $gcvB$ (B2739) и $hfq gcvB$ (B2753).

Согласно полученным результатам, инактивация как Hfq, так и GcvB привела к увеличению активности YifK в клетках *E. coli* при культивировании в LB (рис. 12B). При этом удаление *gcvB* оказало более выраженный эффект, чем инактивация *hfq*. При одновременной инактивации обоих регуляторов аддитивного эффекта не наблюдалось. В двойном мутанте $\Delta hfq \Delta gcvB$ скорость поглощения треонина снижалась до уровня, характерного для одинарного мутанта Δhfq . Напротив, в клетках *S. enterica* ранее было показано (Yang et al., 2014), что инактивация *hfq* усиливает экспрессию *yifK* в большей степени, чем удаление GcvB, а их совместная инактивация проявляется аддитивно. Частичное расхождение полученных результатов может быть обусловлено как различиями в механизмах действия GcvB и Hfq на экспрессию *yifK* в клетках *E. coli* и *S. enterica*, так и различием в используемых подходах к оценке активности YifK. В работе Янга (Yang et al., 2014) экспрессию *yifK* анализировали с помощью β -галактозидазы в качестве репортера, тогда как в настоящем исследовании оценивалась непосредственно активность YifK. Таким образом, выявленные различия могут отражать как видоспецифические особенности регуляции, так и различия в условиях эксперимента.

В бедной среде M9 повышение активности YifK в клетках *E. coli* наблюдалось исключительно при инактивации *hfq*, тогда как удаление *gcvB* не оказывало влияния на эту активность ни в случае одиночной мутации $\Delta gcvB$, ни двойной $\Delta hfq \Delta gcvB$. Полученные данные свидетельствуют о том, что Hfq может регулировать экспрессию *yifK* независимо от GcvB. Отсутствие влияния аллельного состояния *gcvB* на активность YifK, по-видимому, связано с тем, что в M9 транскрипция *gcvB* репрессируется ввиду отсутствия в питательной среде глицина (Urbanowski et al., 2000), что нивелирует влияние GcvB на уровень экспрессии YifK. Это объясняет отсутствие различий в активности между штаммами B2396 (*gcvB*^{wt}) и B2739 ($\Delta gcvB$) в минимальной среде. Возможно, по этой же причине активность YifK в мутанте Δhfq , выращенном в M9, была сопоставима с активностью в двойном мутанте $\Delta hfq \Delta gcvB$,

выращенном в LB: в первом случае репрессия *gcvB* снижает его негативное влияние, а во втором — регулятор полностью отсутствует. Вместе с тем остаётся неясным, почему активность YifK в клетках B2396 и B2396 $\Delta gcvB$, выращенных в M9, значительно ниже, чем в мутанте $\Delta gcvB$, выращенном в LB. Это может быть связано с факторами регуляции, отличными от Lrp, GcvB и Hfq, изменяющими уровень экспрессии в зависимости от состава питательной среды. Несмотря на это, продемонстрированные результаты убедительно свидетельствуют о том, что экспрессия YifK в *E. coli* зависит как от мРНК GcvB, так и от РНК-шаперона Hfq, причём последний, вероятно, реализует свою функцию частично независимо от GcvB. Однако, учитывая сложность взаимодействий между этими регуляторами и их мишенью, полное понимание механизма регуляции экспрессии YifK посредством GcvB и Hfq требует дальнейшего исследования.

3.2.2 Активность LIV-I по отношению к L-серину

Из литературных данных известно, что система LIV-I представляет собой высокоаффинную, АТФ-зависимую транспортную систему L-лейцина, L-изолейцина, L-валина и L-фенилаланина (Koyanagi et al., 2004), а ее экспрессия регулируется посредством различных механизмов, основной составляющей которых является концентрация лейцина (Oxender and Quay, 1976; Anderson and Oxender, 1977). В настоящем исследовании впервые была экспериментально подтверждена способность системы LIV-I осуществлять транспорт треонина, а также определены кинетические параметры этой реакции. Завершающим этапом стало определение субстратной специфичности LIV-I к серину, поскольку ранее, в ходе фенотипических тестов, было показано (рис. 5), что серин незначительно подавляет рост клеток, экспрессирующих хромосомную копию LIV-I на агаризованной M9 с треонином.

Сравнительный анализ активности LIV-I по отношению к серину *in vitro*, в дефектном по транспорту серина штамме B2458 ($\Delta sstT \Delta tdcC \Delta yifK \Delta sdaC$) и его изогенном производном B2429 ($\Delta sstT \Delta tdcC \Delta yifK \Delta sdaC$)

ΔlivKHMGF), не выявил значительных различий в способности клеток поглощать серин (рис. 13). Для повышения чувствительности анализа была измерена активность поглощения серина в штаммах, гиперэкспрессирующих LIV-I благодаря плазмиде *pMW-liv*. В B2394[*pMW-liv*], где присутствует *SdaC*, наблюдалось лишь небольшое увеличение скорости транспорта серина по сравнению с контрольным штаммом B2394[*pMW118*], что подтверждает активность *SdaC* как основного переносчика. Однако, в штамме B2429[*pMW-liv*], лишённом всех известных пермеаз, специфичных к серину, наблюдалась высокая активность по отношению к серину, сопоставимая с активностью *SdaC*, что свидетельствует о способности LIV-I переносить серин. На основании полученных данных можно заключить, что система LIV-I может участвовать в транспорте серина, однако, ее активность при физиологически нормальных условиях незначительна.

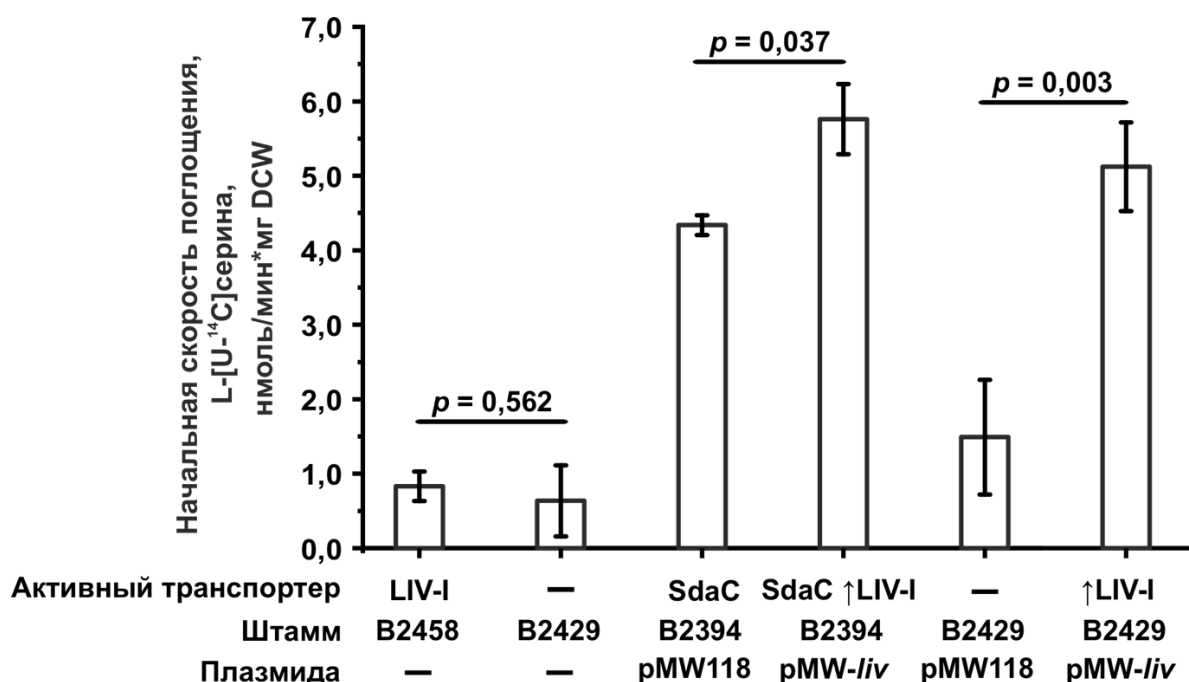


Рисунок 13. Исследование активности LIV-I по отношению к L-серину. Планки погрешностей обозначают SD. Показанные значения представляют собой среднее значение трёх биологических повторов. Показанные значения *p* были рассчитаны с использованием двустороннего *t*-критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. Скорость поглощения измеряли при 100 мкМ L-серина в реакционной смеси. Время реакции составляло 1 мин. Вертикальная стрелка ↑LIV-I указывает на гиперэкспрессию LIV-I в штаммах, несущих плазмиду *pMW-liv*. Показанные значения представляют собой среднее значение трёх биологических повторов.

3.3 Механизмы поглощения L-треонина при нефизиологичных концентрациях субстрата в среде

Совокупность полученных результатов позволяет однозначно заключить, что, наряду с ранее описанными транспортными системами SstT и TdcC, идентифицированные переносчики YifK, BrnQ и LIV-I являются белками, для которых транспорт треонина – физиологически релевантная функция. Их инактивация привела к многократному падению активности транспорта треонина в мутанте B2394 (рис. 6A). Однако, даже в этих условиях клетки сохраняли способность поглощать экзогенный треонин, так как ауксотрофный по треонину и изогенный по отношению к B2394 штамм B1895 рос на агаризованной M9 при концентрации треонина выше 1,25 мМ (рис. 5). Более того, *in vitro* анализ показал (рис. 12A), что, вероятнее всего, в клетках присутствует дополнительная специфичная к треонину транспортная система, которая находится под негативным контролем со стороны Lgr. Представленные данные позволили предположить, что в клетке все еще активны неизвестные низкоаффинные транспортные системы, способные переносить треонин. В связи с этим была предпринята попытка идентифицировать их в штамме B1895.

3.3.1 Скрининг многокопийных супрессоров дефекта по транспорту L-треонина, вызванного инактивацией SstT, TdcC, YifK, LIV-I и BrnQ

Для выявления пермеаз, проявляющих активность по отношению к треонину на генетическом фоне $\Delta sstT \Delta tdcC \Delta brnQ \Delta livK$ HMGF $\Delta yifK$ была использована неспособность ауксотрофного по треонину штамма B1895 расти на среде M9 при концентрациях треонина менее 1,25 мМ. В результате электропорации B1895 геномной библиотекой pBR-B1817 были отобраны трансформанты, восстановившие рост на агаризованной M9, содержащей 1 мМ треонина. Секвенирование хромосомных вставок из выделенных плазмид позволило идентифицировать ранее описанные в литературе гены *sdaC*, *alaE* и *proP*, кодирующие мембранные транспортные системы, для которых функции переноса треонина показано не было. Из литературы известно, что

AlaE (TC #2.A.104; The L-Alanine Exporter (AlaE) Family) является H^+ -зависимым антипортером, который переносит L-аланин из цитоплазмы в периплазматическое пространство (Kim et al., 2015). ProP представляет собой H^+ -зависимую транспортную систему суперсемейства MFS, которая опосредует поглощение осмолитов, таких как L-пролин и глицин-бетаин, а также осмопротекторов таурина, эктоина, карнитина, пипеколата, пролин-бетаина и N,N-диметилглицина (Milner et al., 1987; McLaggan and Epstein, 1991; Jebbar et al., 1992; Gouesbet et al., 1994; Verheul et al., 1998). Основной функцией ProP является защита клетки в условиях гиперосмотического стресса (Grothe et al., 1986). Для белка SdaC, как уже упоминалось, было показано исключительное сродство к серину. Помимо перечисленных генов, среди многокопийных супрессоров были обнаружены гены *yjeM*, *ychE*, *ydgl*, *yqeG* и *yhjE*, функция которых на настоящий момент неизвестна. Анализ аминокислотных последовательностей идентифицированных «у»-белков указывает на их принадлежность к различным семействам мембранных транспортеров, однако их точная функция остается неизвестной или спорной, что подтверждается литературными данными и информацией из базы EcoCyc (Keseler и др., 2021). YjeM относится к семейству антипортеров глутамат/γ-аминомасляной кислоты (TC #2.A.3.7; The Glutamate:GABA Antiporter (GGA) Family), а YdgI - к семейству антипортеров основных аминокислот (TC #2.A.118; The Basic Amino Acid Antiporter (ArcD) Family). Для YchE (TC #2.A.95.1.7; Putative amino acid transporter) показана мембранная локализация и предсказаны 6 трансмембранных домена с С-концевым участком, расположенным в периплазме (Daley et al., 2005). YqeG является неохарактеризованным членом семейства НАААР и его экспрессия индуцируется супернатантом стационарной фазы *E. coli*, возможно, под действием сигналов кворум-сенсинга (Ren et al., 2004). YhjE принадлежит к семейству протон-зависимых симпортеров (TC #2.A.1.6; The Metabolite: H^+ Symporter (MHS) Family). Таким образом, вместе с ранее охарактеризованными генами *sdaC*, *alaE* и *proP*, все идентифицированные

многокопийные супрессоры ассоциированы с клеточной мембраной и вероятнее всего опосредуют транспорт метаболитов.

3.3.1.1 Фенотипический анализ многокопийных супрессоров

В ходе фенотипического анализа было подтверждено, что амплификация *sdaC*, *alaE*, *proP*, *yjeM*, *ychE*, *ydgl*, *yqeG* и *yhjE* на векторе pBR322 способствует восстановлению роста B1895 при непермиссивных концентрациях треонина на агаризованной М9 (рис. 14). По фенотипическому тесту можно заключить, что оверэкспрессия *sdaC*, *proP*, *alaE*, *yhjE*, *ychE*, *ydgl* и *yjeM* оказывает схожее положительное влияние на рост клеток, в то время как усиление экспрессии *yqeG* стимулирует рост клеток в меньшей степени. Кроме того, в отличие от других многокопийных супрессоров, *sdaC*, и в меньшей степени *yhjE*, будучи амплифицированным на плазмиде pBR-*sdaC* и pBR-*yhjE* соответственно, придают клеткам чувствительность к высоким концентрациям треонина. Это указывает на их существенный вклад в остаточную активность поглощения треонина.

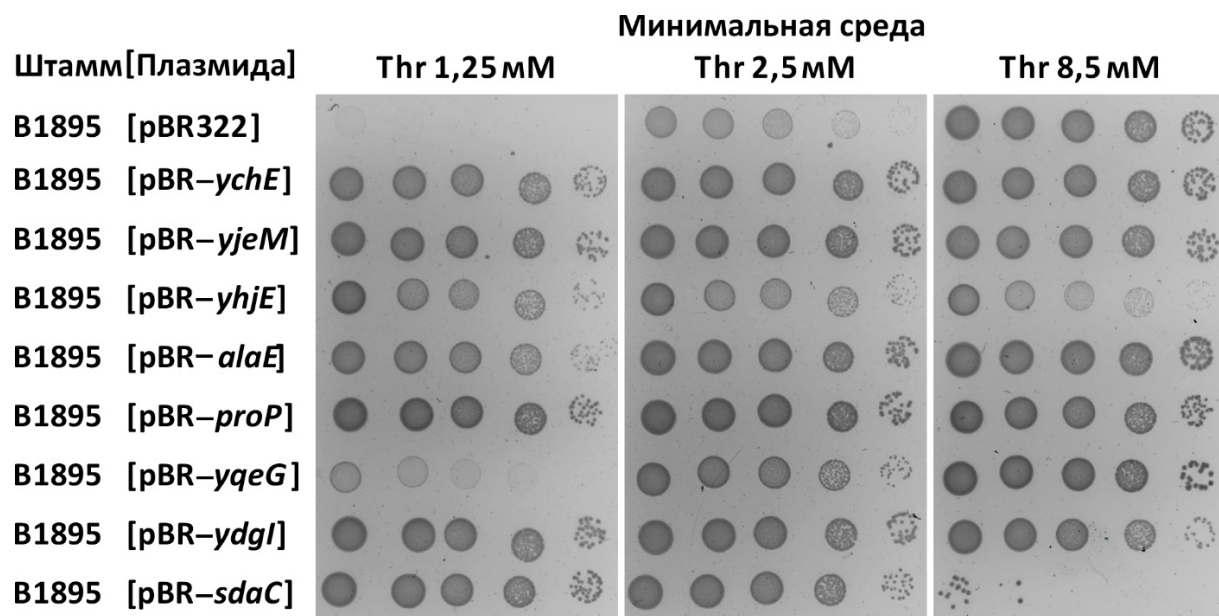


Рисунок 14. Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1895, лишённого всех известных специфических систем поглощения треонина и его производных, несущих плазмиды pBR-*ychE*, pBR-*yjeM*, pBR-*yhjE*, pBR-*alaE*, pBR-*proP*, pBR-*yqeG*, pBR-*ydgl* и pBR-*sdaC* на агаризованной М9 при концентрации треонина 1,25 мМ, 2,5 мМ и 8,5 мМ. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин.

Фенотипический анализ влияния инактивации многокопийных супрессоров на рост штамма B1895 в зависимости от концентрации треонина в агаризованной M9 показал (рис. 15), что делеция *yhjE* и *sdaC* приводит к выраженному дефекту роста B2722 и B2794, соответственно, тогда как инактивация остальных генов не вызывает значительных фенотипических изменений. Это может быть обусловлено сравнительно низким вкладом *proP*, *alaE*, *ychE*, *ydgl*, *yjeM* и *yqeG* в поглощение треонина, который остается незначительным в штамме, несущем дикие аллели, но становится заметным при их амплификации на многокопийном векторе.

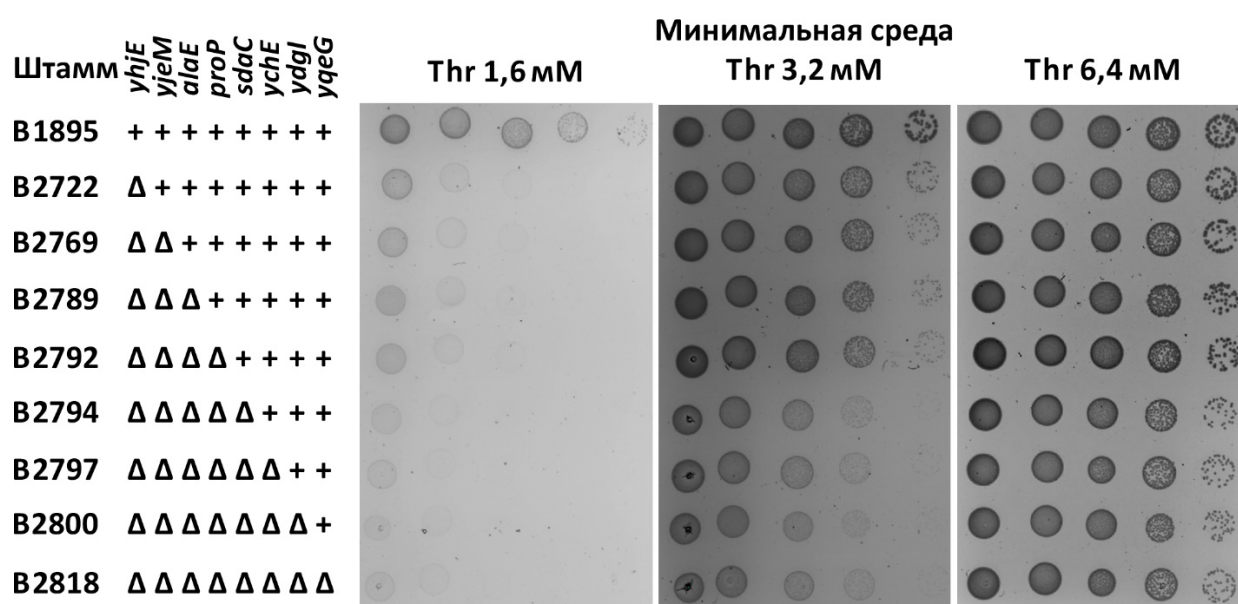


Рисунок 15. Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту штамма B1895, лишённого всех известных специфических систем поглощения треонина и его мутантных производных на агаризованной M9 при концентрации треонина 1,6 мМ, 3,2 мМ и 6,4 мМ. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин. Модификации генов: + – дикий тип, Δ - делеция.

Интересно, что мутант B2818, лишённый всех известных транспортеров треонина, а также восьми найденных многокопийных супрессоров, сохраняет способность к росту на среде, содержащей 6,4 мМ треонина (рис. 15). Этот факт свидетельствует о наличии дополнительных, неидентифицированных транспортных систем. За наблюдаемую остаточную активность могут отвечать многосубъединичные комплексы, гены которых невозможно клонировать из генома в составе единого фрагмента. Другая возможная

причина, по которой их не удалось идентифицировать, заключается в том, что амплификация этих систем с использованием вектора pBR322 может быть токсична для клеток. В результате сравнения скорости роста B1895 и B2818, было выявлено, что у последнего значительно возросла устойчивость к токсичным концентрациям треонина, что явно указывает на снижение проницаемости цитоплазматической мембраны для треонина благодаря введенным мутациям (рис. 16).

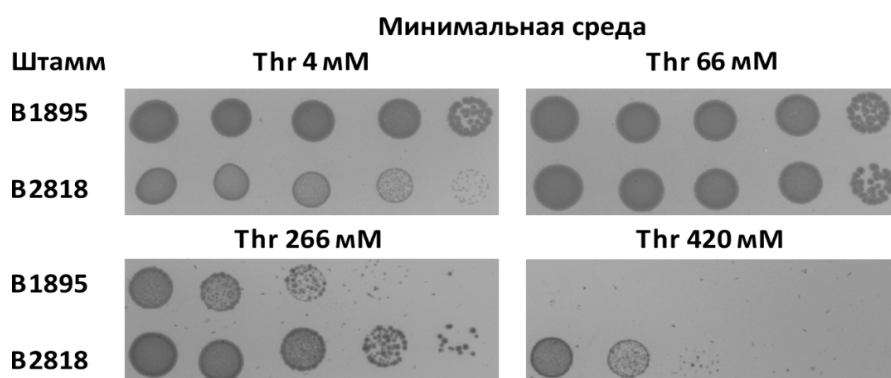


Рисунок 16. Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1895, и его мутантного производного, лишённого всех идентифицированных многокопийных супрессоров, на агаризованной среде M9 при токсичных концентрациях треонина: 4 мМ, 66 мМ, 266 мМ и 420 мМ. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин.

