

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Москва - 2025

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в Биоресурсном центре – Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт».

Научные руководители: **Нетрусов Александр Иванович**
доктор биологических наук, профессор

Бубнов Дмитрий Михайлович
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Донова Марина Викторовна**,
доктор биологических наук, ФГБУН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, лаборатория микробиологической трансформации органических соединений, заведующая лабораторией

Мирошников Константин Анатольевич
доктор химических наук, член-корреспондент РАН, ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, отдел молекулярной биологии и биотехнологии растений, лаборатория молекулярной биоинженерии, главный научный сотрудник

Богачев Александр Валерьевич
доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, отдел молекулярной энергетики микроорганизмов, заведующий отделом

Защита диссертации состоится «03» июня 2025 года в 15 ч 30 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

Тел: 8(495)-939-35-46

Электронная почта: nvkostina@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3431>

Автореферат разослан «29» апреля 2025 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Транспорт метаболитов через цитоплазматическую мембрану бактерий играет ключевую роль в регуляции обмена веществ, обеспечении их роста и адаптации к нестабильным условиям окружающей среды. Результаты исследований механизмов трансмембранного транспорта в клетках бактерий не только способствуют более глубокому пониманию физиологии бактериальной клетки, но и открывают широкие перспективы для их прикладного использования в медицинской и промышленной биотехнологии. Так, системы транспорта аминокислот являются важными факторами вирулентности опасных патогенов *Vibrio cholerae* и *Bacillus anthracis*, вызывающих холеру и сибирскую язву, соответственно. В связи с этим полученные знания могут быть использованы при разработке эффективных стратегий борьбы с бактериальными инфекциями, включая создание новых противомикробных препаратов, совершенствование способов доставки лекарств, а также конструирование рекомбинантных штаммов, которые могут быть использованы в качестве живых вакцин (Jung et al., 2012; Dutta et al., 2022).

В контексте задач промышленной биотехнологии особый интерес представляет микробиологическое производство незаменимых аминокислот, в частности L-треонина, что обусловлено его широким спросом в сельском хозяйстве. Одним из ключевых этапов создания предприятия по микробиологическому производству L-треонина является конструирование эффективного 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 транспортных систем, участвующих в поглощении конечного продукта из питательной среды (Li et al., 2021). Исходя из этого, актуальной задачей для оптимизации свойств продуцентов является инактивация всех путей поступления продукта в клетку.

В настоящее время идентифицировано более 480 белков-транспортёров, что составляет около 11% от общего числа известных белков в клетках *Escherichia coli* (*E. coli*) (Keseler et al., 2021). Интересу к поиску новых переносчиков способствует тот факт, что геном *E. coli* все еще содержит несколько сотен так называемых «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. Кроме того, несмотря на всестороннюю изученность *E. coli*, в ряде работ имеются убедительные доказательства того, что в ее клетках все еще функционирует ранее неидентифицированная и неохарактеризованная транспортная система, специфичная по отношению к L-треонину, активность которой ингибируется избытком L-серина (Kruse et al., 2001). В связи с этим данная работа была посвящена поиску и описанию ранее неидентифицированных генов, контролирующих захват L-треонина и L-серина.

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 L-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 L-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 L-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*, *ydgl*, *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 SycA 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.

Объём и структура диссертации

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 *E. coli*.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обосновывается актуальность темы исследования, а также формулируется цель и задачи исследования.

Обзор литературы состоит из четырёх глав. В главе 1 представлен общий обзор бактериальных транспортных систем, рассмотрены механизмы их функционирования и дана современная классификация. Глава 2 посвящена подробной характеристике транспортных систем гидроксикаминокислот в клетках *E. coli*, при этом особое внимание уделено истории их открытия и молекулярным механизмам работы. В главе 3 рассмотрены пути регуляции биосинтеза бактериальных транспортных систем. В заключительной главе 4 обсуждается влияние направленной модификации транспортных систем аминокислот на свойства штаммов-продуцентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы. Все штаммы *E. coli*, использованные в работе, были сконструированы с использованием λ Red-рекомбинации (Datsenko and Wanner, 2000; Ellis et al., 2001) и трансдукции фагом P1 ν ir (Thomason et al., 2007).