По совокупности результатов фенотипических тестов можно выдвинуть предположение, что среди всех отобранных многокопийных супрессоров наибольшей активностью обладают системы YhjE и SdaC, поскольку их амплификация приводит к выраженной токсичности треонина для клеток, что указывает на значительное увеличение общего потребления треонина из среды, в то время как их инактивация, наоборот, выраженно снижает способность клеток потреблять экзогенный треонин.

3.3.1.2 Исследование активности многокопийных супрессоров *in vitro*

Для подтверждения выводов, сделанных по результатам фенотипического теста, была предпринята попытка измерить активность поглощения треонина системами YqeG, YhjE, AlaE, YchE, SdaC, YdgI, YjeM и ProP *in vitro* в B2394, несущем плазмиды pBR-sdaC, pBR-alaE, pBR-proP, pBR-

yjeM, pBR-*ychE*, pBR-*ydgl*, pBR-*yhjE* и pBR-*yqeG*, соответственно. Клетки, оверэкспрессирующие *sdaC*, *yhjE* и *ydgl* продемонстрировали примерно двукратное увеличение скорости поглощения треонина (рис. 17), что дополнительно подтверждает существенную роль SdaC и YhjE в поглощении треонина при нефизиологичных условиях.

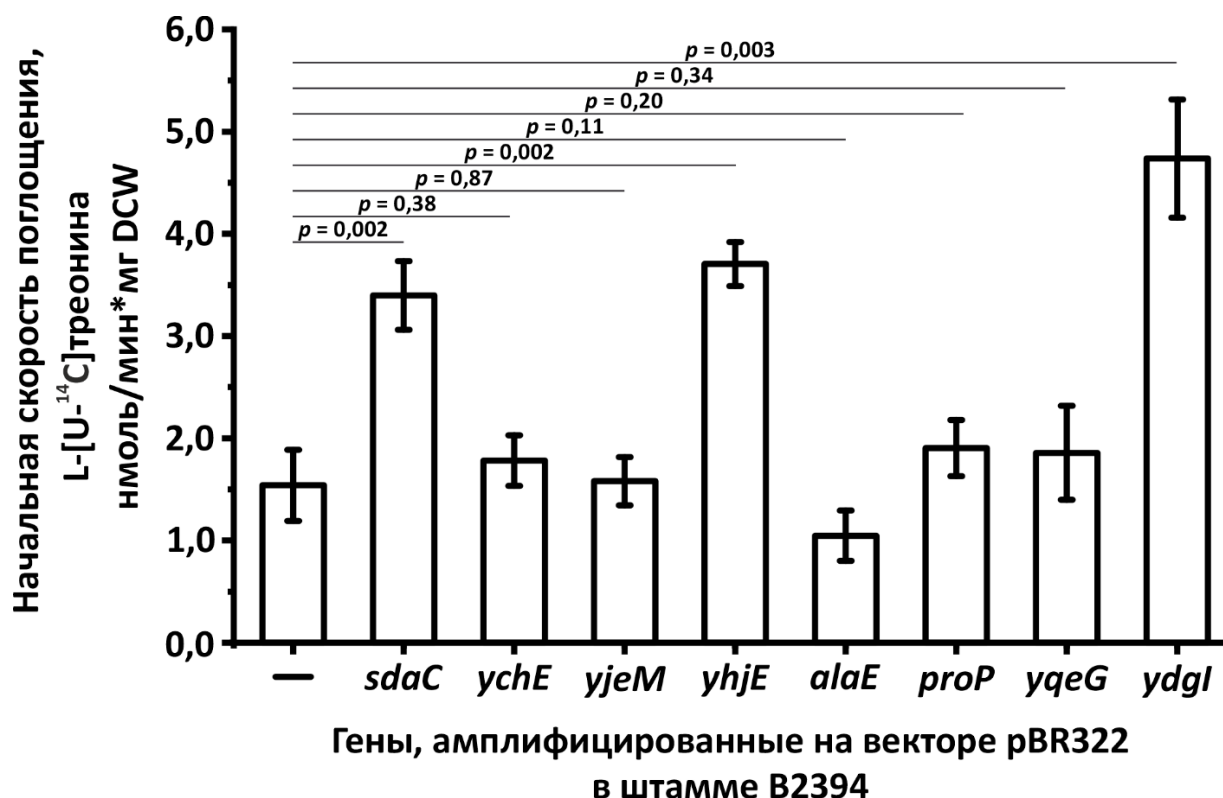


Рисунок 17. Исследование активности поглощения треонина в клетках штамма B2394, оверэкспрессирующем гены *ychE*, *yjeM*, *yhjE*, *alaE*, *proP*, *yqeG*, *ydgl* и *sdaC* на плазмиде pBR322. Скорость поглощения измеряли при 400 мкМ L-треонина в реакционной смеси. Время реакции составляло 1 мин. Показанные значения представляют собой среднее значение трёх биологических повторов. Планки погрешностей обозначают SD. Показанные значения *p* были рассчитаны с использованием двустороннего *t*-критерия Стьюдента с неравными дисперсиями.

Поскольку инактивация *ychE*, *yjeM*, *alaE*, *proP* и *yqeG* не оказала выраженного влияния на фенотип клеток (рис. 15), а их амплификация не повлияла на активность поглощения треонина (рис. 17), их воздействие на рост клеток в условиях дефицита транспорта треонина может быть связано не с переносом субстрата, а с косвенными регуляторными или метаболическими изменениями. Однако, с учетом их мембранной локализации, предсказанной на основании анализа аминокислотной последовательности, и их способности

супрессировать дефект по транспорту треонина в условиях гиперэкспрессии на многокопийном векторе, более вероятно, что они обладают активностью по отношению к треонину, которая не детектируется при использованных концентрациях субстрата. Вместе с тем, следует отметить, что все идентифицированные супрессоры оказывают незначительный вклад в треонин-специфическую активность в клетках дикого типа, которые экспрессируют специализированные транспортные системы SstT, TdcC, YifK и LIV-I. Следовательно, маловероятно, что захват треонина является их основной функцией в физиологических условиях роста *E. coli*.

3.3.2 Хромосомные супрессии дефекта по транспорту L-треонина

Второй подход к поиску вспомогательных транспортных систем треонина заключался в отборе случайных мутаций, способных восстановить дефект роста, вызванный инактивацией основных переносчиков треонина. Для этого был использован штамм B1950, производный B1426, несущий делеции в генах *yifK*, *brnQ*, *livKHMGF*, *yjeM*, *sdaC*, *ydgl* и *ychE*. Ночную культуру B1950 объемом 1 мл концентрировали в 20 раз и высевали на агаризованную M9 с треонином в концентрации 400 мкМ. В этих условиях B1950 неспособен расти, что позволило отобрать мутантов, которые восстановили способность утилизировать экзогенный треонин. Секвенирование генома семи независимо отобранных мутантов выявило несколько супрессорных хромосомных замен: *lrp*^{T134A}; *marC*^{G11E}, *marC*^{L10Q}, *marC*^{V145E}; *marC*^{S140SS}, *cysA*^{C110S} и *cysA*^{V226A} (таб. 4).

Таблица 4. Геномные мутации, супрессирующие дефект транспорта треонина в штамме B1950

Штамм	Мутации (координаты соответствуют записи в GenBank U00096.3)	Аннотация
B2055	A932994G	<i>lrp</i> ^{T134A}
	Δ[1299499-130069]	делеция области insH21, которая кодирует транспозазу IS5

Продолжение таблицы 4.

B2059	A1618475T	<i>marC</i> ^{V145E}
	T1475608C	<i>ydbD</i> ^{I155I}
	C4509536T	замена R20W в гене <i>insO</i>
B2071	T4430191A	<i>сусА</i> ^{C110S}
	IS5 инсерция (1195 п.н.) между C4494217 и T4494218	
	Δ[1299499-130069]	делеция области <i>insH21</i> , которая кодирует транспозазу IS5
B2058	G1618486GGAG	<i>marC</i> ^{S140SS}
B2061	T4430540C	<i>сусА</i> ^{V226A}
B2063	A1618880T	<i>marC</i> ^{L10Q}
B2068	C1618877T	<i>marC</i> ^{G11E}

Неохарактеризованный мембранный транспортер MarC имеет некоторую гомологию с YchE (рис. 18A), который был ранее отобран в ходе настоящей работы как многокопийный супрессор дефекта транспорта треонина. Оба белка принадлежат к семейству аминокислотных транспортеров NAAT (TC #2.A.95; The 6 TMS Neutral Amino Acid Transporter Family). Предполагалось, что MarC участвует в множественной лекарственной устойчивости (Hächler et al., 1991; Cohen et al., 1993; White et al., 1997) на основании его локализации вблизи оперона *marRAB*, который контролирует экспрессию ряда генов, участвующих в устойчивости к антибиотикам (Keeney et al., 2008; Warner and Levy, 2010), органическим растворителям (White et al., 1997), окислительному стрессу и тяжелым металлам (Alekshun and Levy, 1999). Однако, позже было показано, что ни инактивация MarC, ни YchE, не влияет на чувствительность клеток к различным антибиотикам (McDermott et al., 2008). Кроме того, имеются данные о переносчике SnatA, другого представителя семейства NAAT из гипертермофильного археона *Thermococcus* sp. KS-1, который, будучи оверэкспрессированным в *E. coli*, опосредует транспорт глицина (Akanane et al., 2003), а его активность ингибируется L-треонином, L-серином, L-аланином и L-цистеином. Этот факт, в сочетании с полученными результатами, может указывать на то, что

физиологически релевантными субстратами MarC и YchE являются некоторые из этих аминокислот или структурно схожие соединения.

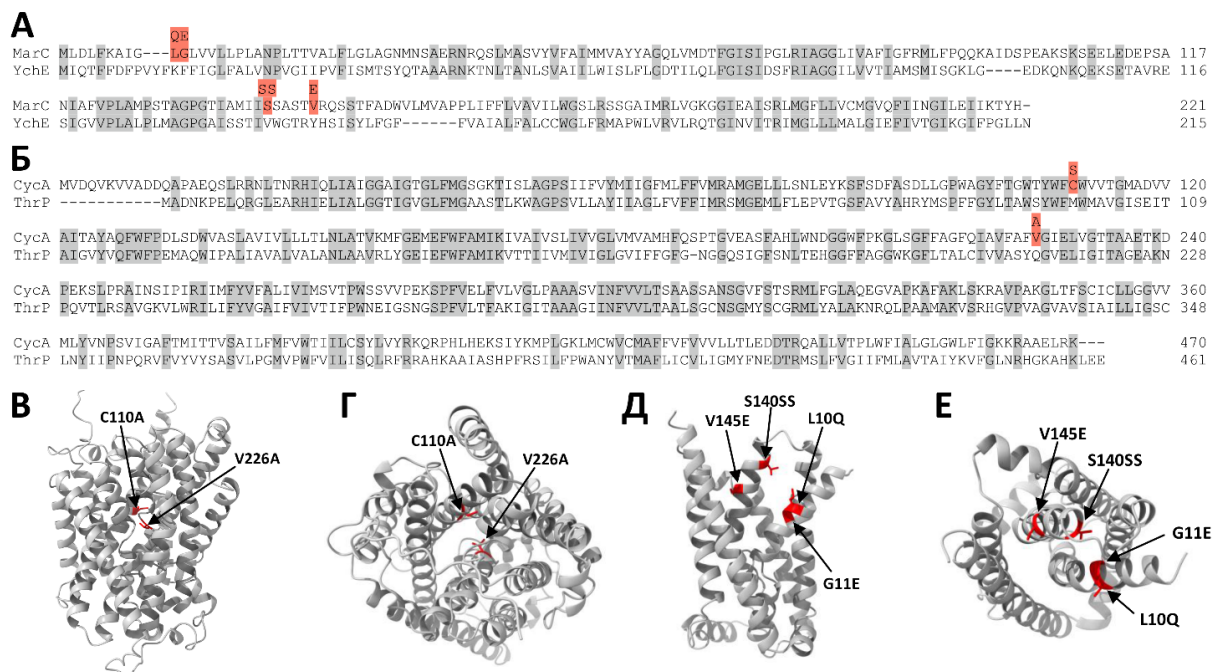


Рисунок 18. **А-Б.** Выравнивания MarC-YchE и CycA-ThrP, выполненные с использованием алгоритма Clustal Omega (Sievers and Higgins, 2014) и веб-сервиса UniProt (Bateman et al., 2025). Серая и красная заливка обозначают идентичные аминокислотные остатки и аминокислотные замены, обнаруженные в мутантных производных B1950, способных расти при непермиссивной концентрации треонина. **В-Е.** Структуры CycA и MarC, предсказанные AlphaFold2 (Jumper et al., 2021). Красная заливка указывает на мутировавшие остатки. **(В)** CycA, вид сбоку. **(Г)** CycA, вид сверху. **(Д)** MarC, вид сбоку. **(Е)** MarC, вид сверху.

Ген *cycA* кодирует ранее охарактеризованный мембранный транспортный белок, контролирующий захват D-серина, D-аланина, D-циclosерина, L-аланина, глицина и β -аланина в симпорте с H^+ (Cosloy, 1973; Robbins and Oxender, 1973; Schneider et al., 2004). Последние данные указывают на то, что L-валин и α -аминобутират также являются субстратами CycA (Hook et al., 2022). Кроме того, CycA имеет некоторую гомологию с YifK (рис. 18Б).

Анализ кристаллической структуры MarC и CycA, предсказанный с помощью AlphaFold 2 (Jumper et al., 2021), показал, что отобранные мутации локализируются в компактной области внутри обоих белков и расположены на

поверхности трансмембранных спиралей, составляющих внутреннюю область молекул (рис. 18В-Е). Таким образом, идентифицированные аминокислотные замены могут влиять на связывание субстрата и специфичность MarC и CysA, что позволяет этим транспортерам переносить треонин со скоростью, достаточной для поддержания роста клеток при непермиссивной для родительского штамма концентрации субстрата.

3.3.2.1 Фенотипический и биохимический анализ супрессорных мутаций

В результате фенотипического анализа было показано, что, в отличие от родительского B1950, все штаммы, несущие в своем геноме отобранные мутации, способны расти при непермиссивных концентрациях треонина (рис. 19).

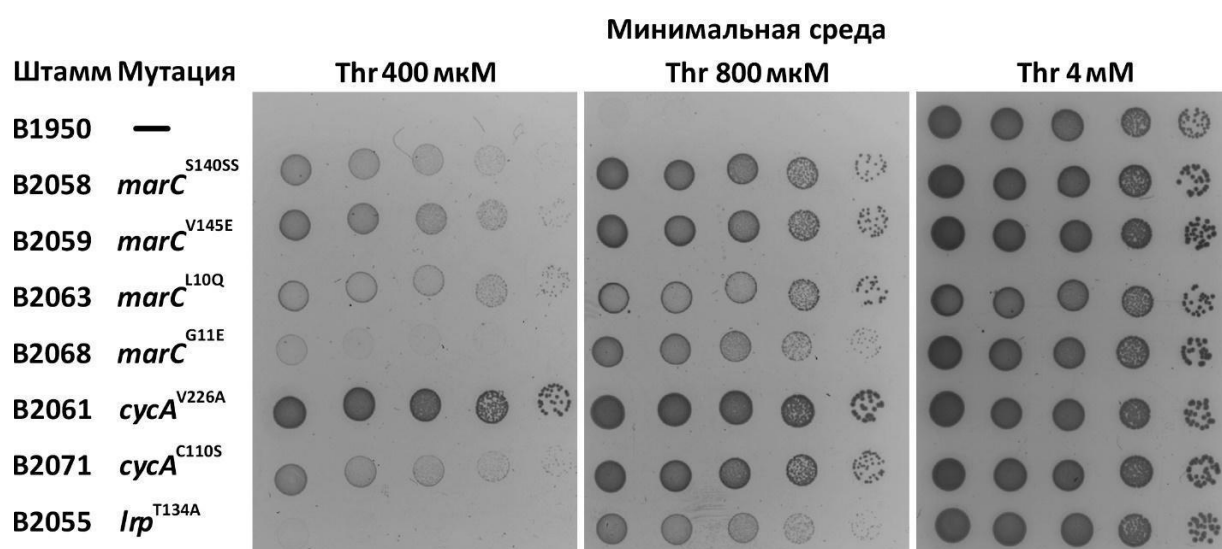


Рисунок 19. Фенотипический анализ роста дефектного по синтезу и транспорту штамма B1950 и его производных, несущих миссенс-мутации *marC*^{S140SS}, *marC*^{V145E}, *marC*^{L10Q}, *marC*^{G11E}, *cysA*^{V226A}, *cysA*^{C110S}, *lrp*^{T134A} на агаризованной M9 при возрастающей концентрации треонина. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин.

Замены *marC*^{V145E}, *marC*^{S140SS}, *marC*^{L10Q} и *cysA*^{C110S} обеспечивали схожие преимущества в росте, тогда как *marC*^{G11E} и *lrp*^{T134A} стимулировали его в меньшей степени. Наиболее выраженный эффект наблюдался у B2061, несущего замену *cysA*^{V226A}, который рос заметно быстрее по сравнению с остальными мутантами. При дальнейшем увеличении концентрации треонина

в среде до 4 мМ различия в темпах роста между мутантами и родительским штаммом исчезали.

Прямое измерение скорости поглощения треонина *in vitro* показало, что все мутантные штаммы, за исключением B2061 с заменой *cysA*^{V226A}, демонстрируют значительно повышенную активность к треонину при концентрации 2,5 мМ субстрата в реакционной смеси (рис. 20). Результат *cysA*^{V226A} можно объяснить влиянием замены V226A в большей степени на значение K_M *CysA* по отношению к треонину, а не на V_{max} . В этом случае, при концентрации субстрата, близкой к насыщающей, изменение активности было бы незаметно. Таким образом, как результаты фенотипических тестов, так и прямого измерения активности транспорта свидетельствуют о том, что транспортные белки *MarC* и *CysA* приобрели способность поглощать треонин в результате отобранных мутаций.

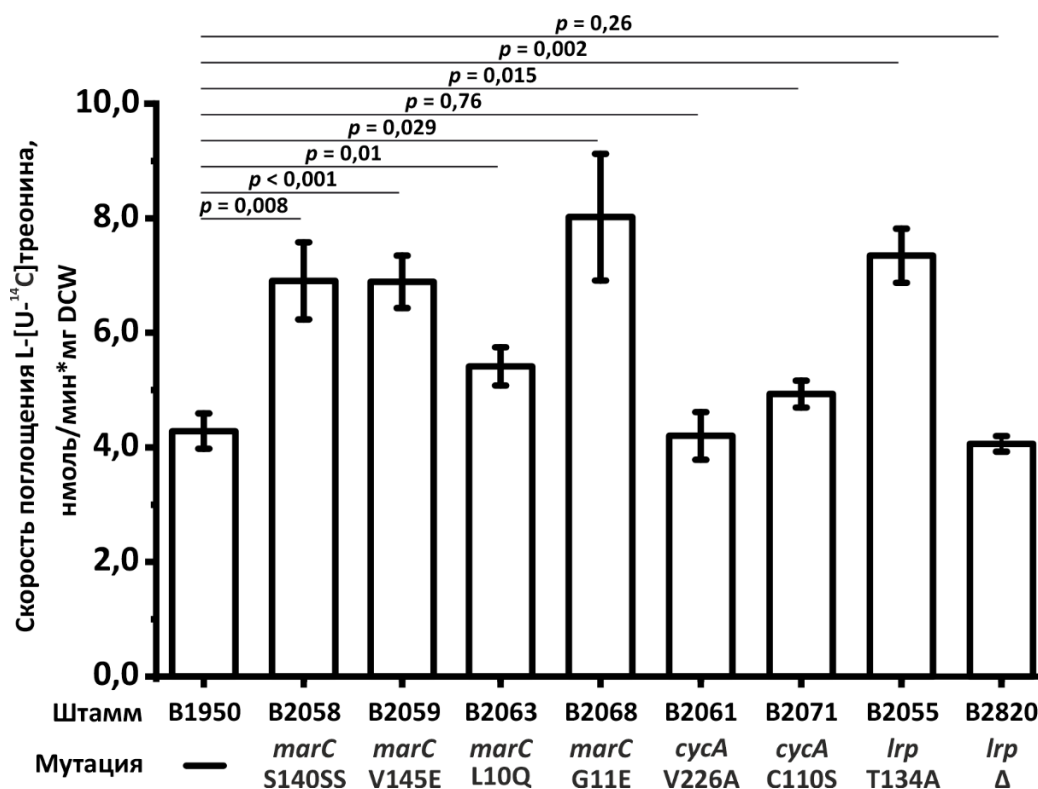


Рисунок 20. Сравнение активности транспорта треонина в штамме B1950 и его производных, несущих миссенс-мутации в локусах *marC*, *cysA* и *lrp*. Скорость поглощения измеряли при 2,5 мМ L-треонина в реакционной смеси. Время реакции составляло 1 мин. Показанные значения представляют собой среднее значение трёх биологических повторов. Планки погрешностей обозначают SD. Показанные значения *p* были рассчитаны с использованием двустороннего *t*-критерия Стьюдента с неравными дисперсиями.

3.3.2.2 Исследование механизма влияния lrp^{T134A} на активность транспорта *L*-треонина

Как упоминалось в разделе «Обзор литературы», Lrp является регуляторным транскрипционным фактором более 10% генов *E. coli*, большинство из которых участвуют в синтезе и транспорте аминокислот (Tani et al., 2002). В связи с этим была выдвинута гипотеза, что миссенс-мутация lrp^{T134A} может влиять на уровень синтеза все еще активного, но неидентифицированного переносчика треонина. Сравнительный анализ активности транспорта треонина клетками B2055 (B1950 lrp^{T134A}) и изогенного мутанта B2820 (Δlrp) показал, что мутация T134A значительно повышает скорость поглощения треонина, тогда как инактивация Lrp не оказывает никакого эффекта (рис. 20). На основании этих данных было выдвинуто предположение, что мутация T134A не приводит к полной утрате функций Lrp, а изменяет его активность, следствием чего может быть дерепрессия синтеза транспортных систем, контролирующих поглощение треонина и все еще присутствующих в штамме. Дополнительное подтверждение этой гипотезы было получено в результате прямой оценки функциональности Lrp^{T134A} с помощью транскрипционного фьюжна промотора *yhjE* и оперона *luxCDABE* *P. luminescens* в штаммах, несущих аллели lrp^{wt} , lrp^{T134A} или Δlrp . Эксперимент показал (рис. 21Б), что Lrp^{T134A} активирует транскрипцию *yhjE* в несколько меньшей степени, чем дикий Lrp. В то же время Δlrp приводит к значительному снижению активности промотора *yhjE* по сравнению с активностью в штамме B1950 с диким аллелем *lrp*. Таким образом, можно сделать вывод, что lrp^{T134A} контролирует синтез активного, но измененного Lrp. Интересно, что эта же мутация вызывает дефект активации оперона *rapBA*, кодирующего пили, ассоциированные с пиелонефритом, и при этом не влияет на активацию оперона *ilvIH* (Kaltenbach et al., 1998).

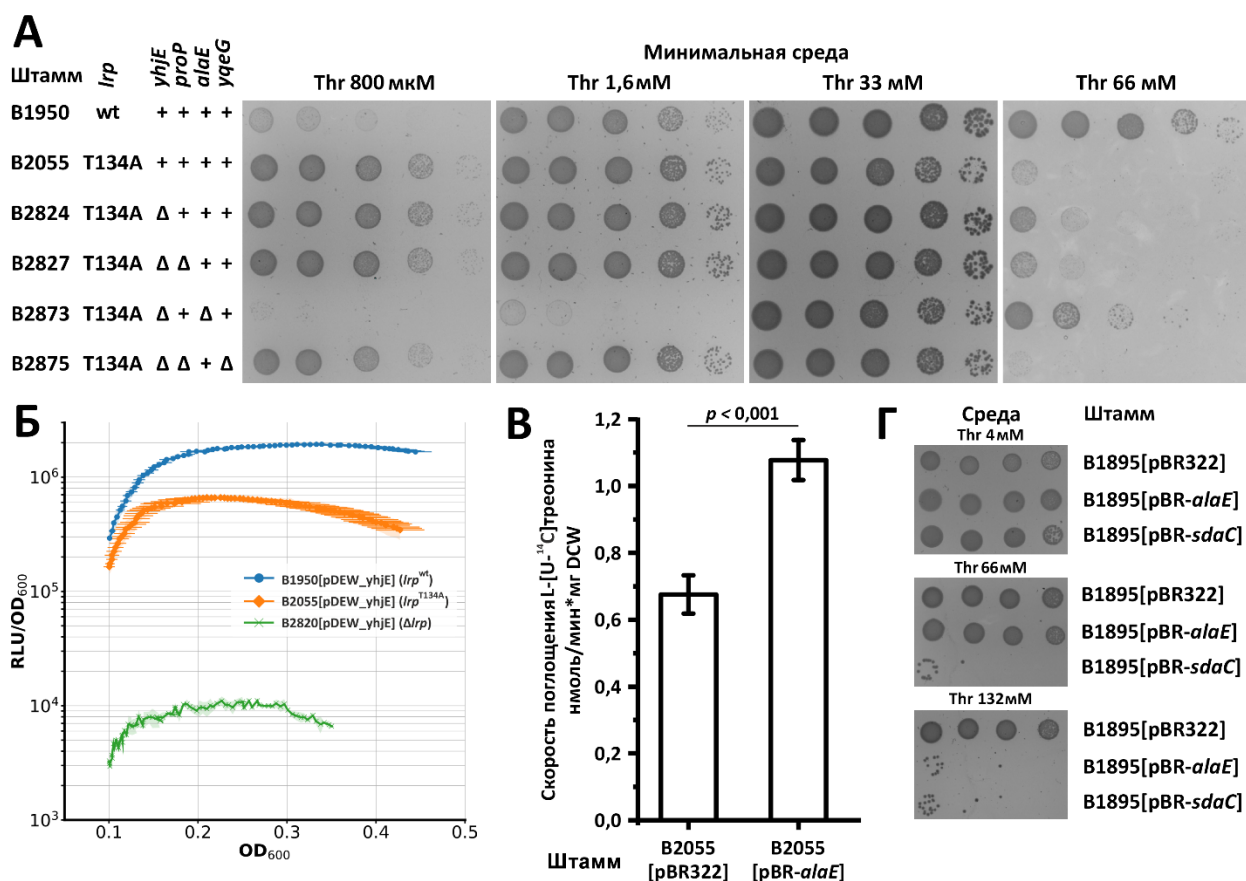


Рисунок 21. Исследование фенотипа мутации *lrp*^{T134A}. **А** – Анализ скорости роста дефектного по синтезу и транспорту штамма B2055 (*lrp*^{T134A}), и его мутантных производных $\Delta yhjE$, $\Delta proP$, $\Delta alaE$ и $\Delta yqeG$, на агаризованной M9 с различными концентрациями треонина. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин. В качестве обозначений модификаций генов: wt / + – дикий тип, Δ - делеция. **Б** - Количественная оценка активности промотора *yhjE* с помощью измерения биолуминесценции в штаммах, несущих транскрипционный фьюжн *P_{yhjE}-luxCDABE* (pDEW-*yhjE*) в зависимости от аллельного состояния *lrp*: *lrp*^{wt}, *lrp*^{T134A} или Δlrp . Измерение биолуминесценции проводили, как описано в разделе Материалы и методы. Приведенные значения являются средними из трёх независимых биологических повторов. Горизонтальные полосы погрешностей и заштрихованная область указывают стандартное отклонение для OD₆₀₀ и RLU/OD₆₀₀ соответственно. **В** - Оценка активности транспорта треонина клетками штамма B2055 (*lrp*^{T134A}), сверхэкспрессирующем AlaE на векторе pBR322. Скорость поглощения измеряли при 800 мкМ L-треонина в реакционной смеси. Время реакции составляло 1 мин. Показанные значения представляют собой среднее значение трёх биологических повторов. Планки погрешностей обозначают SD. Показанное значение *p* было рассчитано с использованием двустороннего *t*-критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. **Г** - Сравнение скорости роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1895 и его производных, сверхэкспрессирующих либо AlaE, либо SdaC на агаризованной M9, дополненной L-треонином в токсичных концентрациях.

Основываясь на полученных результатах и учитывая, что Lrp регулирует транскрипцию генов, контролирующих метаболизм и транспорт аминокислот, была выдвинута гипотеза, что мутация T134A привела к дерепрессии одного из транспортеров, специфичных к треонину. Логично предположить, что наиболее вероятный кандидат был среди идентифицированных ранее многокопийных супрессоров, все еще присутствующих в штамме B1950, а именно *yhjE*, *proP*, *alaE* и *yqeG*. В этом случае инактивация транспортной системы на фоне мутантного *lrp*^{T134A} в штамме B2055 приведет к существенному падению активности транспорта треонина, и, как следствие, к ухудшению роста полученного мутанта. Анализ скорости роста сконструированных мутантов на среде M9 показал (рис. 21А), что инактивация *yhjE* и *proP* не оказывает влияния на рост B2055, хотя делеция *yhjE* проявляла ярко выраженный фенотип на генетическом фоне штамма B1895, содержащего дикий аллель *lrp* (рис. 15). Полученные результаты свидетельствовали о том, что, в отличие от B1895, штамм B2055 экспрессирует переносчик треонина, отличный от YhjE, при этом YhjE вносит лишь незначительный вклад в общее поглощение треонина. Действительно, последующая инактивация *alaE* привела к существенному снижению роста мутанта при концентрациях треонина 0,8–1,6 мМ. Более того, в отличие от B2055, который проявлял чувствительность к треонину при концентрации 66 мМ, штамм B2873, лишенный *alaE*, показал лишь незначительное снижение скорости роста при таких условиях по сравнению с родительским штаммом B1950 (рис. 21А), что указывает на снижение проницаемости клеточной мембраны к этому субстрату.

Впоследствии было установлено, что, подобно *sdaC*, гиперэкспрессия *alaE* на многокопийном векторе pBR322 придает чувствительность к треонину клеткам B1895, несущим дикий аллель *lrp* (рис. 21Г). Наконец, прямое измерение активности транспорта треонина клетками штамма B2055, несущего плазмиду pBR-*alaE* показало, что она значительно возросла по сравнению с клетками того же штамма с пустым вектором (рис. 21В), тогда

как в аналогичном эксперименте с B2394, несущим дикий аллель *lrp*^{wt}, не было выявлено увеличения активности при амплификации *alaE* (рис. 17). Полученные результаты позволяют сделать несколько выводов. Во-первых, мутация *lrp*^{T134A} приводит к нарушению или изменению функции Lrp, что, в свою очередь, вызывает дерепрессию или активацию синтеза AlaE и подавление дефекта поглощения треонина в штамме B2055. Во-вторых, несмотря на то, что в ходе прямого измерения активности транспорта в штамме, экспрессирующем хромосомную копию AlaE, не было выявлено его активности по отношению к треонину, анализ чувствительности к треонину клеток, оверэкспрессирующих AlaE, указывает на то, что AlaE все же может участвовать в транспорте треонина даже на фоне дикого аллеля *lrp*. Вместе с тем есть убедительные доказательства того, что AlaE является H⁺/L-аланиновым антипортером, который работает в обратном направлении и предотвращает избыточное накопление L-аланина в клетке (Hori et al., 2011a, 2011b; Kim et al., 2015). Эти функции вряд ли являются двумя независимыми активностями одной транспортной системы. В связи с этим можно предположить, что AlaE специфичен для обоих субстратов и может транспортировать их в обоих направлениях, в зависимости от соотношения их концентраций в цитозоле и внешней среде, и величины электрохимического потенциала H⁺ на цитоплазматической мембране.

3.3.3 Исследование конкурентного ингибирования транспорта L-треонина

Третий подход к идентификации низкоаффинных транспортных систем специфичных к треонину и все еще функционирующих в клетках штамма B1895, заключался в поиске аминокислот, избыток которых по сравнению с треонином в среде M9 подавляет рост этого штамма. Такой фенотип может быть вызван конкурентным ингибированием активности переносчика одним субстратом по отношению ко второму. Этот эффект был ранее показан на примере подавления роста штамма B2289, экспрессирующего хромосомную копию YifK, на агаризованной M9 в присутствии избытка серина (рис. 5).

Для этого клетки дефектного по транспорту и синтезу треонина штамма B1895 тестировали на способность к росту и потреблению треонина на агаризованной М9 в присутствии 1,2 мМ треонина и десятикратного избытка других протеиногенных аминокислот. В результате фенотипической оценки скорости роста было установлено, что в этих условиях рост B1895 подавляется в присутствии L-лизина (рис. 22А), тогда как фенотип дикого штамма MG1655 и его $\Delta thrBC \Delta sstT \Delta tdcC$ производного B1426 остается практически неизменным.

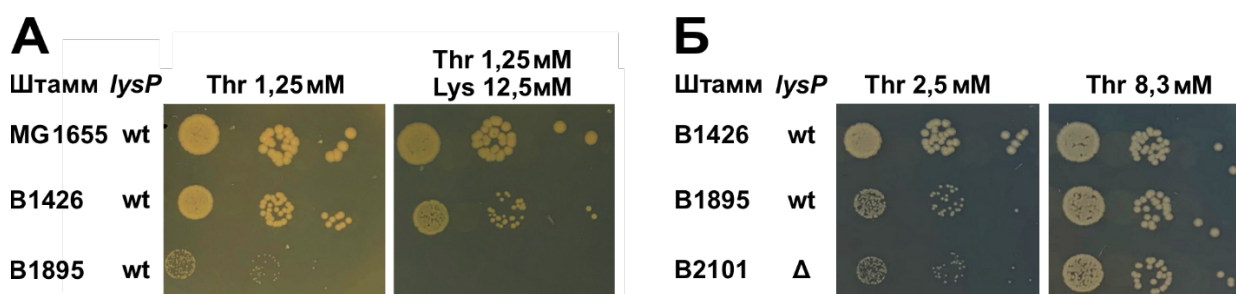


Рисунок 22. Анализ влияния избытка L-лизина в агаризованной среде М9 и аллельного состояния *lysP* на фенотип клеток, дефектных по синтезу и транспорту L-треонина. **А** – Анализ дикого штамма способности дикого штамма MG1655, и дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1426, и его изогенного *yifK liv brnQ* (B1895) мутантного производного, расти на агаризованной среде М9 с использованием экзогенного треонина в условиях избытка L-лизина. **Б** – Анализ способности дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1426 и его изогенных *yifK liv brnQ* (B1895) и *yifK liv brnQ lysP* (B2101) мутантных производных, расти на агаризованной среде М9 с использованием экзогенного треонина.

В связи с этим была выдвинута гипотеза, что транспортная система, активная в B1895, обладает высоким сродством к лизину. Охарактеризованным транспортером L-лизина в клетках *E. coli* является H^+ -симпортер LysP (Rauschmeier et al., 2014). Однако, инактивация *lysP* в B1895 не привела к каким-либо изменениям скорости роста сконструированного мутанта B2101 (рис. 22Б), что исключает значимую роль LysP в транспорте треонина. В таком случае подавление роста клеток в присутствии избытка лизина возможно связано с тем, что все еще активная и ранее неохарактеризованная транспортная система в B1895 способна поглощать как треонин, так и лизин, но обладает бóльшим сродством к последнему. Нельзя

исключить, что эта система может быть среди ранее идентифицированных «у»-генов, многокопийных супрессоров дефекта транспорта треонина.

3.4 Исследование влияния аллельного состояния найденных генов на накопление L-треонина штаммом-продуцентом

Конструирование продуцентов аминокислот и, в частности, треонина, включает в себя комплексную модификацию как метаболизма целевого соединения, так и механизмов его транспорта через цитоплазматическую мембрану (Yuzbashev et al., 2013). Снижение проницаемости мембраны для треонина за счет инактивации систем его поглощения из культуральной среды может способствовать повышению уровня биосинтеза конечного продукта по нескольким причинам. Во-первых, при высокой внеклеточной концентрации треонина его обратный транспорт может расходовать избыточное количество энергии электрохимического потенциала без совершения полезной работы. Во-вторых, накопление треонина в цитоплазме вызывает ингибирование его биосинтетического пути и негативно сказывается на общей продуктивности штамма.

Для исследования влияния инактивации идентифицированных систем транспорта на свойства продуцента был использован штамм B1175. Он был получен на основе *E. coli* K-12 в результате как случайного мутагенеза и селекции, так и путем введения направленных модификаций. Из основных изменений, обеспечивающих максимальный прирост в продуктивности штамма, можно выделить: оверэкспрессию оперона *thrABC* с десенсибилизирующей мутацией в гене *thrA*; оверэкспрессию гена *rhtA*, являющегося основным экспортером треонина; блокирование пути синтеза ацетата путем делеции гена *poxB*; и инактивация генов *sstT* и *tdcC*, контролирующих транспорт треонина внутрь клетки.

Для анализа влияния аллельного состояния идентифицированных транспортеров на уровень накопления экзогенного треонина культурой продуцента были получены его производные, несущие мутации в идентифицированных генах транспортных систем. Результаты показали, что

среди них инактивация $\Delta yifK$ (B1792), $\Delta sdaC$ (B1794), $\Delta yhjE$ (B1798) и $\Delta brnQ$ (B1805) увеличивает продукцию треонина культурой на 5–7% (рис. 23)². Неожиданно, но инактивация *lysP* (B2092) в B1175 привела к увеличению продукции треонина на 18%, что превосходит эффект инактивации ранее идентифицированных транспортеров треонина (рис. 23). Поскольку ранее было показано, что LysP не участвует в поглощении треонина, дальнейшее исследование было направлено на выявление механизма его влияния на продукцию треонина в штамме-продуcente B1175.

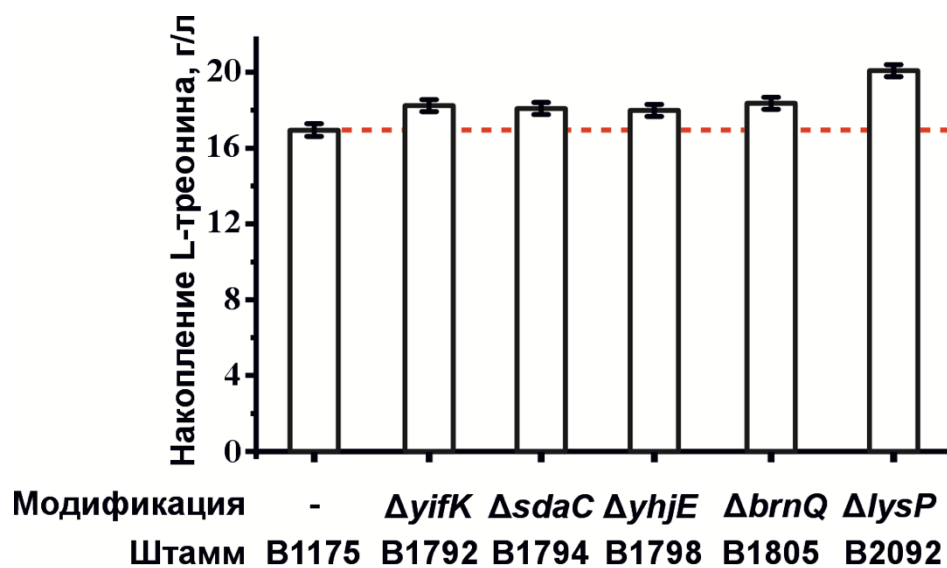


Рисунок 23. Анализ способности штамма-продуцента B1175 и его изогенных мутантных производных к накоплению экзогенного треонина. Значения, показанные на рисунке, представляют собой средние значения по меньшей мере трёх биологических повторов, планки погрешностей отражают SD. Для сравнения величин использовали двусторонний *t*-тест с неравными дисперсиями. Для всех анализируемых пар значение *p*-value < 0,05. В качестве обозначений модификаций генов: Δ - делеция.

3.4.1 Лизин-специфичный переносчик *LysP* – скрытая мишень для улучшения свойств штамма-продуцента *L*-треонина

Отсутствие влияния мутации *lysP* на рост дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B2101 на среде M9 (рис. 22) и, как следствие, на его способность поглощать экзогенный треонин, означало, что увеличение продуктивности штамма-продуцента B2092 (рис. 23), вероятнее всего, связано

² Сведения о патентах на изобретения, полученных по результатам настоящего исследования, приведены в Приложении №4.

с изменением проницаемости клеточной мембраны для его основного субстрата, а именно лизина. Более того, из научной литературы известно, что избыток лизина в питательной среде снижает накопление треонина культурой продуцента (Ogawa et al., 2001). Действительно, внесение лизина до конечной концентрации 1 г/л в ферментационную среду снижало накопление треонина на 55% родительским штаммом-продуцентом B1175, но этот негативный эффект был менее выражен в случае его изогенного $\Delta lysP$ производного B2092 (рис. 24А).

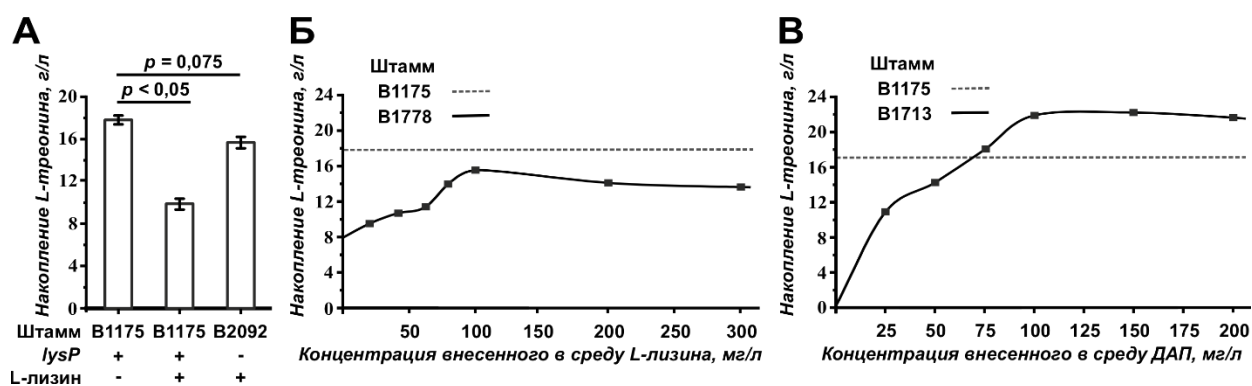


Рисунок 24. Анализ способности штамма-продуцента к накоплению треонина. Значения, показанные на рисунках, представляют собой средние значения по меньшей мере трёх биологических повторов, планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Для сравнения величин использовали двусторонний *t*-тест с неравными дисперсиями. Аббревиатура «ДАП» обозначает мезо-диаминопимелат. **А** – Влияние лизина (1 г/л) в питательной среде на уровень накопления треонина штаммом B1175 и его изогенным производным B2092, мутантным по *lysP*. **Б** - Зависимость уровня накопления треонина ауксотрофным по лизину штаммом B1778 (B1175 $\Delta lysA$) от концентрации лизина в питательной среде. **В** – Зависимость уровня накопления треонина ауксотрофным по мезо-ДАП штаммом B1713 (B1175 $\Delta dapA$) от концентрации мезо-ДАП в питательной среде.