Среды и реагенты. Для культивирования клеток *E. coli* использовали богатую среду LB. Для исследования скорости роста дефектных по синтезу и

транспорту треонина клеток, а также измерения транспорта треонина и серина *in vitro*, использовали минимальную среду М9.

Конструирование геномной библиотеки. Для конструирования геномной библиотеки в качестве ДНК использовали хромосому штамма В1817 (MG1655 $\Delta thrBC \Delta sstT \Delta tdcBCDE::neo \Delta yifK$), а в качестве вектора среднекопийную плазмиду pBR322 (Bolivar et al., 1977b; Watson, 1988). 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 гель-электрофореза. Вектор pBR322, линейаризованный по уникальному сайту *Bam*HI, лигировали с ранее выделенными фрагментами хромосомной ДНК. 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.

Фенотипическая оценка скорости роста клеток. 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 М9, 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 $\approx$ 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.

Измерение транспортной активности. 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. При необходимости в среду вносили необходимые антибиотики. При выращивании ауксотрофных по треонину штаммов в среду добавляли 50 мМ треонина. На следующий день ночную культуру разбавляли в 20 мл той же среды до OD₆₀₀ $\approx$ 0,0625 и растили до OD₆₀₀ $\approx$ 0,5. Все последующие действия выполняли на льду. Надосадочную жидкость удаляли, а клетки дважды промывали 25 мл среды М9. Осадок суспендировали в 1 мл М9 с 0,2% глюкозы, измеряли оптическую плотность и разбавляли той же средой до OD₆₀₀ $\approx$ 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. Поглощение аминокислот инициировали смешиванием клеточной суспензии и раствора субстрата таким образом, чтобы конечное значение оптической плотности культуры в реакционной смеси при OD₆₀₀ $\approx$ 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 M9. Мембраны высушивали и измеряли радиоактивность, используя 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-106 на жидкостном сцинтилляционном спектрометре RackBeta1215 (ЛКВ, Финляндия). Транспортную активность выражали в наномолях субстрата, поглощенного 1 мг сухой биомассы (DCW) за 1 минуту.

Оценка способности штаммов к накоплению 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. 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: H_2O (4:46:50) в качестве подвижной фазы. Концентрацию треонина определяли с помощью рефрактометра Waters 2414 при 420 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск нового переносчика L-треонина

Гипотеза о существовании ранее неизвестной транспортной системы треонина и серина зародилась в конце 20-го века при изучении ростовых потребностей промышленного штамма продуцента треонина. Японские исследователи установили, 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 его основных и ранее охарактеризованных переносчиков TdcS и SstT (Okamoto et al., 1997). Однако несколько лет спустя другая группа исследователей показала, что инактивация TdcS и SstT не вызывает полного подавления транспорта треонина, а сконструированный мутант способен эффективно поглощать треонин из культуральной среды, и эта активность ингибируется избытком серина (Kruse et al., 2001). Предоставленные данные указывали на наличие в клетках *E. coli* дополнительной, ранее неописанной транспортной системы, специфичной по отношению к треонину, и, возможно, серину, что послужило основанием для проведения настоящего исследования.

В качестве первого модельного организма был выбран штамм *E. coli* B1044, ранее сконструированный с применением как случайного мутагенеза, так и направленных модификаций продуцента треонина. B1044 несет в своем геноме как множество неизвестных случайных мутаций, так и направленные модификации. Среди них $\Delta thrBC$ и $ilvA^{442}$ вызывают ауксотрофность к треонину и изолейцину, в результате чего рост B1044 на минимальной среде (M9) зависит от наличия и концентрации этих аминокислот. Делеции $\Delta tdcBCDE$ и $\Delta sstT$ ведут к инактивации известных переносчиков треонина и серина, ухудшая способность клеток эффективно усваивать эти субстраты. Результаты фенотипического теста показали (рис. 1), что пороговая концентрация треонина, при которой штамм B1044 начинает расти на агаризованной M9, составляет 40 мкМ. 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 избытком серина.