На основании этих результатов была выдвинута гипотеза, что культивирование клеток в условиях частичного голодания по лизину должно привести к увеличению продукции треонина. Для проверки этой гипотезы был сконструирован ауксотрофный по лизину штамм B1778, несущий мутацию в гене диаминопимелатдекарбоксилазы (*lysA*), катализирующей последнюю реакцию биосинтеза лизина (Davis, 1952; Dewey and Work, 1952). Исследование зависимости продуктивности полученного ауксотрофного

мутанта от концентрации внесенного лизина в ферментационной среде не показало увеличения накопления треонина выше уровня, характерного для родительского штамма (рис. 24Б). Это, вероятно, было связано с тем, что присутствие лизина даже в концентрации менее 1 г/л негативно отражается на продукции треонина.

Альтернативный способ получения ауксотрофности по лизину (и, одновременно, его предшественнику – *мезо*-диаминопимелату) - инактивация гена *dapA*, продукт которого катализирует конденсацию пирувата и (S)-аспартата-β-полуальдегида с образованием (4S)-4-гидрокси-2,3,4,5-тетрагидро-(2S)-дипиколината (Blickling et al., 1997). Исследование *dapA*-мутанта B1713 показало, что в условиях недостатка *мезо*-диаминопимелата продукция треонина возрастает на 33% (рис. 24В). Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что способность клетки к накоплению треонина снижается при увеличении внутриклеточной концентрации лизина и объясняет, почему снижение проницаемости клеточной мембраны для лизина в результате инактивации LysP положительно влияет на уровень продукции треонина.

В прошлом одним из этапов конструирования продуцентов треонина являлся отбор устойчивости к структурному аналогу лизина - S-(2-аминоэтил)-L-цистеину (АЭЦ) (Komatsubara et al., 1979; Cho et al., 2003;). Предполагали, что такая мутация приводит к дерепрессии синтеза аспараткиназы III (LysC), катализирующей АТФ-зависимое фосфорилирование L-аспартата с образованием L-аспартил-4-фосфата, или ее десенсибилизации по отношению к лизину (Thèze et al., 1974; Richaud et al., 1980). Однако, недавно было показано, что в подавляющем большинстве случаев устойчивость к АЭЦ вызвана инактивацией LysP (Bassalo et al., 2018). С одной стороны, это не исключает того, что механизмом, посредством которого лизин ингибирует биосинтез треонина, является его взаимодействие с аспараткиназой III. Более того, в пользу этой гипотезы также свидетельствует работа, в которой авторы показывают, что лимитирующей

стадией в процессе биосинтеза треонина является реакция, катализируемая LysC (Zhang et al., 2015). С другой стороны, возникновение мутаций, которые придают устойчивость к АЭЦ, вне локуса *lysC* может означать, что механизм влияния лизина на продукцию не связан с регуляцией активности аспартаткиназы III. Чтобы выбрать среди этих двух возможностей, был сконструирован штамм B2102, в котором в ген *lysC* была введена десенсibiliзирующая мутация E250K (Kikuchi et al., 1999), нативная промоторная область заменена на сильный конститутивный промотор P_{L-tac} (Рыбак et al., 2007), а дикий 5'-UTR заменен на последовательность 5'-UTR гена *l0* фага T7. По результатам *in silico* сравнения (таб. 5) P_{L-tac} демонстрирует ~25 раз большую активность по сравнению с нативной промоторной областью, а гетерологичный 5'-UTR превосходит дикий в 15 раз по эффективности инициации трансляции (таб. 6).

Таблица 5. Активности промоторов перед *asd* и *lysC*

Ген	Промотор	Активность, условных единиц
<i>lysC</i>	Нативный	659
	P _{L-tac}	16386
<i>asd</i>	Нативный	2634
	P _{H207}	11542
	P _{A1}	7497

Таблица 6. Активности RBS перед *asd* и *lysC*

Ген	RBS	Активность, условных единиц
<i>lysC</i>	Нативный	589
	В составе конструкции P _{L-tac} - <i>lysC</i>	8566
<i>asd</i>	Нативный	374
	В составе конструкции P _{H207} - <i>asd</i>	4262
	В составе конструкции P _{A1} - <i>asd</i>	945

Исследование продуктивности показало, что введенные мутации в *lysC* не привели к повышению накопления треонина по сравнению с родительским

штаммом (рис. 25А). Сходным образом, полная инактивация LysC не оказывала влияния на продуктивность штамма B1175. Таким образом, был сделан вывод, что, по крайней мере в штамме B1175 способность к биосинтезу треонина не зависит от активности аспартаткиназы III, а реакция фосфорилирования аспартата полностью контролируется нечувствительной к ретроингибированию треонином аспартаткиназой I (ThrA^{fb}). Из этих результатов следует, что механизм влияния лизина на продукцию треонина не связан с LysC.

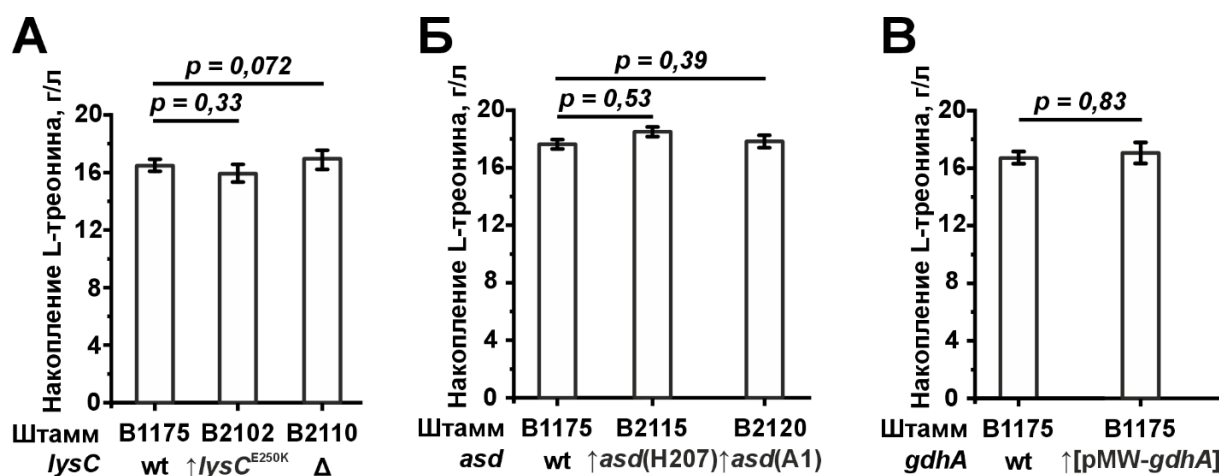


Рисунок 25. Анализ способности штамма-продуцента к накоплению треонина. Значения, показанные на рисунках А, Б и В, представляют собой средние значения по меньшей мере трёх биологических повторов, планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Для сравнения величин использовали двусторонний *t*-тест с неравными дисперсиями. **А** – Влияния аллельного состояния и уровня экспрессии *lysC* на способность культуры к накоплению треонина. Штаммы B2102 и B2110 – изогенные производные B1175, несущие аллель *lysC*^{E250K} под контролем сильного промотора P_{L-tac} и делецию *lysC*, соответственно. **Б** – Влияние уровня экспрессии аспартатполуальдегиддегидрогеназы на способность культуры к накоплению треонина. Штаммы B2115 и B2120 – изогенные производные B1175, несущие *asd* под контролем сильных промоторов P_{H207} и P_{A1}, соответственно. **В** – Влияние уровня экспрессии глутаматдегидрогеназы на способность культуры к накоплению треонина. В клетках штамма B1175 [pMW-*gdhA*] дикий аллель *gdhA* был амплифицирован благодаря наличию плазмиды pMW-*gdhA*. Контролем выступал B1175, несущий пустой вектор pMW118.

Из литературы известно, что в пути биосинтеза треонина участвуют еще два фермента, синтез или активность которых контролируется внутриклеточным пулом лизина: аспартатполуальдегиддегидрогеназа (Asd) и

глутаматдегидрогеназа (GdhA) (Dong et al., 2012). Asd осуществляет промежуточную стадию в пути биосинтеза треонина, катализируя НАДФН-зависимое превращение L-аспартил-4-фосфата в L-аспартат-полуальдегид (Biellmann et al., 1980; Haziza et al., 1982). Авторами было показано, что Asd подвержена мультивалентному ингибированию лизином, треонином и L-метионином, причем влияние лизина является доминирующим (Boy and Patte, 1972). GdhA катализирует НАДФН-зависимое аминирование α -кетоглутарата с образованием L-глутамата (Sakamoto et al., 1975; Veronese et al., 1975; McPherson and Wootton, 1983). Негативная регуляция глутаматдегидрогеназы опосредуется транскрипционным фактором ArgP для которого лизин является кофактором (Marbaniang and Gowrishankar, 2011). Для исследования влияния активности Asd были сконструированы два штамма B2115 и B2120, в которых нативный промотор гена *asd* был заменен на H207 бактериофага T5 и A1 бактериофага T7, которые относятся к сильнейшим конститутивным σ^{70} -зависимым промоторам (Deuschle et al., 1986). В обоих случаях нативный 5'-UTR был заменен на последовательность 5'-UTR гена *thrA*. Сравнение гетерологичных промоторов с нативным *in silico* показало увеличение уровня транскрипции *asd* приблизительно в три и четыре раза по сравнению с диким аллелем в случае A1 и H207, соответственно (таб. 5). Гетерологичный 5'-UTR демонстрировал в 2,5–11 раз большую эффективность инициации трансляции по сравнению с диким (таб. 6). Зависимость продуктивности от уровня экспрессии глутаматдегидрогеназы была исследована с использованием штамма B1175, несущего плазмиду pMW-*gdhA*, в составе которой находился дикий аллель *gdhA*. Таким образом, если в штамме, несущем дикие аллели *asd* и *gdhA*, активность соответствующих ферментов снижена из-за влияния лизина, а в отсутствии его транспорта активность возрастает вместе с увеличением продуктивности клетки, направленная оверэкспрессия *asd* и *gdhA* должна приводить к тому же эффекту даже при наличии дикого *lysP*. Однако, исследование накопления треонина полученными штаммами показало, что ни замена нативного промотора *asd*, ни амплификация *gdhA* не

привела к увеличению продуктивности (рис. 25Б, 25В), что свидетельствует о том, что репрессия синтеза Asd и GdhA вряд ли является причиной негативного действия лизина.

Таким образом, анализ влияния уровня экспрессии ферментов, участвующих в пути биосинтеза треонина и, по литературным данным, подверженных ингибированию и/или репрессии лизином не дал однозначного ответа на вопрос о механизме его действия на продуктивность штамма. Тем не менее, результаты работы однозначно свидетельствуют о том, что снижение внутриклеточной концентрации лизина является перспективным подходом при конструировании штамма-продуцента треонина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану бактерий играет ключевую роль в поддержании гомеостаза живых клеток и обеспечении адекватной реакции клеточного метаболизма на изменяющиеся условия окружающей среды. Несмотря на обширные исследования в этом направлении, мы все еще далеки от полного понимания картины транспорта метаболитов в клетках бактерий. Результаты данной работы расширяют существующие представления о механизмах транспорта гидроксиаминокислот в клетке *E. coli* K-12. В частности, на основе работы Крузе (Kruse et al., 2001), в которой было предсказано существование ингибируемого L-серином переносчика L-треонина, в настоящем исследовании был идентифицирован белок YifK, ответственный за эту активность. Биохимическое исследование показало, что YifK является H^+ -зависимым симпортером, который обладает более высоким сродством к L-треонину (значение K_M в 7,6 раза ниже, чем для L-серина), однако максимальная скорость транспорта (V_{max}) для L-серина превышает аналогичный показатель для L-треонина в 4,5 раза. Эти свойства позволяют классифицировать YifK как бифункциональный транспортер, основным субстрат которого определяется концентрацией этих аминокислот в окружающей среде. Ввиду его большей специфичности к L-треонину, мы предлагаем для него новое обозначение - ThrP.

Сравнив регуляцию экспрессии гомолога YifK из *Salmonella enterica* (Yang et al., 2014) с регуляцией YifK из *E. coli*, можно заключить, что мРНК GcvB и РНК шаперон Hfq негативно влияют на экспрессию *yifK* в обоих микроорганизмах. В свою очередь Lrp в *S. enterica* однозначно действует как репрессор транскрипции, в то время как в *E. coli* Lrp проявляет невыраженный эффект на транскрипцию, а его инактивация приводит к снижению активности поглощения L-треонина системой YifK. Отсутствие эффекта Lrp на транскрипцию, но выраженное влияние на активность позволяет заключить, что в клетках *E. coli* Lrp контролирует экспрессию YifK опосредовано, с

участием других регуляторных факторов, которые, вероятно, влияют на эффективность трансляции или стабильность YifK.

Инактивация YifK позволила идентифицировать *brnQ* как многокопийный супрессор дефекта транспорта L-треонина. Отсутствие влияния избытка L-серина на его активность указывает на то, что L-серин не является его дополнительным субстратом, как в случае с YifK. Результаты фенотипических и биохимических исследований однозначно свидетельствуют о непосредственном участии BrnQ в транспорте L-треонина и позволяют заключить, что BrnQ является низкоаффинным переносчиком, активность которого, тем не менее, доминирует в условиях, когда концентрация L-треонина достигает токсичного уровня.

Устранение активности YifK и BrnQ предоставило возможность показать непосредственное участие LIV-I в поглощении L-треонина и L-серина *in vitro*. Транспортная система LIV-I обладает высоким сродством к L-треонину, сравнимым с YifK. Вместе с тем низкая транспортная активность LIV-I по отношению к L-серину, наблюдаемая лишь при условии оверэкспрессии генов LIV-I, указывает на малый вклад переносчика в поглощении этого субстрата.

Таким образом, можно обобщить уже имеющиеся и вновь полученные данные в модели клеточной системы поглощения L-треонина и L-серина. Как показано на рисунке 26, при физиологически нормальных условиях захват L-треонина в клетках *E. coli* опосредуется переносчиками, специфичными к L-серину (SstT, TdcC, YifK) и аминокислотам с разветвленным радикалом (LIV-I и BrnQ). Уровень вклада каждого отдельного транспортера в минимальной среде при физиологических концентрациях субстрата может быть представлен как $SstT = YifK > LIV-I > BrnQ$. Хотя оценка активности SstT не была проведена, из опубликованных ранее результатов (Kruse et al., 2001) можно заключить, что она равна активности YifK. Если исключить из рассмотрения незначительную транспортную активность LIV-I по отношению к L-серину, то его поглощение происходит посредством SdaC, YifK и SstT

(рис. 26). В отличие от перечисленных транспортеров, функция которых заключается в поглощении аминокислот для анаболических реакций, транспортную активность TdcC скорее следует рассматривать в связи с катаболизмом L-треонина и L-серина, контролируемым опероном *tdcABCDEFG*, поскольку TdcC экспрессируется исключительно в анаэробных условиях в богатой среде (Sumantran et al., 1990; Ogawa et al., 1997). Интересно, что поглощение L-треонина и L-серина происходит в результате трёх различных механизмов энергизации: гидролиз АТФ, H^+ -зависимый симпорт и Na^+ -зависимый симпорт. В результате чего обеспечивается гибкий и надежный путь поступления аминокислот, независимо от энергетического состояния клетки и ионного состава среды.

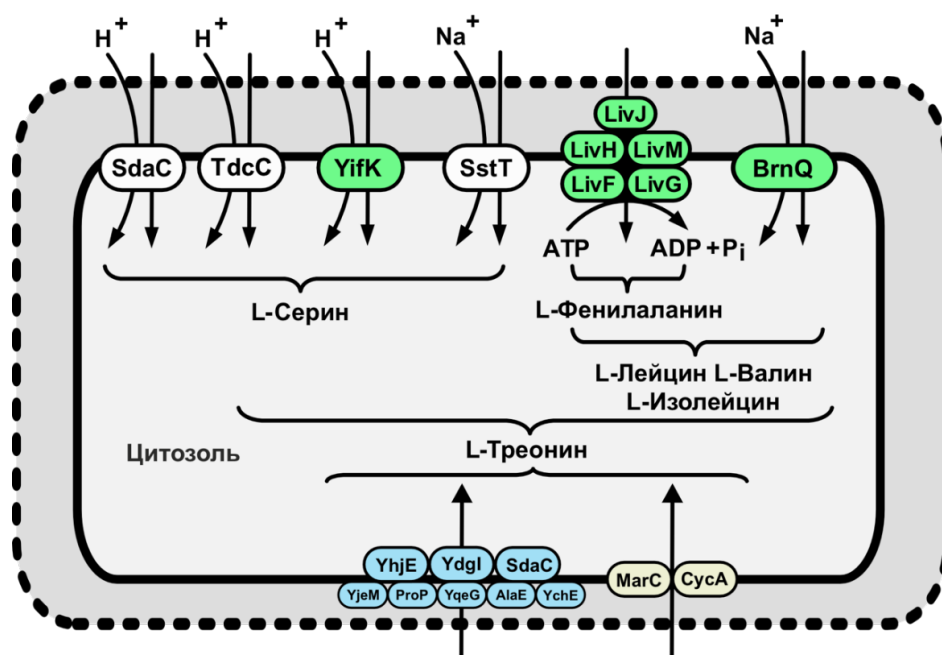


Рисунок 26. Схема путей поглощения L-серина и L-треонина в клетках *E. coli* K-12. Пунктирные и сплошные линии обозначают внешнюю и цитоплазматическую мембраны, соответственно. Белым цветом выделены ранее известные переносчики L-серина/L-треонина (SdaC, TdcC и SstT). Зеленым цветом выделены специализированные транспортные системы L-серина (YifK) и L-треонина (YifK LIV-I, BrnQ) впервые обнаруженные и охарактеризованные в настоящей работе. Голубым цветом выделены транспортные системы, для которых впервые была показана функция поглощения L-треонина при нефизиологических условиях и отсутствия специализированных систем транспорта L-треонина. Светло-желтым цветом выделены транспортные белки, для которых впервые показана способность приобретать функцию поглощения L-треонина в результате идентифицированных мутаций.

В результате последующего скрининга многокопийных и хромосомных супрессоров дефекта поглощения L-треонина в штамме, лишенном его основных специфичных транспортных систем SstT, TdcC, YifK, LIV-I и BrnQ, было выявлено 10 генов, кодирующих мембранные белки, а именно *yhjE*, *yjeM*, *ydgI*, *ychE*, *yqeG*, *sdaC*, *alaE*, *cysA*, *proP* и *marC*, амплификация которых на многокопийном векторе или миссенс-мутация способствовала восстановлению роста штамма, при непермиссивных для предкового штамма концентрациях L-треонина. Кроме того, к аналогичному эффекту приводит мутация T134A в транскрипционном факторе Lrp. В результате измерения скорости транспорта L-треонина *in vitro*, была обнаружена значительная активность *yhjE*, *sdaC*, *ydgI*, *marC*^{G11E}, *marC*^{L10Q}, *marC*^{V145E}, *marC*^{S140SS}, *cysA*^{C110S} и *alaE* на фоне *lrp*^{T134A}. Среди них, исходя из полученных результатов, YhjE и SdaC являются основными L-треонин-специфическими переносчиками на фоне мутаций Δ *sstT*, Δ *tdcC*, Δ *yifK*, Δ *brnQ* и Δ *livKHMGF*. В ходе настоящей работы не удалось предоставить прямых доказательств активности *yjeM*, *ychE*, *yqeG* и *proP* по отношению к L-треонину. Возможно, что эти гены могут оказывать влияние на способность штамма поглощать экзогенный L-треонин косвенно. Тем не менее, учитывая эффект амплификации *yjeM*, *ychE*, *yqeG* и *proP* на способность клеток расти в условиях недостатка L-треонина, а также мембранную локализацию соответствующих белков и филогенетическое сходство между YjeM и YdgI, YchE и MarC, YqeG и SdaC/TdcC, ProP и YhjE (рис. 27), можно с высокой степенью уверенности заключить, что эти белки обладают активностью по отношению к L-треонину, которая, тем не менее, не была выявлена в подобранных условиях измерений. Таким образом, в условиях избытка L-треонина и отсутствия его специализированных транспортных систем, в процесс поглощения L-треонина могут включаться YdgI, SdaC, YhjE, ProP, AlaE, YjeM, YchE и YqeG (рис. 26). Ввиду того, что физиологически релевантные функции генов *yhjE*, *yjeM*, *ydgI*, *ychE*, *yqeG* и *marC* на текущий момент неизвестны, полученные данные могут быть использованы для дальнейшего выявления функции указанных генов и поиска

их физиологически релевантных субстратов. Так, на данном этапе можно близко подойти к пониманию функции YhjE. Недавно было показано, что мутант *yhjE* имеет дефект в формировании терминальной оксидазы *bo3* (Khalfaoui-Hassani et al., 2023). Исходя из этого наблюдения, авторы исследовали участие YhjE в транспорте ионов Cu^{2+} и Fe^{2+} . Экспериментальная проверка этой гипотезы показала, что ни один из этих процессов не нарушается при инактивации *yhjE*. Следовательно, механизмы, лежащие в основе этого фенотипа, остаются неясными. В другом исследовании было показано, что мутация *yhjE* придает клеткам устойчивость к D-валину (Maeda et al., 2020), что косвенно свидетельствует о том, что YhjE является переносчиком D-валина. Учитывая, что, согласно нашим данным, транспортёры аминокислот с разветвленным радикалом BrnQ и LIV-I способны также переносить L-треонин, а YhjE, вероятнее всего, опосредует захват D-валина и L-треонина, можно предположить, что наиболее вероятными субстратами YhjE являются L-изолейцин, L-валин и/или L-лейцин.

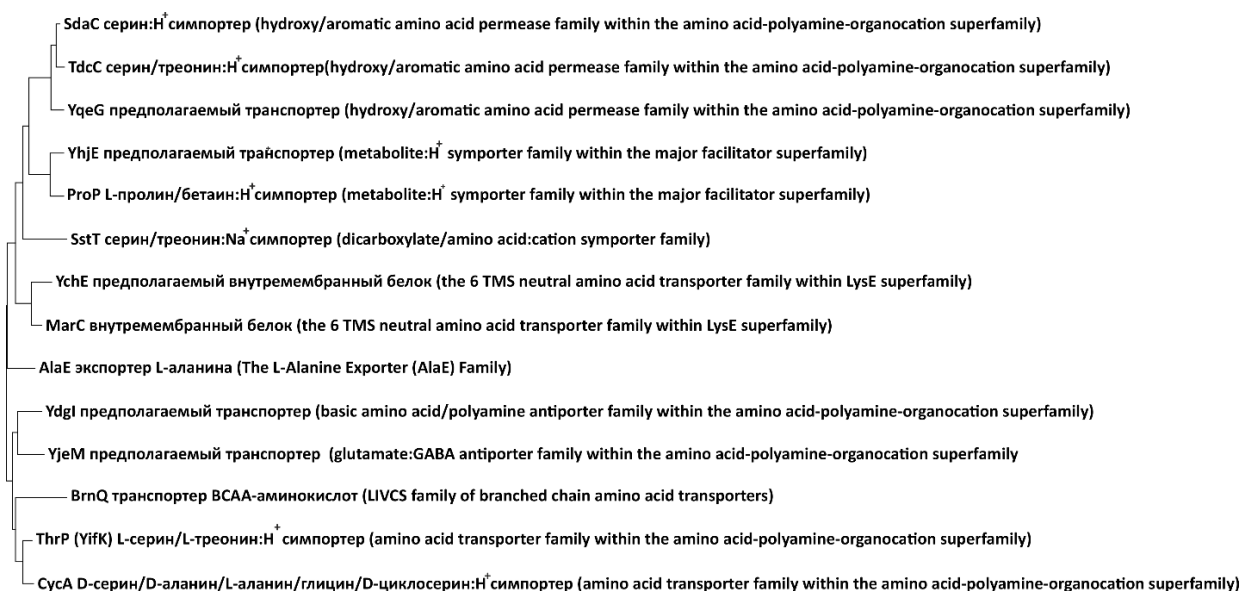


Рисунок 27. Филогенетическое дерево транспортных систем, участвующих в поглощении L-треонина. Показано дерево с наивысшим логарифмическим правдоподобием (-13131,09). Дерево показано в масштабе, с длинами ветвей, измеренными в количестве замен на сайт. Все позиции с покрытием сайта менее 50% были исключены. Принадлежность транспортных систем к семействам было определено в соответствии с TCDB (Transporter Classification Database)., (Saier et al., 2021).

В контексте задач промышленной биотехнологии было показано, что инактивация транспортных систем *yifK*, *sdaC*, *brnQ* и *yhjE* способствует улучшению уровня продукции L-треонина штаммом-продуcentом *E. coli*. Полученный результат напрямую связан со снижением проницаемости цитоплазматической мембраны клеток к L-треонину, что приводит к снижению его внутриклеточной концентрации и снятию эффекта ретроингибирования. Кроме того, было установлено, что делеция L-лизин-специфичного транспортера LysP приводит к значительному росту накопления экзогенного L-треонина культурой нового продуцента. Однако, в этом случае, улучшение способности продуцента к накоплению L-треонина напрямую связано со снижением проницаемости мембраны для L-лизина и, как следствие, к уменьшению его внутриклеточной концентрации. Анализ влияния уровня экспрессии ферментов, участвующих в пути биосинтеза L-треонина и, по литературным данным, подверженных ингибированию и/или репрессии L-лизином не дал однозначного ответа на вопрос о механизме его действия на продуктивность штамма. Падение активности ни одного из трёх ферментов, а именно LysC, Asd и GdhA не является единственной и достаточной причиной снижения способности к накоплению L-треонина в присутствии экзогенного L-лизина. Этот результат может свидетельствовать о существовании прежде неописанных или не прямых механизмов взаимодействия внутриклеточного пула L-лизина и ферментов, контролирующих путь биосинтеза L-треонина. Вместе с тем нельзя исключить возможности плеiotропного эффекта L-лизина, в результате которого к наблюдаемому фенотипу приводит падение активности сразу нескольких ферментов. Тем не менее, результаты настоящей работы однозначно свидетельствуют о том, что снижение внутриклеточной концентрации L-треонина и L-лизина путем снижения проницаемости клеточной мембраны для этих аминокислот, является перспективным подходом для совершенствования штаммов-продуcentов L-треонина.

ВЫВОДЫ

1. YifK является H^+ -симпортером L-треонина и L-серина в клетку *E. coli*, обладающим бóльшим сродством к L-треонину.
2. LIV-I обладает активностью по отношению к L-треонину и L-серину. Вклад LIV-I в потребление L-треонина сопоставим с вкладом YifK.
3. BrnQ является низкоаффинным транспортером L-треонина, активность которого доминирует, когда концентрация субстрата достигает токсичного уровня.
4. При высоких концентрациях треонина в среде и в условиях отсутствия специализированных транспортных систем L-треонина он может поступать в клетку в результате активности YdgI, SdaC, YhjE, ProP, AlaE, YjeM, YchE, YqeG. Транспортеры MarC и CysA способны приобретать активность по отношению к L-треонину в результате специфических аминокислотных замен.
5. Инактивация транспортных систем YifK, SdaC, BrnQ, YhjE и LysP увеличивает продукцию L-треонина культурой штамма-продуцента.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Закатаева Н.П., Кутукова Е.А., Тройский С.В., Трошин П.В., Лившиц В.А., Алешин В.В. Экспорт метаболитов белками семейств DMT и RhtB и их возможная роль в межклеточной коммуникации // Микробиология. — 2006. — Т. 75. — № 4. — С. 509-520.
2. Каташкина Ж.И. Разработка и использование методов направленной модификации целевых генетических локусов хромосомы *E. coli* при конструировании штаммов-продуцентов аминокислот: дисс. кан. биол. наук: Москва, 2003.
3. Лившиц В.А., Закатаева Н.П., Алешин В.В., Беларева А.В., Токмакова И.Л. Фрагмент днк *rhtB*, кодирующий синтез белка RhtB, придающего устойчивость к L-гомосерину бактериям *Escherichia coli*, и способ получения L-аминокислот // Патент на изобретение RU2144564C1, дата регистрации 20.01.2000 заявка № RU98118425A от 13.10.1998.
4. Рыбак К.В., Сливинская Е.А., Саврасова Е.А., Ахверд В.З., Клячко Е.В., Машко С.В., Дорошенко В.Г., Айрих Л.Г., Леонова Т.В., Гусятинер М.М., Ворошилова Э.Б., Козлов Ю.И., Хара Й., Уэда Т. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* // Патент на изобретение RU2304615C2, дата регистрации 20.08.2007, заявка № RU200513158613A от 12.10.2005.
5. Akahane S., Kamata H., Yagisawa H., Hirata H. A novel neutral amino acid transporter from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. KS-1 // *J. Biochem.* — 2003. — V. 133. P. 173–180.
6. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. — 4th. — Garland Science, 2002.
7. Alekshun M.N., and Levy S.B. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals // *Trends Microbiol.* — 1999. — V. 7. — P. 410–413.

8. Aleshin V.V., Zakataeva N.P., Livshits V.A. A new family of amino-acid-efflux proteins // Trends in Biochemical Sciences. — 1999. — V. 24. — № 4. — P. 133-135.
9. Ames G.F., Lever J.E. The histidine-binding protein J is a component of histidine transport. Identification of its structural gene, *hisJ* // The Journal of Biological Chemistry. — 1972. — V. 247. — № 13. — P. 4309-4316.
10. Amos H., Cohen G.N. Amino acid utilization in bacterial growth // Biochemical Journal. — 1954. — V. 57. — № 2. — P. 338-343.
11. Anderson J.J., Quay S.C., Oxender D.L. Mapping of two loci affecting the regulation of branched-chain amino acid transport in *Escherichia coli* K-12. // Journal of Bacteriology. — 1976. — V. 126. — № 1. — P. 80-90.
12. Anderson J.J., Oxender D.L. *Escherichia coli* transport mutants lacking binding protein and other components of the branched-chain amino acid transport systems. // Journal of Bacteriology. — 1977. — V. 130. — № 1. — P. 384-392.
13. Anderson J.J., Oxender D.L. Genetic separation of high- and low-affinity transport systems for branched-chain amino acids in *Escherichia coli* K-12 // Journal of Bacteriology. — 1978. — V. 136. — № 1. — P. 168-174.
14. Argaman L., Hershberg R., Vogel J., Bejerano G., Wagner E.G., Margalit H., Altuvia S. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli* // Current biology: CB. — 2001. — V. 11. — № 12. — P. 941-950.
15. Baek C.-H., Kang H.-Y., Roland K.L., Curtiss R. Lrp acts as both a positive and negative regulator for type 1 fimbriae production in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* // PloS One. — 2011. — V. 6. — № 10. — P. e26896.
16. Bassalo M.C., Garst A.D., Choudhury A., Grau W.C., Oh E.J., Spindler E., Lipscomb V., Gill R.V. Deep scanning lysine metabolism in *Escherichia coli* // Molecular Systems Biology. — 2018. — V. 14. — № 11. — P. e8371.
17. Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Adesina, A., Ahmad, S. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025 // Nucleic Acids Research. — 2025. — V. 53. — P. 609-617.

18. Beis K. Structural basis for the mechanism of ABC transporters // *Biochemical Society Transactions*. — 2015. — V. 43. — № 5. — P. 889-893.
19. Benz R., Darveau R.P., Hancock R.E. Outer-membrane protein PhoE from *Escherichia coli* forms anion-selective pores in lipid-bilayer membranes // *European Journal of Biochemistry*. — 1984. — V. 140. — № 2. — P. 319-324.
20. Benz R., Schmid A., Hancock R.E. Ion selectivity of gram-negative bacterial porins // *Journal of Bacteriology*. — 1985. — V. 162. — № 2. — P. 722-727.
21. Berntsson R.P., Smits S.H., Schmitt L., Slotboom D.J., Poolman B. A structural classification of substrate-binding proteins // *FEBS Lett.* — 2010. — V. 18. — P. 2606-2617.
22. Biellmann J.F., Eid P., Hirth C., Jörnvall H. Aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and general properties // *European Journal of Biochemistry*. — 1980. — V. 104. — № 1. — P. 53-58.
23. Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.V., Nagaraja Rao R., Schoner B.E. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. // *Gene*. — 1992. — V. 116. — № 1. — P. 43-49.
24. Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.V., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // *Science*. — 1997. — V. 277. — № 5331. — P. 1453-62.
25. Blickling S., Renner C., Laber B., Pohlenz H.D., Holak V.A., Huber R. Reaction mechanism of *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase investigated by X-ray crystallography and NMR spectroscopy // *Biochemistry*. — 1997. — V. 36. — № 1. — P. 24-33.
26. Boiangiu C.D., Jayamani E., Brügel D., Herrmann G., Kim J., Forzi L., Hedderich R., Vgenopoulou I., Pierik A.J., Steuber J., Buckel W. Sodium ion pumps and hydrogen production in glutamate fermenting anaerobic bacteria // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. — 2005. — V. 10. — № 2-4. — P. 105-119.

27. Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W., Crosa J.H., Falkow S. Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system // *Gene*. — 1977. — V. 2. — № 2. — P. 95-113.
28. Bossi L., Maloriol D., Figueroa-Bossi N. Porin biogenesis activates the sigma(E) response in *Salmonella* hfq mutants // *Biochimie*. — 2008. — V. 90. — № 10. — P. 1539-1544.
29. Boy E., Patte J.P. Multivalent repression of aspartic semialdehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Bacteriology*. — 1972. — V. 112. — № 1. — P. 84-92.
30. Boyd D., Schierle C., Beckwith J. How many membrane proteins are there? // *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. — 1998. — V. 7. — № 1. — P. 201-205.
31. Brandt U. Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction // *Biochimica Et Biophysica Acta*. — 1997. — V. 1318. — № 1-2. — P. 79-91.
32. Brown K.D. Formation of aromatic amino acid pools in *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Bacteriology*. — 1970. — V. 104. — № 1. — P. 177-188.
33. Bubnov D.M., Yuzbashev V.V., Khozov A.A., Melkina O.E., Vybornaya V.V., Stan G.-B., Sineoky S.P. Robust counterselection and advanced λ Red recombineering enable markerless chromosomal integration of large heterologous constructs // *Nucleic Acids Research*. — 2022. — V. 50. — № 15. — P. 8947-8960.
34. Budiardjo S.J., Stevens J.J., Calkins A.L., Ikujuni A.P., Wimalasena V.K., Firlar E., Case D.A., Biteen J.S., Kaelber J.T., Slusky J.S. Colicin E1 opens its hinge to plug TolC // *Elife*. — 2022. — V. 24. — P.e73297.
35. Calamita G., Kempf B., Bonhivers M., Bishai W.R., Bremer E., Agre P. Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene aqpZ // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1998. — V. 95. — № 7. — P. 3627-3631.

36. Chan H., Babayan V., Blyumin E., Gandhi C., Hak K., Harake D., Kumar K., Lee P., Li V.V., Liu H.Y., Lo V.C.V., Meyer C.J., Stanford S., Zamora K.S., Saier M.H. The p-type ATPase superfamily // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. — 2010. — V. 19. — № 1-2. — P. 5-104.
37. Chang A.C., Cohen S.N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid // Journal of Bacteriology. — 1978. — V. 134. — № 3. — P. 1141-56.
38. Chen S., Calvo J.M. Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers // Journal of Molecular Biology. — 2002. — V. 318. — № 4. — P. 1031-1042.
39. Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor // Bioinformatics (Oxford, England). — 2018. — V. 34. — № 17. — P. i884-i890.
40. Chen X, Cai X, Chen Z, Wu J, Hao G, Luo Q, Liu S, Zhang J, Hu Y, Zhu G, Koester W, White AP, Cai Y, Wang Y. Mosaic evolution of Beta-barrel-porin-encoding genes in *Escherichia coli* // Appl Environ Microbiol. — 2022. — V. 88. — №4. — P. e00060-22.
41. Cho B.-K., Federowicz S., Park Y.-S., Kim D., Zengler K., Palsson B.Ø. Deciphering the regulatory logic of a stimulon // Nature chemical biology. — 2011. — V. 8. — № 1. — P. 65-71.
42. Christgen S.L., Becker D.F. Role of proline in pathogen and host interactions // Antioxidants & Redox Signaling. — 2019. — V. 30. — № 4. — P. 683-709.
43. Cohen, G. N., Monod, J. Bacterial permeases // Bacteriol. — 1957. — V. 21. — № 3. — P. 169-194
44. Cohen S.N., Chang A.Y., Boyer H.W., Helling R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1973. — V. 70. — P. 3240–3244.
45. Cohen S.P., Hächler H., Levy S.B. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (mar) locus in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1993. — V. 175. — P. 1484–1492.

46. Cooper G.M. Transport of Small Molecules // *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. — Sinauer Associates, 2000.
47. Cooper G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. — 8th. — Oxford University Press, 2018.
48. Cosloy S.D. D-serine transport system in *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Bacteriology*. — 1973. — V. 114. — № 2. — P. 679-684.
49. Cox K.E.L., Schildbach J.F. Sequence of the R1 plasmid and comparison to F and R100: SI: ISPB Plasmid 2016 // *Plasmid*. — 2017. — V. 91. — P. 53-60.
50. Cui Y., Wang Q., Stormo G.D., Calvo J.M. A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. // *Journal of Bacteriology*. — 1995. — V. 177. — № 17. — P. 4872-4880.
51. Czernik P.J., Shin D.S., Hurlburt B.K. Functional selection and characterization of DNA binding sites for trp repressor of *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. — 1994. — V. 269. — № 45. — P. 27869-27875.
52. Daley D.O., Rapp M., Granseth E., Melén K., Drew D., von Heijne G. Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome // *Science*. — 2005. — V. 308. — № 5726. — P. 1321-1323.
53. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2000. — V. 97. — № 12. — P. 6640-6645.
54. Dassler T., Maier T., Winterhalter C., Böck A. Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway // *Molecular Microbiology*. — 2000. — V. 36. — № 5. — P. 1101-1112.
55. Davis B.D. Biosynthetic interrelations of lysine, diaminopimelic acid, and threonine in mutants of *Escherichia coli* // *Nature*. — 1952. — V. 169. — № 4300. — P. 534-536.

56. Rios S., Perona J.J. Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly // Journal of Molecular Biology. — 2007. — V. 366. — № 5. — P. 1589-1602.
57. Deatherage D.E., Barrick J.E. Identification of mutations in laboratory evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq // Methods in molecular biology. — 2014. — V. 1151. — P. 165-188.
58. Debabov V.G. The threonine story // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. — 2003. — V. 79. — P. 113-136.
59. Deckers-Hebestreit G., Altendorf K. The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex // Annual Review of Microbiology. — 1996. — V. 50. — P. 791-824.
60. DeMoss J.A., Hsu P.Y. NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. — 1991. — V. 173. — № 11. — P. 3303-3310.
61. Deuschle U., Kammerer W., Gentz R., Bujard H. Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures // The EMBO journal. — 1986. — V. 5. — № 11. — P. 2987-2994.
62. Deutscher J., Francke C., Postma P.W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria // Microbiology and Molecular Biology Reviews. — 2006. — V. 70. — № 4. — P. 939-1031.
63. Dewey D.L., Work E. Diaminopimelic acid decarboxylase // Nature. — 1952. — V. 169. — № 4300. — P. 533-534.
64. Diestra E., Cayrol B., Arluison V., Risco P. Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane // PLoS ONE. — 2009. — V. 4. — № 12. — P. e8301.
65. Diesveld R., Tietze N., Fürst O., Reth A., Bathe B., Sahm H., Eggeling L. Activity of exporters of *Escherichia coli* in *Corynebacterium glutamicum*, and their use to increase L-threonine production // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. — 2009. — V. 16. — № 3-4. — P. 198-207.

66. Ding Y., Davis B.M., Waldor M.K. Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression // Molecular Microbiology. — 2004. — V. 53. — № 1. — P. 345-354.
67. Dong X., Quinn P.J., Wang X. Microbial metabolic engineering for L-threonine production // Sub-Cellular Biochemistry. — 2012. — V. 64. — P. 283-302.
68. Drachev L.A., Kaulen A.D., Skulachev V.P., Zorina V.V. The mechanism of H⁺ transfer by bacteriorhodopsin. The properties and the function of intermediate P // FEBS Letters. — 1987. — V. 226. — № 1. — P. 139-144.
69. Dutta S., Corsi I.D., Bier N., Koehler V.M. BrnQ-type branched-chain amino acid transporters influence *Bacillus anthracis* growth and virulence // mBio. — 2022. — V. 13. — № 1. — P. e03640-21.
70. Ellis H.M., Yu D., DiTizio V., Court D.L. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2001. — V. 98. — № 12. — P. 6742-6746.
71. Endermann R., Krämer C., Henning U. Major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12: evidence for protein II being a transmembrane protein // FEBS letters. — 1978. — V. 86. — № 1. — P. 21-24.
72. Faergeman N.J., Black P.N., Zhao X.D., Knudsen J., DiRusso C.P. The Acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular utilization // The Journal of Biological Chemistry. — 2001. — V. 276. — № 40. — P. 37051-37059.
73. Fajardo D.A., Cheung J., Ito C., Sugawara E., Nikaido H., Misra R. Biochemistry and regulation of a novel *Escherichia coli* K-12 porin protein, OmpG, which produces unusually large channels // Journal of Bacteriology. — 1998. — V. 180. — № 17. — P. 4452-4459.
74. Fang Y., Kolmakova-Partensky L., Miller P. A bacterial arginine-agmatine exchange transporter involved in extreme acid resistance // The Journal of Biological Chemistry. — 2007. — V. 282. — № 1. — P. 176-182.

75. Fantappiè L., Metruccio M.M.E., Seib K.L., Oriente F., Cartocci E., Ferlicca F., Giuliani M.M., Scarlato V., Delany I. The RNA chaperone Hfq is involved in stress response and virulence in *Neisseria meningitidis* and is a pleiotropic regulator of protein expression // *Infection and Immunity*. — 2009. — V. 77. — № 5. — P. 1842-1853.
76. Figueroa-Bossi N., Lemire S., Maloriol D., Balbontín R., Casadesús J., Bossi L. Loss of Hfq activates the σ E-dependent envelope stress response in *Salmonella enterica* // *Molecular Microbiology*. — 2006. — V. 62. — № 3. — P. 838-852.
77. Fiss E.H., Stanley-Samuelson P., Neilands J.B. Properties and proteolysis of ferric enterobactin outer membrane receptor in *Escherichia coli* K12 // *Biochemistry*. — 1982. — V. 21. — № 18. — P. 4517-4522.
78. Franke I., Resch A., Dassler T., Maier T., Böck A. YfiK from *Escherichia coli* promotes export of O-acetylserine and cysteine // *Journal of Bacteriology*. — 2003. — V. 185. — № 4. — P. 1161–1166.
79. Franze de Fernandez M.V., Eoyang L., August J.V. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA // *Nature*. — 1968. — V. 219. — № 5154. — P. 588-590.
80. Franze de Fernandez M.V., Hayward W.S., August J.V. Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1972. — V. 247. — № 3. — P. 824-831.
81. Furlong C.E., Weiner J.H. Purification of a leucine-specific binding protein from *Escherichia coli* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1970. — V. 38. — № 6. — P. 1076-1083.
82. Gadsby D.P. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. — 2009. — V. 10. — № 5. — P. 344-352.
83. Galdiero S., Falanga A., Cantisani M., Tarallo R., Pepa M.E.D., D’Orlando V., Galdiero M. Microbe-host interactions: structure and role of gram-negative

- bacterial porins // *Current Protein & Peptide Science*. — 2012. — V. 13. — № 8. — P. 843-854.
84. Ganduri Y.L., Sadda S.R., Datta M.W., Jambukeswaran R.K., Datta P. TdcA, a transcriptional activator of the *tdcABC* operon of *Escherichia coli*, is a member of the LysR family of proteins // *Molecular & general genetics: MGG*. — 1993. — V. 240. — № 3. — P. 395-402.
85. Gemperli A.C., Schaffitzel C., Jakob C., Steuber J. Transport of Na⁺ and K⁺ by an antiporter-related subunit from the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase I produced in *Saccharomyces cerevisiae* // *Archives of Microbiology*. — 2007. — V. 188. — № 5. — P. 509-521.
86. Ghatak S., King Z.A., Sastry A., Palsson B.O. The y-ome defines the 35% of *Escherichia coli* genes that lack experimental evidence of function // *Nucleic Acids Research*. — 2019. — V. 47. — № 5. — P. 2446-2454.
87. Gibson D.G., Young L., Chuang R.-Y., Venter J.C., Hutchison C.A., Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases // *Nature Methods*. — 2009. — V. 6. — № 5. — P. 343-345.
88. Goss V.J., Schweizer H.P., Datta P. Molecular characterization of the *tdc* operon of *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Bacteriology*. — 1988. — V. 170. — № 11. — P. 5352-5359.
89. Gouesbet G., Jebbar M., Talibart R., Bernard V., Blanco P. Pipecolic acid is an osmoprotectant for *Escherichia coli* taken up by the general osmoporters ProU and ProP // *Microbiology*. — 1994. — V. 140. — P. 2415-2422.
90. Grothe S., Krogsrud R.L., McClellan D.J., Milner J.L., Wood J.M. Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Bacteriology*. — 1986. — V. 166. — № 1. — P. 253-259.
91. Hächler H., Cohen S.P., Levy S.B. *marA*, a regulated locus which controls expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* — 1991. — V. 173. — P. 5532-5538.
92. Hale C.A., Persons L., de Boer PAJ. Recruitment of the TolA protein to cell constriction sites in *Escherichia coli* via three separate mechanisms, and a

- critical role for FtsWI activity in recruitment of both TolA and TolQ // J Bacteriol. — 2022. — V. 204. — P. e0046421.
93. Hama H., Shimamoto V., Tsuda M., Tsuchiya V. Properties of a Na⁺-coupled serine-threonine transport system in *Escherichia coli* // Biochimica Et Biophysica Acta. — 1987. — V. 905. — № 2. — P. 231-239.
 94. Hama H., Shimamoto V., Tsuda M., Tsuchiya V. Characterization of a novel L-serine transport system in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. — 1988. — V. 170. — № 5. — P. 2236-2239.
 95. Hama H., Sumita Y., Kakutani Y., Tsuda M., Tsuchiya V. Target of serine inhibition in *Escherichia coli* // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 1990. — V. 168. — № 3. — P. 1211-1216.
 96. Haziza C., Stragier P., Patte J.P. Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*: absence of a typical attenuation signal // The EMBO journal. — 1982. — V. 1. — № 3. — P. 379-384.
 97. Heatwole V.M., Somerville R.L. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of *mtr*, the structural gene for a tryptophan-specific permease of *Escherichia coli* K-12 // Journal of Bacteriology. — 1991. — V. 173. — № 1. — P. 108-115.
 98. Hesslinger C., Fairhurst S.A., Sawers G. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate // Molecular Microbiology. — 1998. — V. 27. — № 2. — P. 477-492.
 99. Higgins C.F., Haag P.D., Nikaido K., Ardeshir F., Garcia G., Ames G.F. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium* // Nature. — 1982. — V. 298. — № 5876. — P. 723-727.
 100. Higgins C.F. ABC transporters: from microorganisms to man // Annual Review of Cell Biology. — 1992. — V. 8. — P. 67-113.

101. Hirata M., Tokushige M., Inagaki A., Hayaishi O. Nucleotide activation of threonine deaminase from *Escherichia coli* // The Journal of Biological Chemistry. — 1965. — V. 240. — P. 1711-1717.
102. Hirsch D., Stahl A., Lodish H.F. A family of fatty acid transporters conserved from *mycobacterium* to man // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1998. — V. 95. — № 15. — P. 8625-8629.
103. Hollifield W.C., Neilands J.B. Ferric enterobactin transport system in *Escherichia coli* K-12. Extraction, assay, and specificity of the outer membrane receptor // Biochemistry. — 1978. — V. 17. — № 10. — P. 1922-1928.
104. Hook C., Eremina N., Zaytsev P., Varlamova D., Stoyanova N. The *Escherichia coli* amino acid uptake protein CycA: regulation of its synthesis and practical application in L-isoleucine production // Microorganisms. — 2022. — V. 10. — № 3. — P. 647.
105. Hori H., Ando V., Isogai E., Yoneyama H., Katsumata R. Identification of an L-alanine export system in *Escherichia coli* and isolation and characterization of export-deficient mutants // FEMS Microbiol. Lett. — 2011a. — V. 316. — P. 83–89.
106. Hori H., Yoneyama H., Tobe R., Ando V., Isogai E., Katsumata R. Inducible L-alanine exporter encoded by the novel gene *ygaW* (*alaE*) in *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. — 2011b. — V. 77. P. 4027–4034.
107. Hoshino V., Kose K. Cloning, nucleotide sequences, and identification of products of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO *bra* genes, which encode the high-affinity branched-chain amino acid transport system. // Journal of Bacteriology. — 1990a. — V. 172. — № 10. — P. 5531-5539.
108. Hoshino V., Kose K., Uratani Y. Cloning and nucleotide sequence of the gene *braB* coding for the sodium-coupled branched-chain amino acid carrier in *Pseudomonas aeruginosa* PAO // Molecular & general genetics: MGG. — 1990b. — V. 220. — № 3. — P. 461-467.
109. Hosie A.H., Poole P.S. Bacterial ABC transporters of amino acids // Research in Microbiology. — 2001. — V. 152. — № 3-4. — P. 259-270.

110. Huczyński A., Ratajczak-Sitarz M., Katrusiak A., Brzezinski B. Molecular structure of the 1:1 inclusion complex of monensin A lithium salt with acetonitrile // *Journal of Molecular Structure*. — 2007. — V. 871. — № 1. — P. 92-97.
111. Huang S., Liu Y., Liu W.Q., Neubauer P., Li J. The nonribosomal peptide valinomycin: from discovery to bioactivity and biosynthesis // *Microorganisms*. — 2021. — V. 9. — P. 780.
112. Hung L.W., Wang I.X., Nikaido K., Liu P.Q., Ames G.F., Kim S.H. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter // *Nature*. — 1998. — V. 396. — № 6712. — P. 703-707.
113. Hunter J.D. Matplotlib: A 2D graphics environment. V. 9. Matplotlib. — 2007.
114. Ihara K., Sato K., Hori H., Makino Y., Shigenobu S., Ando V., Isogai E., Yoneyama H. Expression of the *alaE* gene is positively regulated by the global regulator Lrp in response to intracellular accumulation of L-alanine in *Escherichia coli* // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. — 2017. — V. 123. — № 4. — P. 444-450.
115. Ikeda M., Katsumata R. Transport of aromatic amino acids and its influence on overproduction of the amino acids in *Corynebacterium glutamicum* // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. — 1994. — V. 78. — № 6. — P. 420-425.
116. Ingham C., Buechner M., Adler J. Effect of outer membrane permeability on chemotaxis in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. — 1990. — V. 172. — № 7. — P. 3577-3583.
117. Ishikawa V., Hama H., Tsuda M., Tsuchiya V. Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* possessing defective Na⁺/H⁺ antiporter // *Journal of Biological Chemistry*. — 1987. — V. 262. — № 16. — P. 7443-7446.
118. Iyer V.R., Moharir S.C., Kumar S. Overexpression of MutS impairs DNA mismatch repair and causes cell division defect in *E.coli*. — bioRxiv, 2020.

119. Jebbar M., Talibart R., Gloux K., Bernard V., Blanco P. Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics // *Journal of Bacteriology*. — 1992. — V. 174. — № 15. — P. 5027-5035.
120. Jeckelmann J.-M., Erni B. Carbohydrate transport by group translocation: the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system // *Bacterial Cell Walls and Membranes/* ed. A. Kuhn. — Cham: Springer International Publishing, 2019. — P. 223-274.
121. Jeckelmann J.-M., Erni B. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria // *European Journal of Physiology*. — 2020. — V. 472. — № 9. — P. 1129-1153.
122. Johnson K.A., Goody R.S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper // *Biochemistry*. — 2011. — V. 50. — № 39. — P. 8264-8269.
123. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, V., Figurnov, M., Ronneberger, O. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. — 2021. — V. 596. — P. 583–589.
124. Jung H. The sodium/substrate symporter family: structural and functional features // *FEBS letters*. — 2002. — V. 529. — № 1. — P. 73-77.
125. Jung H., Hilger D., Raba M. The Na⁺/L-proline transporter PutP // *Frontiers in Bioscience*. — 2012. — V. 17. — № 2. — P. 745-759.
126. Kaback H.R., Reeves J.P., Short S.A., Lombardi F.G. Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles: XVIII. The mechanism of action of carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 1974. — V. 160. — № 1. — P. 215-222.
127. Kaltenbach, L., Braaten, B., Tucker, J., Krabbe, M., and Low, D. Use of a two-color genetic screen to identify a domain of the global regulator Lrp that is specifically required for pap phase variation // *J. Bacteriol.* — 1998. — V. 180. — P. 1224–1231.
128. Katashkina J.I., Skorokhodova A.Yu., Zimenkov D.V., Gulevich A.Yu., Minaeva N.I., Doroshenko V.G., Biryukova I.V., Mashko S.V. Tuning the

- expression level of a gene located on a bacterial chromosome // *Molecular Biology*. — 2005. — V. 39. — № 5. — P. 719-726.
129. Kavermann H., Burns B.P., Angermüller K., Odenbreit S., Fischer W., Melchers K., Haas R. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization // *The Journal of Experimental Medicine*. — 2003. — V. 197. — № 7. — P. 813-822.
130. Kawashima V., Aramaki H., Oyamada V., Makino K., Yamada M., Okamura H., Yokoyama K., Ishijima S.A., Suzuki M. Transcription regulation by feast/famine regulatory proteins, FFRPs, in archaea and eubacteria // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. — 2008. — V. 31. — № 2. — P. 173-186.
131. Kayahara V., Thelen P., Ogawa W., Inaba K., Tsuda M., Goldberg E.B., Tsuchiya V. Properties of recombinant cells capable of growing on serine without NhaB Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. — 1992. — V. 174. — № 22. — P. 7482-7485.
132. Keeney D., Ruzin A., McAleese F., Murphy E., Bradford P.A. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli* // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2008. — V. 61. — P. 46–53.
133. Kerppola R.E., Shyamala V.K., Klebba P., Ames G.F. The membrane-bound proteins of periplasmic permeases form a complex. Identification of the histidine permease HisQMP complex // *Journal of Biological Chemistry*. — 1991. — V. 266. — № 15. — P. 9857-9865.
134. Kerppola R.E., Ames G.F. Topology of the hydrophobic membrane-bound components of the histidine periplasmic permease. Comparison with other members of the family // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1992. — V. 267. — № 4. — P. 2329-2336.
135. Keseler I.M., Gama-Castro S., Mackie A., Billington R., Bonavides-Martínez C., Caspi R., Kothari A., Krummenacker M., Midford P.E., Muñiz-Rascado L., Ong W.K., Paley S., Santos-Zavaleta A., Subhraveti P., Tierrafría V.H., Wolfe

- A.J., Collado-Vides J., Paulsen I.V., Karp P.D. The EcoCyc Database in 2021 // *Frontiers in Microbiology*. — 2021. — V. 12. — P. 711077.
136. Khalfaoui-Hassani B., Blaby-Haas C.E., Verissimo A., Daldal F. The *Escherichia coli* MFS-type transporter genes *yhjE*, *ydiM*, and *yfcJ* are required to produce an active bo3 quinol oxidase // *PLoS One*. — 2023. — V. 18. — P. e0293015.
 137. Kikuchi Y., Kojima H., Tanaka V. Mutational analysis of the feedback sites of lysine-sensitive aspartokinase of *Escherichia coli* // *FEMS Microbiology Letters*. — 1999. — V. 173. — № 1. — P. 211-215.
 138. Kim S., Ihara K., Katsube S., Hori H., Ando V., Isogai E., Yoneyama H. Characterization of the l-alanine exporter AlaE of *Escherichia coli* and its potential role in protecting cells from a toxic-level accumulation of l-alanine and its derivatives // *MicrobiologyOpen*. — 2015. — V. 4. — № 4. — P. 632-643.
 139. Kim Y.-M., Ogawa W., Tamai E., Kuroda V., Mizushima V., Tsuchiya V. Purification, reconstitution, and characterization of Na⁺/serine symporter, SstT, of *Escherichia coli* // *Journal of Biochemistry*. — 2002. — V. 132. — № 1. — P. 71-76.
 140. Komatsubara S., Kisumi M., Chibata I. Participation of lysine-sensitive aspartokinase in threonine production by S-2-aminoethyl cysteine-resistant mutants of *Serratia marcescens* // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1979. — V. 38. — № 5. — P. 777-782.
 141. Koyanagi V., Katayama V., Suzuki H., Kumagai H. Identification of the LIV-I/LS system as the third phenylalanine transporter in *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Bacteriology*. — 2004. — V. 186. — № 2. — P. 343-350.
 142. Kriner M.A., Subramaniam A.R. The serine transporter SdaC prevents cell lysis upon glucose depletion in *Escherichia coli* // *MicrobiologyOpen*. — 2020. — V. 9. — № 2. — P. e960.
 143. Kroner G.M., Wolfe M.B., Freddolino P.L. *Escherichia coli* Lrp regulates one-third of the genome via direct, cooperative, and indirect routes // *Journal of Bacteriology*. — 2019. — V. 201. — № 3. — P. e00411-18.

144. Kruse D., Six S., Krämer R., Burkovski A. Analysis of threonine uptake in *Escherichia coli* threonine production strains // Biotechnology Letters. — 2001. — V. 23. — № 5. — P. 401-404.
145. Kruse D., Krämer R., Eggeling L., Rieping M., Pfefferle W., Tchieu J.H., Chung Y.J., Jr Saier M.H., Burkovski A. Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli* // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2002. — V. 59. — № 2-3. — P. 205-210.
146. Kutukova E.A., Zakataeva N.P., Livshits V.A. Expression of the genes encoding RhtB family proteins depends on global regulator Lrp // Molekulyarnaya Biologiya (Moscow). — 2005a. — V. 39. — P. 374–378
147. Kutukova E.A., Livshits V.A., Altman I.P., Ptitsyn L.R., Ziyatdinov M.H., Tokmakova I.L., Zakataeva N.P. The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression // FEBS letters. — 2005b. — V. 579. — № 21. — P. 4629-4634.
148. LaFleur V.L., Hossain A., Salis H.M. Automated model-predictive design of synthetic promoters to control transcriptional profiles in bacteria // Nature Communications. — 2022. — V. 13. — № 1. — P. 5159.
149. Lee N., Bendet I. Crystalline L-ribulokinase from *Escherichia coli* // The Journal of Biological Chemistry. — 1967. — V. 242. — № 9. — P. 2043-2050.
150. Lee N., Patrick J.W., Barnes N.B. Subunit structure of L-ribulokinase from *Escherichia coli* // The Journal of Biological Chemistry. — 1970. — V. 245. — № 6. — P. 1357-1361.
151. Lee K.H., Park J.H., Kim V.Y., Kim H.U., Lee S.Y. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production // Molecular Systems Biology. — 2007. — V. 3. — P. 149.
152. Lee J.H., Sung B.H., Kim M.S., Blattner F.R., Yoon B.H., Kim J.H., Kim S.P. Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production // Microbial Cell Factories. — 2009. — V. 8. — № 1. — P. 2.

153. Lengeler J.W. PTS 50: past, present and future, or diauxie revisited // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. — 2015. — V. 25. — № 2-3. — P. 79-93.
154. Lenz D.H., Mok K.C., Lilley B.N., Kulkarni R.V., Wingreen N.S., Bassler B.L. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae* // Cell. — 2004. — V. 118. — № 1. — P. 69-82.
155. Letain T.E. and Postle K. TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli* // Mol Microbiol. — 1997. — V. 24. — P. 83.
156. Lewis J.M., Janda K.E., Kotter D.B., Grose J.H., McCleary W.R. Characterization of the attachment of three new coliphages onto the ferrichrome transporter FhuA // Journal of Virology. — 2023. — V. 97. — № 7. — P. e0066723.
157. Li P., He W., Wu G. Composition of amino acids in foodstuffs for humans and animals // Advances in Experimental Medicine and Biology. — 2021. — V. 1332. — P. 189-210.
158. Liao M.-K., Gort S., Maloy S. A cryptic proline permease in *Salmonella typhimurium* // Microbiology. — 1997. — V. 143. — P. 2903-2911.
159. Livshits V.A., Zakataeva N.P., Aleshin V.V., Vitushkina M.V. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli* // Research in Microbiology. — 2003. — V. 154. — № 2. — P. 123-135.
160. Lux R., Munasinghe V.R.N., Castellano F., Lengeler J.W., Corrie J.E.V., Khan S. Elucidation of a PTS-carbohydrate chemotactic signal pathway in *Escherichia coli* using a time-resolved behavioral assay // Molecular Biology of the Cell. — 1999. — V. 10. — № 4. — P. 1133-1146.
161. MacMillan S.V., Alexander D.A., Culham D.E., Kunte H.J., Marshall E.V., Rochon D., Wood J.M. The ion coupling and organic substrate specificities of

- osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli* // Biochim Biophys Acta. — 1999. — V. 1420. — P. 30-44.
162. Madigan M.V., Buckley D.H., Bender K.S., Stahl D.A. Brock biology of microorganisms. — Pearson. — New York, 2019.
163. Maeda V., Iwasawa J., Kotani H., Sakata N., Kawada M., Horinouchi V., High-throughput laboratory evolution reveals evolutionary constraints in *Escherichia coli* // *NaV. Commun.* — 2020. — V. 11. — № 5970.
164. Marbaniang C.N., Gowrishankar J. Role of ArgP (IciA) in lysine-mediated repression in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology.* — 2011. — V. 193. — № 21. — P. 5985-5996.
165. Massé E., Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 2002. — V. 99. — № 7. — P. 4620-4625.
166. McDermott P.F., McMurry L.M., Podglajen I., Dzink-Fox J.L., Schneiders V., Draper M.P., Levy S.B. The *marC* gene of *Escherichia coli* is not involved in multiple antibiotic resistance // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* — 2008. — V. 52. — № 1. — P. 382-383.
167. McGinnis S., Madden V.L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools // *Nucleic Acids Research.* — 2004. — V. 32. — № Web Server issue. — P. W20-25.
168. McLaggan D., Epstein W. *Escherichia coli* accumulates the eukaryotic osmolyte taurine at high osmolarity // *FEMS microbiology letters.* — 1991. — V. 65. — № 2. — P. 209-213.
169. McPherson M.J., Wootton J.P. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *gdhA* gene // *Nucleic Acids Research.* — 1983. — V. 11. — № 15. — P. 5257-5266.
170. Meibom K.L., Forslund A.-L., Kuoppa K., Alkhuder K., Dubail I., Dupuis M., Forsberg Å., Charbit A. Hfq, a novel pleiotropic regulator of virulence-

- associated genes in *Francisella tularensis* // Infection and Immunity. — 2009. — V. 77. — № 5. — P. 1866-1880.
171. Merdanovic M., Sauer E., Reidl J. Coupling of NAD⁺ biosynthesis and nicotinamide ribosyl transport: characterization of NadR ribonucleotide kinase mutants of *Haemophilus influenzae* // Journal of Bacteriology. — 2005. — V. 187. № 13. — P. 4410-4420.
 172. Milner J.L., McClellan D.J., Wood J.M. Factors reducing and promoting the effectiveness of proline as an osmoprotectant in *Escherichia coli* K12 // Journal of General Microbiology. — 1987. — V. 133. — № 7. — P. 1851-1860.
 173. Møller V., Franch V., Højrup P., Keene D.R., Bächinger H.P., Brennan R.G., Valentin-Hansen P. Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction // Molecular Cell. — 2002. — V. 9. — № 1. — P. 23-30.
 174. Muffler A., Traulsen D.D., Fischer D., Lange R., Hengge-Aronis R. The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the sigmaS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. — 1997. — V. 179. — № 1. — P. 297-300.
 175. Mundhada H., Seoane J.M., Schneider K., Koza A., Christensen H.B., Klein T., Phaneuf P.V., Herrgård M., Feist A.M., Nielsen A.T. Increased production of L-serine in *Escherichia coli* through Adaptive Laboratory Evolution // Metabolic Engineering. — 2017. — V. 39. — P. 141-150.
 176. Nakazato K., Hatano Y. Monensin-mediated antiport of Na⁺ and H⁺ across liposome membrane // Biochimica Et Biophysica Acta. — 1991. — V. 1064. — № 1. — P. 103-110.
 177. Negrin R.S., Foster D.L., Fillingame R.H. Energy-transducing H⁺-ATPase of *Escherichia coli*. Reconstitution of proton translocation activity of the intrinsic membrane sector // Journal of Biological Chemistry. — 1980. — V. 255. — № 12. — P. 5643-5648.

178. Neumann S., Grosse K., Sourjik V. Chemotactic signaling via carbohydrate phosphotransferase systems in *Escherichia coli* // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2012. — V. 109. — № 30. — P. 12159-12164.
179. Nicholls D.G. The chemiosmotic proton circuit // Bioenergetics 2. — Academic Press, 1992. — P. 64-104.
180. Nichols K., Dijkstra J., Breuer M.J.H., Lemosquet S., Gerrits W.J.J., Bannink A. Essential amino acid profile of supplemental metabolizable protein affects mammary gland metabolism and whole-body glucose kinetics in dairy cattle // Journal of Dairy Science. — 2022. — V. 105. — № 9. — P. 7354-7372.
181. Nikaido H., Rosenberg E.Y. Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of *Escherichia coli* // J Gen Physiol. — 1981. — V. 77. — № 2. — P. 121-135.
182. Nikaido K., Liu P.Q., Ames G.F. Purification and characterization of HisP, the ATP-binding subunit of a traffic ATPase (ABC transporter), the histidine permease of *Salmonella typhimurium*. Solubility, dimerization, and ATPase activity // The Journal of Biological Chemistry. — 1997. — V. 272. — № 44. — P. 27745-27752.
183. Njenga R., Boele J., Öztürk Y., Koch H.G. Coping with stress: how bacteria fine-tune protein synthesis and protein transport // J Biol Chem., — 2023. — V. 299. P. 105163.
184. Ogawa W., Kayahara V., Tsuda M., Mizushima V., Tsuchiya V. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking the major serine transporter, and cloning of a serine transporter gene // Journal of Biochemistry. — 1997. — V. 122. — № 6. — P. 1241-1245.
185. Ogawa W., Kim Y.-M., Mizushima V., Tsuchiya V. Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter // Journal of Bacteriology. — 1998. — V. 180. — № 24. — P. 6749-6752.
186. Ogawa-Miyata Y., Kojima H., Sano K. Mutation analysis of the feedback inhibition site of aspartokinase III of *Escherichia coli* K-12 and its use in L-

- threonine production // *Biosci Biotechnol Biochem.*, — 2001. — V. 65. — P.1149-54.
187. Ohnishi K., Hasegawa A., Matsubara K., Date V., Okada V., Kiritani K. Cloning and nucleotide sequence of the *brnQ* gene, the structural gene for a membrane-associated component of the LIV-II transport system for branched-chain amino acids in *Salmonella typhimurium* // *Idengaku Zasshi.* — 1988. — V. 63. — № 4. — P. 343-357.
 188. Okamoto K., Kino K., Ikeda M. Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* — 1997. — V. 61. — № 11. — P. 1877-1882.
 189. Oldham M.L., Khare D., Quijcho F.A., Davidson A.L., Chen J. Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter // *Nature.* — 2007. — V. 450. — № 7169. — P. 515-521.
 190. Oldham M.L., Chen J. Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state // *Science.* — 2011. — V. 332. — № 6034. — P. 1202-1205.
 191. Oxender D.L., Quay S.P. Regulation of leucine transport and binding proteins in *Escherichia coli* // *Journal of Cellular Physiology.* — 1976. — V. 89. — № 4. — P. 517-521.
 192. Padan E., Schuldiner S. Molecular physiology of the Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli* // *The Journal of Experimental Biology.* — 1994. — V. 196. — P. 443-456.
 193. Palace S.G., Proulx M.K., Lu S., Baker R.E., Goguen J.D. Genome-wide mutant fitness profiling identifies nutritional requirements for optimal growth of *Yersinia pestis* in deep tissue // *mBio.* — 2014. — V. 5. — № 4. — P. e01385-14.
 194. Papenfort K., Pfeiffer V., Mika F., Lucchini S., Hinton J.C.D., Vogel J. SigmaE-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global *omp* mRNA decay // *Molecular Microbiology.* — 2006. — V. 62. — № 6. — P. 1674-1688.

195. Park L.S., Datta P. Inhibition of *Escherichia coli* biodegradative threonine dehydratase by pyruvate // Journal of Bacteriology. — 1979. — V. 138. — № 3. — P. 1026-1028.
196. Park J.H., Lee K.H., Kim V.Y., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2007. — V. 104. — № 19. — P. 7797-7802.
197. Patrick W.M., Quandt E.M., Swartzlander D.B., Matsumura I. Multicopy suppression underpins metabolic evolvability // Molecular Biology and Evolution. — 2007. — V. 24. — № 12. — P. 2716-2722.
198. Pettersen, E. F., Goddard, V. D., Huang, P. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, V. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers // Protein Science. — 2021. — V. 30. P. 70–82.
199. Phillips S.E., Stockley P.G. Structure and function of *Escherichia coli* met repressor: similarities and contrasts with trp repressor // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. — 1996. — V. 351. — № 1339. — P. 527-535.
200. Phoenix D.A. On the targeting and membrane assembly of the *Escherichia coli* outer membrane porin, PhoE // FEMS immunology and medical microbiology. — 1996. — V. 16. — № 2. — P. 77-82.
201. Pinkerton M., Steinrauf L.K. Molecular structure of monovalent metal cation complexes of monensin // Journal of Molecular Biology. — 1970. — V. 49. — № 3. — P. 533-546.
202. Pulvermacher S.C., Stauffer L.V., Stauffer G.V. The role of the small regulatory RNA GcvB in GcvB/mRNA posttranscriptional regulation of *oppA* and *dppA* in *Escherichia coli* // FEMS microbiology letters. — 2008. — V. 281. — № 1. — P. 42-50.

203. Pulvermacher S.C., Stauffer L.V., Stauffer G.V. The Small RNA GcvB Regulates *sstT* mRNA Expression in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. — 2009a. — V. 191. — № 1. — P. 238-248.
204. Pulvermacher S.C., Stauffer L.V., Stauffer G.V. Role of the *Escherichia coli* Hfq protein in GcvB regulation of *oppA* and *dppA* mRNAs // Microbiology. — 2009b. — V. 155. — № Pt 1. — P. 115-123.
205. Pulvermacher S.C., Stauffer L.V., Stauffer G.V. Role of the sRNA GcvB in regulation of *cycA* in *Escherichia coli* // Microbiology. — 2009c. — V. 155. — № 1. — P. 106-114.
206. Rasmussen A.A., Eriksen M., Gilany K., Udesen C., Franch V., Petersen C., Valentin-Hansen P. Regulation of *ompA* mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control // Molecular Microbiology. — 2005. — V. 58. — № 5. — P. 1421-1429.
207. Rauschmeier M., Schüppel V., Tetsch L., Jung K. New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in *Escherichia coli* // Journal of Molecular Biology. — 2014. — V. 426. — № 1. — P. 215-229.
208. Ren D., Bedzyk L.A., Ye R.W., Thomas S.M., Wood V.K. Stationary-phase quorum-sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in *Escherichia coli* // Applied and Environmental Microbiology. — 2004. — V. 70. — № 4. — P. 2038-2043.
209. Richaud F., Phuc N.H., Cassan M., Patte J.P. Regulation of aspartokinase III synthesis in *Escherichia coli*: isolation of mutants containing *lysC*-lac fusions // Journal of Bacteriology. — 1980. — V. 143. — № 1. — P. 513-515.
210. Richard H., Foster J.W. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential // Journal of Bacteriology. — 2004. — V. 186. — № 18. — P. 6032-6041.
211. Riley M., Abe V., Arnaud M.B., Berlyn M.K.B., Blattner F.R., Chaudhuri R.R., Glasner J.D., Horiuchi V., Keseler I.M., Kosuge V., Mori H., Perna N.V.,

- Plunkett G., Rudd K.E., Serres M.H., Thomas G.H., Thomson N.R., Wishart D., Wanner B.L. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005 // Nucleic Acids Research. — 2006. — V. 34. — № 1. — P. 1-9.
212. Robbins J.C., Oxender D.L. Transport systems for alanine, serine, and glycine in *Escherichia coli* K-12 // Journal of Bacteriology. — 1973. — V. 116. — № 1. — P. 12-18.
213. Roskoski Jr R. Wandering in the gardens of the mind: Peter Mitchell and the making of Glynn // Biochemistry and Molecular Biology Education. — 2004. — V. 32. — № 1. — P. 64-65.
214. Rowley D. Inhibition of *E. coli* strains by amino-acids // Nature. — 1953. — V. 171. — № 4341. — P. 80-81.
215. Saier M.H., Kollman J.M. Is FatP a long-chain fatty acid transporter? // Molecular Microbiology. — 1999. — V. 33. — № 3. — P. 670-672.
216. Saier M.H., Reddy V.S., Moreno-Hagelsieb G., Hendargo K.J, Zhang Y., Iddamsetty V., Lam K.J.K., Tian N., Russum S., Wang J., Medrano-Soto A. The Transporter Classification Database (TCDB): 2021 update // Nucleic Acids Research. — 2021. — V. 8. — P. 461-467.
217. Sakamoto N., Kotre A.M., Savageau M.A. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties // Journal of Bacteriology. — 1975. — V. 124. — Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*. — № 2. — P. 775-783.
218. Sambrook, J., Fritsch, E. R., Maniatis, V. Molecular cloning: a laboratory manual. V. 2. 1989. — Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
219. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1977. — V. 74. — № 12. — P. 5463-5467.

220. Sawers G. A novel mechanism controls anaerobic and catabolite regulation of the *Escherichia coli* *tdc* operon // Molecular Microbiology. — 2001. — V. 39. — № 5. — P. 1285-1298.
221. Sawitzke J.A., Costantino N., Li X.-V., Thomason L.C., Bubunenko M., Court C., Court D.L. Probing cellular processes with oligo-mediated recombination and using the knowledge gained to optimize recombineering // Journal of Molecular Biology. — 2011. — V. 407. — № 1. — P. 45-59.
222. Schellenberg G.D., Furlong C.E. Resolution of the multiplicity of the glutamate and aspartate transport systems of *Escherichia coli* // The Journal of Biological Chemistry. — 1977. — V. 252. — № 24. — P. 9055-9064.
223. Schmidt J.D.R., Walloch P., Höger B., Beitz E. Aquaporins with lactate/lactic acid permeability at physiological pH conditions: Aquaporins - essential channels for life // Biochimie. — 2021. — V. 188. — P. 7-11.
224. Schneider F., Krämer R., Burkovski A. Identification and characterization of the main beta-alanine uptake system in *Escherichia coli* // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2004. — V. 65. — № 5. — P. 576-582.
225. Schobert B., Lanyi J.K. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump // The Journal of Biological Chemistry. — 1982. — V. 257. — № 17. — P. 10306-10313.
226. Scholz P., Haring V., Wittmann-Liebold B., Ashman K., Bagdasarian M., Scherzinger E. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010 // Gene. — 1989. — V. 75. — № 2. — P. 271-288.
227. Schulz G.E. Bacterial porins: structure and function // Current Opinion in Cell Biology. — 1993. — V. 5. — № 4. — P. 701-707.
228. Schwan W.R., Wetzel K.J., Gomez V.S., Stiles M.A., Beitlich B.D., Grunwald S. Low-proline environments impair growth, proline transport and in vivo survival of *Staphylococcus aureus* strain-specific *putP* mutants // Microbiology. — 2004. — V. 150. — № Pt 4. — P. 1055-1061.

229. Schwan W.R., Lehmann L., McCormick J. Transcriptional activation of the *Staphylococcus aureus putP* gene by low-proline-high osmotic conditions and during infection of murine and human tissues // *Infection and Immunity*. — 2006. — V. 74. — № 1. — P. 399-409.
230. Schwan W.R., Wetzel K.J. Osmolyte transport in *Staphylococcus aureus* and the role in pathogenesis // *World journal of clinical infectious diseases*. — 2016. — V. 6. — № 2. — P. 22-27.
231. Schweizer H.P., Datta P. Identification and DNA sequence of *tdcR*, a positive regulatory gene of the *tdc* operon of *Escherichia coli* // *Molecular & general genetics: MGG*. — 1989a. — V. 218. — № 3. — P. 516-522.
232. Schweizer H.P., Datta P. The complete nucleotide sequence of the *tdc* region of *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Research*. — 1989b. — V. 17. — № 10. — P. 3994.
233. Shampo M.A., Kyle R.A., Steensma D.P. Paul D. Boyer—Nobel prize for work on ATP synthase // *Mayo Clinic Proceedings*. — 2011. — V. 86. — № 11. — P. e51.
234. Shao Z., Lin R.V., Newman E.B. Sequencing and characterization of the *sdaC* gene and identification of the *sdaCB* operon in *Escherichia coli* K12 // *European Journal of Biochemistry*. — 1994. — V. 222. — № 3. — P. 901-907.
235. Sharma C.M., Darfeuille F., Plantinga V.H., Vogel J. A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites // *Genes & Development*. — 2007. — V. 21. — № 21. — P. 2804-2817.
236. Sharma C.M., Papenfort K., Pernitzsch S.R., Mollenkopf H.-J., Hinton J.C.D., Vogel J. Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA // *Molecular Microbiology*. — 2011. — V. 81. — № 5. — P. 1144-1165.
237. Sievers, F., and Higgins, D. G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences // *Methods Mol. Biol.* — 2014. — V. 1079. — P. 105–116.

238. Simanshu D.K., Chittori S., Savithri H.S., Murthy M.R.N. Structure and function of enzymes involved in the anaerobic degradation of L-threonine to propionate // *Journal of Biosciences*. — 2007. — V. 32. — № 6. — P. 1195-1206.
239. Sittka A., Pfeiffer V., Tedin K., Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium* // *Molecular Microbiology*. — 2007. — V. 63. — № 1. — P. 193-217.
240. Somerville C.R., Ahmed A. rel-dependent methionine requirement in revertants of a methionyl-transfer RNA synthetase mutant of *Escherichia coli* // *Journal of Molecular Biology*. — 1977. — V. 111. — № 1. — P. 77-81.
241. Stautz J., Hellmich Y., Fuss M.F., Silberberg J.M., Devlin J.R., Stockbridge R.B., Hänelt I. Molecular mechanisms for bacterial potassium homeostasis // *J Mol Biol.*, — 2021. — V. 6. — P. 166968.
242. Stern M.J., Higgins C.F., Ames G.F. Isolation and characterization of lac fusions to two nitrogen-regulated promoters // *Molecular & general genetics: MGG*. — 1984. — V. 195. — № 1-2. — P. 219-227.
243. Stillwell W. Membrane Transport // *An Introduction to biological membranes*. — 2013. — P. 305-337.
244. Su Q., Schuppli D., Tsui HcT null, Winkler M.E., Weber H. Strongly reduced phage Qbeta replication, but normal phage MS2 replication in an *Escherichia coli* K12 mutant with inactivated Qbeta host factor (*hfq*) gene // *Virology*. — 1997. — V. 227. — № 1. — P. 211-214.
245. Suerbaum S., Josenhans P. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host // *Nature Reviews. Microbiology*. — 2007. — V. 5. — № 6. — P. 441-452.
246. Sugawara E., Nikaido H. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. — 1992. — V. 267. — № 4. — P. 2507-2511.

247. Sumantran V.N., Schweizer H.P., Datta P. A novel membrane-associated threonine permease encoded by the *tdcC* gene of *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. — 1990. — V. 172. — № 8. — P. 4288-4294.
248. Sun J., Deng Z., Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2014. — V. 453. — P. 265-267
249. Sun X., Zhulin I., Wartell R.M. Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq // Nucleic Acids Research. — 2002. — V. 30. — № 17. — P. 3662-3671.
250. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 // Mol Biol Evol. — 2021. — V. 38. — P. 3022-3027.
251. Tani V.H., Khodursky A., Blumenthal R.M., Brown P.O., Matthews R.G. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2002. — V. 99. — № 21. — P. 13471-13476.
252. Thèze J., Margarita D., Cohen G.N., Borne F., Patte J.P. Mapping of the structural genes of the three aspartokinases and of the two homoserine dehydrogenases of *Escherichia coli* K-12 // Journal of Bacteriology. — 1974. — V. 117. — № 1. — P. 133-143.
253. Thomason L.C., Costantino N., Court D.L. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction // Current Protocols in Molecular Biology. — 2007. — V. 1. — P. 1.17.1-1.17.8.
254. Tong H., Hu Q., Zhu L., Dong X. Prokaryotic Aquaporins // Cells. — 2019. — V. 8. — № 11. — P. 1316.
255. Umbarger H.E. Evidence for a negative-feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine // Science. — 1956. — V. 123. — № 3202. — P. 848.
256. Umbarger H.E., Brown B. Threonine deamination in *Escherichia coli*. II. Evidence for two L-threonine deaminases // Journal of Bacteriology. — 1957. — V. 73. — № 1. — P. 105-112.

257. Updegrove V.B., Zhang A., Storz G. Hfq: the flexible RNA matchmaker // *Current Opinion in Microbiology*. — 2016. — V. 30. — P. 133-138.
258. Urban J.H., Vogel J. Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo // *Nucleic Acids Research*. — 2007. — V. 35. — № 3. — P. 1018-1037.
259. Urbanowski M.L., Stauffer L.V., Stauffer G.V. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli* // *Molecular Microbiology*. — 2000. — V. 37. — № 4. — P. 856-868.
260. Valentin-Hansen P., Eriksen M., Udesen P. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions // *Molecular Microbiology*. — 2004. — V. 51. — № 6. — P. 1525-1533.
261. Vanderpool C.K. Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress // *Current Opinion in Microbiology*. — 2007. — V. 10. — № 2. — P. 146-151.
262. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models // *Nucleic Acids Research*. — 2022. — V. 50. — P. 439–D444.
263. Vasil'eva I.M., Garber M.B. The regulatory role of the Hfq protein in bacterial cells // *Molekuliarnaia Biologiia*. — 2002. — V. 36. — № 6. — P. 970-977.
264. Verheul A., Wouters J.A., Rombouts F.M., Abee V. A possible role of ProP, ProU and CaiT in osmoprotection of *Escherichia coli* by carnitine // *Journal of Applied Microbiology*. — 1998. — V. 85. — № 6. — P. 1036-1046.
265. Veronese F.M., Boccu E., Conventi L. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Induction, purification and properties of the enzyme // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. — 1975. — V. 377. — № 2. — P. 217-228.

266. Vogel S.R., Deck C., Richert P. Accelerating chemical replication steps of RNA involving activated ribonucleotides and downstream-binding elements // *Chemical Communications*. — 2005. — № 39. — P. 4922-4924.
267. Vybornaya V.V., Yuzbashev V.V., Fedorov A.S., Bubnov D.M., Filippova S.S., Bondarenko F.V., Sineoky S.P. Use of an alternative pathway for isoleucine synthesis in threonine-producing strains of *Escherichia coli* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2020. — V. 56. — № 7. — P. 759-769.
268. Wagner E.G.H., Romby P. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it // *Adv Genet*. — 2015. — V. 90. — P. 133-208.
269. Wang H.H., Isaacs F.J., Carr P.A., Sun Z.Z., Xu G., Forest C.R., Church G.M. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution // *Nature*. — 2009. — V. 460. — № 7257. — P. 894-898.
270. Wang Y., Liu L., Jin Z., Zhang D. Microbial cell factories for green production of vitamins // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. — 2021a. — V. 9.
271. Wang J., Ma W., Wang X. Insights into the structure of *Escherichia coli* outer membrane as the target for engineering microbial cell factories // *Microbial Cell Factories*. — 2021b. — V. 20. — № 1. — P. 73.
272. Warner D.M., and Levy S.B. Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob on susceptibility of *Escherichia coli* to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-dependent CAMP induction of the *marRAB* operon // *Microbiology (Reading)*. — 2010. — V. 156. — P. 570–578.
273. Watson N. A new revision of the sequence of plasmid pBR322 // *Gene*. — 1988. — V. 70. — № 2. — P. 399-403.
274. West I.C., Mitchell P. Stoichiometry of lactose-H⁺ symport across the plasma membrane of *Escherichia coli* // *The Biochemical Journal*. — 1973. — V. 132. — № 3. — P. 587-592.
275. West I.P. Energy coupling in secondary active transport // *Biochimica Et Biophysica Acta*. — 1980. — V. 604. — № 1. — P. 91-126.

276. Weston C.J., Venning J.D., Jackson J.B. The membrane-peripheral subunits of transhydrogenase from *Entamoeba histolytica* are functional only when dimerized // The Journal of Biological Chemistry. — 2002. — V. 277. — № 29. — P. 26163-26170.
277. Whelan S., and Goldman N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach // Mol Biol Evol. — 2001. — V. 18. — P. 691-699.
278. White D.G., Goldman J.D., Demple B., Levy, S.B. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1997. — V. 179. — P. 6122–6126.
279. Wu Y., Patil R.V., Datta P. Catabolite gene activator protein and integration host factor act in concert to regulate *tdc* operon expression in *Escherichia coli*. // Journal of Bacteriology. — 1992a. — V. 174. — № 21. — P. 6918-6927.
280. Wu Y.F., Datta P. Integration host factor is required for positive regulation of the *tdc* operon of *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. — 1992b. — V. 174. — № 1. — P. 233-240.
281. Xie X., Xu L., Shi J., Xu Q., Chen N. Effect of transport proteins on L-isoleucine production with the L-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. — 2012. — V. 39. — № 10. — P. 1549-1556.
282. Yang Q., Figueroa-Bossi N., Bossi L. Translation enhancing ACA motifs and their silencing by a bacterial small regulatory RNA // PLoS genetics. — 2014. — V. 10. — № 1. — P. e1004026.
283. Young G.B., Jack D.L., Smith D.W., Saier M.H. The amino acid/auxin:proton symport permease family // Biochimica Et Biophysica Acta. — 1999. — V. 1415. — № 2. — P. 306-322.
284. Yuzbashev V.V., Vybornaya V.V., Larina A.S., Gvilava I.V., Voyushina N.E., Mokrova S.S., Yuzbasheva E.Yu., Manukhov I.V., Sineoky S.P., Debabov V.G. Directed modification of *Escherichia coli* metabolism for the design of

- threonine-producing strains // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2013. — V. 49. — № 9. — P. 723-742.
285. Zakataeva N.P., Aleshin V.V., Tokmakova I.L., Troshin P.V., Livshits V.A. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux // *FEBS letters*. — 1999. — V. 452. — № 3. — P. 228-232.
286. Zhang A., Wassarman K.M., Ortega J., Steven A.C., Storz G. The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs // *Molecular Cell*. — 2002. — V. 9. — № 1. — P. 11-22.
287. Zhang A., Wassarman K.M., Rosenow C., Tjaden B.C., Storz G., Gottesman S. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq // *Molecular Microbiology*. — 2003. — V. 50. — № 4. — P. 1111-1124.
288. Zhang Y., Meng Q., Ma H., Liu Y., Cao G., Zhang X., Zheng P., Sun J., Zhang D., Jiang W., Ma Y. Determination of key enzymes for threonine synthesis through in vitro metabolic pathway analysis // *Microbial Cell Factories*. — 2015. — V. 14. — P. 86.
289. Zhou Y., Imlay J.A. *Escherichia coli* uses a dedicated importer and desulfidase to ferment cysteine // *mBio*. — 2022. — V. 13. — № 2. — P. e0296521.
290. Ziegler C.A., Freddolino P.L. *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein bridges DNA *in vivo* and tunably dissociates in the presence of exogenous leucine // *mBio*. — 2023. — V. 14. — № 2. — P. e02690-22.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность (5'–3')*
997	GCCCAGTAGTAGGTTGAGG
999	GGTTGAGGCCGTTGAGCAC
1071	CAATGCTCGACTCACAGGG
1363	TGCCCCGGCCTACATTAGAG
1416	ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGAAACCGTTGTGGTCTCCCTCACACATTATACGAGCC
1891	ACATTAACCTATAAAAAATAGGCG
2733	AACGCATTGATGAAATCGCGTTTGCCGAAGCGGCAAAGATGGCAACTTTTGGTGCAAAAGTACTGCATCCGGC
3393	TTAAAGCAATTCCAGCGCCAGTAATTCTTCGATGGTCTGGCGACGGCGAACAGGGTTTTCCCAGTCACGA
3394	ATGCCACATTCACTGTTTCAGCACCGATACCGATCTCACCGCCGAAAATCTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
3501	GCTTCGCTATCATTGATTAATTTCACTTGCGACTTTGGCTGCTTTTTGTACAGGGTTTTCCCAGTCACGA
3502	AACGGAGCCGACCATAACCGCGCCAGCCGATAAAACCAACATTTTTTCATGGTTGTTACCTCGTTACCTTTG
3896	TCCCGGAAACGGTGGGCCGTCTGGCGAAAGTAAAAAATATTATCGGAATCTGTGACGGAAGATCACTTCG
3897	GAAACCAGCTCTTTGATCTGGTTTACACGCGTTAAGTTCCTGTTGCCTCACCAGCAATAGACATAAGCG
4186	GTTCAGTGGGCACGTGTTATACACGCGCTGAAATGAAGGATGGTTTCATGCCAAGCTTGCATGCCTGC
4187	TTTCCTGTCTTTACGCCCTATCGTCAGGTAGACGATAGGGCATCGGGTTAGGGATCCTCTAGAGTCGAG
4190	TGAACTGGCTAAAAGCTGAATTATTTGCATTCCCTCCAGGAGAAATAGATGCCAAGCTTGCATGCCTGC
4191	TCGCGTTAAAACGGAGGAAGCGCCGCCGAAAGCGGCGCGAAAGGACTTAGGGATCCTCTAGAGTCGAG
4194	TGCCCTAATATTTATTCTTCTTATCACGTTTTAATCACTGGATATCGATGCCAAGCTTGCATGCCTGC
4195	CCAATCAGCACCATTTCTGACGGTTCAGTACATTATCATGGGTATGCGTGGGATCCTCTAGAGTCGAG
4202	GTGATTACAGACCTTTTTTGATTTTCCCGTTTACTTCAAATTTTTTCATCGGCCAAGCTTGCATGCCTGC
4203	ATGACGAAGTAAACGGAGCATGGCAGCTCCGTTTCATTTGAAAGGAATTAGGGATCCTCTAGAGTCGAG

4206 TCTCACCGCCTGGTCTTACTGGTTTATGTGGATGGCGGTGGGGATCTCTGCCAAGCTTGCATGCCTGC
 4207 CACCATCCCCGGAAGCACGCTGGCACTGTAGACGTAGACAAACACACGCTGGGATCCTCTAGAGTCGAG
 4327 ATGACCCATCAATTAAGATCGCGCGATATCATCGCTCTGGGCTTTATGACTGCCAAGCTTGCATGCCTGC
 4328 TTAGTGAGCGCTGGAGGTCACCTGACGACCTGCCGCGCGATCCCAGATAAGGGATCCTCTAGAGTCGAG
 4348 ACCGCTTCATTTCGCCAGCAGCGCATCACCAGTATCGGAAAGCACTACATGGCCAGGCAAAGGATCTAAGCTTTC
 4349 CAAAAACAGTGCAGTATAAAAAAAGAACAGTCTGATTTGTTAACACATAATCTGCGCGAGATCTTGAAGCC
 4550 AATCGTCTGCTACAATCGCGCCTCATTTTTAAGATGGATAGCATTTTTGTCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
 4551 ATTGAAAAAGCCCTCTCGGTTGAGAGGGCTTAGCAAGGAAGGGAGGAAACATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
 4919 ATGTTCTCACCGCAGTCACGCTTGCGTCATGCAGTTGCAGATACGTTTCGCGCCAAGCTTGCATGCCTGC
 4920 TCAGGCTTTTACCTGCTGGTAACGGCTGACTTTAAACAGTCGGCGGCAATGGGATCCTCTAGAGTCGAG
 4923 ATGCTGAAAAGGAAAAAAGTAAAACCGATTACCCTTCGTGATGTCACCATGCCAAGCTTGCATGCCTGC
 4924 TTATTCATCAATTTCGCGGATGTTGCTGCACCAGGCGGGTACGTTTCGCTGGGATCCTCTAGAGTCGAG
 4927 ATGCAAGCAACAGCCACAACACTCGACCACGAGCAAGAATACACGCCGATGCCAAGCTTGCATGCCTGC
 4928 TTACAACGACTGATGTCGCGTCTCATGGGTCAGCAGCAGGGCGATTAACGGGGATCCTCTAGAGTCGAG
 4931 ATGTCTAATATTTGGTCTAAAGAAGAAACTCTGTGGAGTTTCGCGCTCTAGCCAAGCTTGCATGCCTGC
 4932 TTAGCTAAAGAACATTACCGATACGCACAGGATACCCACGATCAGCGTAAGGGATCCTCTAGAGTCGAG
 5039 ATGGTAGATAGCAAGAAGCGCCCTGGCAAAGATCTCGACCGTATCGATCGGCCAAGCTTGCATGCCTGC
 5040 TTAGCGCGTCTTAATAACCAGACGATTACTCTGCTTGACTTCTTCCATAAAGGGATCCTCTAGAGTCGAG
 5369 TGGCGTTAATGGGGAATGCACAGGCAGTGACGACCATTCCGTTCTGGCATTCTCAATGCTCACGCTGTAG
 5370 TCGCGTTCTTTTCCAGCTGGCGTACACGCTCAGCGGAAACGCCGTAACGGATTTCTTCCAGAATTGCCATGA
 5672 TTACTIONAAACAAATTACTATGCAGTTTTTGCACCACCTGCTCGGCATCTTGCCAAGCTTGCATGCCTGC
 5673 ATGTCTGAAATTGTTGTCTCCAAATTTGGCGGTACCAGCGTAGCTGATTTGGGATCCTCTAGAGTCGAG
 5704 CGCCATAAACTGCCAGGAATTGGGGATCGGAATTCTTTTCCTCTCTTTGTAAAGCGA
 5705 ACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGCGAGCTCGGTACCCGGGTGTTGTGTTTGCATGCTTTC
 5827 ATCGATGAATTCAATAGGCCGGATGCGGCG

5828 GAGCTCGGTACCCGGTTATTTTTTGGCTAACGAATAGC
5847 ACTTCCTGAGCCGGAACGAAAAGTTTTATCGGAATGCGTGTTCTGGTGAAATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
5848 AAAAAAAGCACCGCAATTAGGCGGTGCTACATTAATCACTATGGACAGACAGGGTTTTCCCAGTCACGA
5851 ATGGCTAAGGGGCAATCTTTACAAGATCCGTTTCCTGAACGCACTGCGTCGATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
5852 TTATTCGGTTTCTTCGCTGTCCTGTTGCGCGGAAGTATTCTGCGCGCTGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA

Приложение 2. Конструирование штаммов, использованных в работе

Название штамма	Способ получения	Предок
B1734	Получен в результате введения десенсибилизирующей мутации в ген <i>lysC</i> ^{E250K} в штамме B1175 с помощью λ Red-опосредованной трансформации олигонуклеотидом 2733.	B1175
B1792	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔyifK::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4206 и 4207 с pISA	B1175
B1794	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔsdaC::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4190 и 4191 с pISA	B1175
B1796	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔydgI::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4194 и 4195 с pISA	B1175
B1798	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔyhjE::cat</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4927 и 4928 с pITA	B1175
B1800	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔychE::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4202 и 4203 с pISA	B1175
B1802	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔyjeM::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4186 и 4187 с pISA	B1175
B1805	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔbrnQ::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4327 и 4328 с pISA	B1175
B1806	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔsdaC::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4190 и 4191 с pISA	B1426
B1817	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔyifK::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4206 и 4207 с pISA	B1426
B1818	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔbrnQ::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4327 и 4328 с pISA	B1426
B1851	Получен в результате трансдукции мутации <i>ΔbrnQ::aadA1</i> из B1818 в B1817	B1817
B1893	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔlivKHMgf::cat</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4348 и 4349 с pMW-attL-Cm-attR-ter_rrnB	B1426

B1895	Получен в результате трансдукции мутации $\Delta livKHMGF::cat$ из B1893 в B1851	B1851
B1950	Получен в результате последовательной трансдукций мутаций $\Delta yjeM$ из B1802, $\Delta sdaC$ из B1794, $\Delta ydgI$ из B1796 и $\Delta ychE$ из B1800 в B1895	B1895
B2075	Получен в результате интеграции кассеты $\Delta lysP::aadA1$. Кассета была амплифицирована по праймерам 4550 и 4551 с pISA	B1426
B2092	Получен в результате интеграции кассеты $\Delta lysP::aadA1$. Кассета была амплифицирована по праймерам 4550 и 4551 с pISA	B1175
B2101	Получен в результате трансдукции мутации $\Delta lysP::aadA1$ из B2075 в B1895	B1895
B2102	Получен в результате замены нативного промотора <i>lysC</i> в штамме B1734, путем интеграции конструкции <i>cat-sacB</i> -P _{L-tac} , полученной с помощью ПЦР по праймерам 997+1416 и плазмиды pSC-P _{L-tac} в качестве матрицы.	B1734
B2110	Получен в результате интеграции кассеты $\Delta lysC::aadA1$. Кассета была амплифицирована по праймерам 5672 и 5673 с pISA	B1175
B2115	Получен в результате замены нативной промоторной области гена <i>asd</i> на P _{H207} бактериофага T5 в штамме B1175. Интегративная кассета <i>asd::aadA1</i> -P _{H207} синтезировали с помощью ПЦР с использованием пары праймеров 3501+3502 и хромосомы B516 в качестве матрицы ДНК.	B1175
B2120	Получен в результате замены нативной промоторной области гена <i>asd</i> на P _{A1} бактериофага T7 в штамме B1175. Интегративная кассета <i>asd::aadA1</i> -P _{A1} синтезировали с помощью ПЦР с использованием пары праймеров 3501+3502 и хромосомы B514 в качестве матрицы ДНК.	B1175
B2288	Получен в результате трансдукции мутации $\Delta livKHMGF::cat$ из B1893 в B1817	B1817
B2289	Получен в результате трансдукции мутации $\Delta livKHMGF::cat$ из B1893 в B1818	B1818
B2370	Получен в результате трансдукции <i>thrABC</i> ^{wt} из MG1655 в B1851	B1851
B2374	Получен в результате трансдукции <i>thrABC</i> ^{wt} из MG1655 в B1426	B1426
B2394	Получен в результате трансдукции <i>thrABC</i> ^{wt} из MG1655 в B1895	B1895
B2395	Получен в результате трансдукции <i>thrABC</i> ^{wt} из MG1655 в B2288	B2288
B2396	Получен в результате трансдукции <i>thrABC</i> ^{wt} из MG1655 в B2289	B2289
B2429	Получен в результате трансдукции $\Delta sdaC::aadA1$ из B1806 в B2394	B2394
B2430	Получен в результате трансдукции $\Delta sdaC::aadA1$ из B1806 в B2396	B2396
B2458	Получен в результате трансдукции $\Delta sdaC::aadA1$ из B1806 в B2370	B2370
B2460	Получен в результате трансдукции $\Delta lrp::aadA1$ из B2678 в B2394	B2394
B2462	Получен в результате трансдукции $\Delta lrp::aadA1$ из B2678 в B2396	B2396

B2468	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔyqeG::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4931 и 4932 с pISA	B1426
B2469	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔyhjE::cat</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 4927 и 4928 с pITA	B1426
B2678	Получен в результате интеграции кассеты <i>Δlrp::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 5039 и 5040 с pISA	MG1655
B2722	Получен в результате трансдукции <i>ΔyhjE::cat</i> из B2469 в B1895	B1895
B2738	Получен в результате интеграции кассеты <i>Δhfq::tetA</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 5851 и 5852 с pLA	B2396
B2739	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔgcvB::aadA1</i> . Кассета была амплифицирована по праймерам 5847 и 5848 с pLA	B2396
B2753	Получен в результате трансдукции <i>Δhfq::tetA</i> из B2738 в B2739	B2739
B2769	Получен в результате трансдукции <i>ΔyjeM::aadA1</i> из B1802 в B2722	B2722
B2789	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔalaE::aadA1</i> в B2769.. Кассета была амплифицирована по праймерам 4919 и 4920 с pISA	B2769
B2792	Получен в результате интеграции кассеты <i>ΔproP::cat</i> в B2789. Кассета была амплифицирована по праймерам 4923 и 4924 с pISA	B2789
B2794	Получен в результате трансдукции <i>ΔsdaC::aadA1</i> из B1794 в B2792	B2792
B2797	Получен в результате трансдукции <i>ΔychE::aadA1</i> из B1800 в B2794	B2794
B2800	Получен в результате трансдукции <i>ΔydgI::aadA1</i> из B1796 в B2797	B2797
B2818	Получен в результате трансдукции <i>ΔyqeG::aadA1</i> из B2468 в B2800	B2800
B2820	Получен в результате трансдукции <i>Δlrp::aadA1</i> из B2678 в B2055	B2055
B2824	Получен в результате трансдукции <i>ΔyhjE::cat</i> из B2469 в B2055	B2055
B2827	Получен в результате трансдукции <i>ΔproP::cat</i> из B2792 в B2824	B2824
B2873	Получен в результате трансдукции <i>ΔalaE::aadA1</i> из B2789 в B2824	B2824
B2875	Получен в результате трансдукции <i>ΔyqeG::aadA1</i> из B2468 в B2827	B2827

Приложение 3. Конструирование плазмид, использованных в работе

Название плазмиды	Способ получения	Матрица
pBR-B1817	Геномная библиотека штамм В1817 хранящаяся на среднекопийных плаزمидах pBR322. Хромосомную ДНК В1817 обрабатывали рестриктазой Bsp143I с последующим выделением из агарозного геля фрагментов длиной 1,5–6 т.п.н. Выделенные фрагменты хромосомной ДНК лигировали с линейризованным по сайту BamHI вектором pBR322.	pBR322
pBR- <i>brnQ</i>	Плазмида pBR- <i>brnQ</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост <i>yifK</i> -мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>brnQ</i> включает в себя весь ген <i>brnQ</i> .	pBR-B1817
pBR- <i>sdaC</i>	Плазмида pBR- <i>sdaC</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост тройного <i>yifK brnQ livKHMGF</i> - мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>sdaC</i> включает в себя весь ген <i>sdaC</i> .	pBR-B1817
pBR- <i>alaE</i>	Плазмида pBR- <i>alaE</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост тройного <i>yifK brnQ livKHMGF</i> - мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>alaE</i> включает в себя весь ген <i>alaE</i> .	pBR-B1817
pBR- <i>proP</i>	Плазмида pBR- <i>proP</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост тройного <i>yifK brnQ livKHMGF</i> - мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>proP</i> включает в себя весь ген <i>proP</i> .	pBR-B1817
pBR- <i>yjeM</i>	Плазмида pBR- <i>yjeM</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост тройного <i>yifK brnQ livKHMGF</i> - мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>yjeM</i> включает в себя весь ген <i>yjeM</i> .	pBR-B1817
pBR- <i>ychE</i>	Плазмида pBR- <i>ychE</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост тройного <i>yifK brnQ livKHMGF</i> - мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>ychE</i> включает в себя весь ген <i>ychE</i> .	pBR-B1817
pBR- <i>ydgl</i>	Плазмида pBR- <i>ydgl</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост тройного <i>yifK brnQ livKHMGF</i> - мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>ydgl</i> включает в себя весь ген <i>ydgl</i> .	pBR-B1817
pBR- <i>yhjE</i>	Плазмида pBR- <i>yhjE</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост тройного <i>yifK brnQ livKHMGF</i> - мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>yhjE</i> включает в себя весь ген <i>yhjE</i> .	pBR-B1817
pBR- <i>yqeG</i>	Плазмида pBR- <i>yqeG</i> была выделена из геномной библиотеки штамма В1817 на основании ее способности обеспечивать рост тройного <i>yifK brnQ livKHMGF</i> - мутантного штамма на агаре М9, дополненном треонином и изолейцином. Вставка хромосомной ДНК в плазмиде pBR- <i>yqeG</i> включает в себя весь ген <i>yqeG</i> .	pBR-B1817
pMW- <i>liv</i>	Получали <i>in vivo</i> методом «gap repair» (Datta et al., 2006). Для этого основной плазмидный фрагмент, включающий pSC101 ориджин и маркер устойчивости к ампициллину (Ap ^R), был амплифицирован с использованием праймеров 5369 и 5370 и матрицы pMW118. Полученный ПЦР-продукт вводили электропорацией в штамм В2137 (Bubnov et al., 2022b), и отбирали колонии, устойчивые к	pMW118

ампициллину. Успешная рекомбинация линейного ПЦР-синтезируемого вектора с хромосомой привела к рециркуляции плазмиды и извлечению хромосомного участка *livJ-panZ-livKHMGF* в вектор.

pDEW- <i>yifK</i>	Получали в результате клонирования промотора <i>yifK</i> перед транскрипционным фьюжном <i>luxCDABE</i> в плазмиде pDEW201 методом Гибсона (Gibson et al., 2009). Для этого вставка была синтезирована в результате амплификации методом ПЦР с использованием пары праймеров 5704 и 5705 и хромосомы MG1655 в качестве матрицы ДНК. Вектор pDEW201 перед лигированием был обработан эндонуклеазами рестрикций EcoRI и KpnI.	pDEW201
pDEW- <i>yhjE</i>	Получали в результате клонирования промотора <i>yhjE</i> перед транскрипционным фьюжном <i>luxCDABE</i> в плазмиде pDEW201 методом Гибсона (Gibson et al., 2009). Для этого вставка была синтезирована в результате амплификации методом ПЦР с использованием пары праймеров 5827 и 5828 и хромосомы MG1655 в качестве матрицы ДНК. Вектор pDEW201 перед лигированием был обработан эндонуклеазами рестрикций EcoRI и KpnI.	pDEW201
pMW- <i>gdhA</i>	Получали в результате лигирования двух фрагментов. Вставка была синтезирована в результате амплификации методом ПЦР с использованием пары праймеров 1071+1363 и хромосомы <i>E. coli</i> MG1655 в качестве матрицы. Вектор получали в результате обработки эндонуклеазой рестрикции SmaI.	pMW118

Приложение 4. Патенты на изобретение, полученные по результатам настоящей работы

Хозов А.А., Выборная Т.В., Синеокий С.П., Бубнов Д.М., Степанова А.А., Кудина М.Д. Штамм *Escherichia coli* с инактивированным геном *yhjE* - продуцент L-треонина // Патент на изобретение RU2787585C1, дата регистрации 11.01.2023 Заявка № RU2022127020A от 18.10.2022 (1,04 / 0,88)

Хозов А.А., Бубнов Д.М., Выборная Т.В., Кудима М.Д., Синеокий С.П. Штамм *Escherichia coli* с инактивированным геном *sdaC* - продуцент L-треонина // Патент на изобретение RU2774071C1, дата регистрации 15.06.2022 Заявка № RU2021128735A от 01.10.2021 (0,92 / 0,78)

Хозов А.А., Бубнов Д.М., Выборная Т.В., Кудима М.Д., Синеокий С.П. Штамм *Escherichia coli* с инактивированным геном *lysP* - продуцент L-треонина // Патент на изобретение RU2758269C1, дата регистрации 27.10.2021 Заявка № RU2020132712A от 05.10.2020 (0,92 / 0,78)