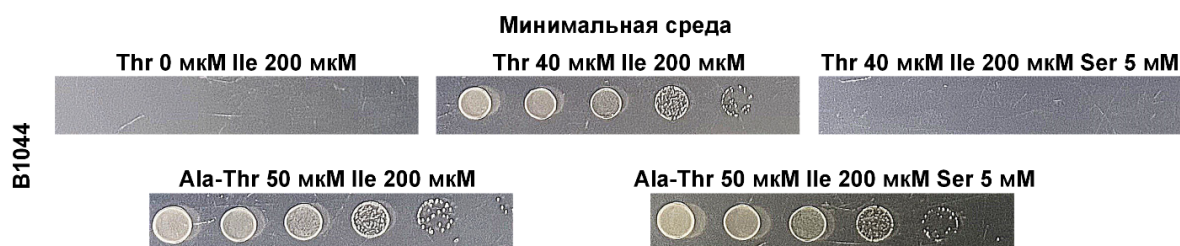


Рисунок 1. Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1044 на агаризованной M9 с добавлением L-треонина или L-аланил-L-треонина в качестве источника L-треонина. Обозначения аминокислот: Thr – L-треонин; Ile – L-изолейцин; Ala-Thr – L-аланил-L-треонин; Ser – L-серин.

В результате случайного мутагенеза B1044 и последующего анализа роста нескольких тысяч полученных мутантов на агаризованной M9, содержащей треонин в концентрации 40 мкМ, был отобран штамм B1082, который не был способен расти в этих условиях, но сохранил способность расти на M9 с L-аланил-L-треонином. B1082 показал значительное повышение пороговой концентрации и стал требовать более 700 мкМ треонина для роста (рис. 2). В ходе секвенирования его генома было идентифицировано четыре мутации, только одна из которых затрагивала мембранный белок и могла быть связана с нарушением транспорта аминокислот. Эта мутация представляла собой сдвиг рамки считывания в 22-м кодоне ORF *yifK*, который кодирует предполагаемый мембранный транспортер из суперсемейства симпортеров аминокислот Amino Acid-Polyamine-Organocation (Saier et al., 2014). Учитывая предсказанную локализацию YifK в цитоплазматической мембране и принадлежность к семейству переносчиков аминокислот, была выдвинута гипотеза о том, что ухудшение способности мутанта B1082 поглощать экзогенный треонин связано с инактивацией YifK.



Рисунок 2. 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.

Для исключения влияния нелокализованных мутаций, а также ауксотрофности по изолейцину, 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 *yifK* в B1426 был получен B1817. Неожиданно, но анализ фенотипа B1817 не показал ухудшения его роста по сравнению с B1426 на агаризованной M9 с треонином, что наблюдалось для пары B1044 и B1082. Подавление роста B1817 происходило, только если в среду был внесен изолейцин (рис. 3). 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.

В результате скрининга геномной библиотеки B1817 был идентифицирован ген *brnQ*, как многокопийный супрессор дефекта транспорта треонина в условиях избытка изолейцина. Согласно базе данных транспортеров, BrnQ относится к семейству симпортеров аминокислот с разветвлённой боковой цепью (BCAA): L-изолейцина, L-лейцина и L-валина. Исходя из полученных результатов была сформулирована гипотеза о том, что *brnQ*, будучи специфичным для изолейцина переносчиком, также участвует в процессе поглощения треонина, когда изолейцин исключается из среды. Тем не менее, инактивация *brnQ* в B1817 не привела к каким-либо изменениям в динамике роста полученного мутанта B1851, включая подавление его роста изолейцином (рис. 3).



Рисунок 3. 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.

Наиболее вероятным объяснением наблюдаемого фенотипа являлась возможная активность по отношению к треонину транспортной системы LIV-I, для которой ранее была показана функция поглощения BCAA-аминокислот и фенилаланина. В одной из работ было обнаружено, что треонин незначительно ингибирует активность LIV-I по отношению к ее основному субстрату, фенилаланину (Koyanagi et al., 2004). Эти наблюдения служат косвенным

подтверждением того, что система LIV-I может быть вовлечена в поглощение 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 треонина для роста вне зависимости от наличия изолейцина в среде, что в 32,5 раза превышает пороговую концентрацию для его предков B1426, B1817 и B1851 (рис. 3).

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 результате анализа их фенотипа на агаризованной M9 (рис. 4), в зависимости от концентрации треонина, а также смеси треонина и изолейцина, треонина и серина, было показано, что штамм, в котором функционирует YifK, способен эффективно усваивать экзогенный треонин, однако его рост ингибируется в присутствии избытка серина, что свидетельствует о конкурентном ингибировании и вероятности того, что серин также является субстратом YifK. Система LIV-I вносит сопоставимый с YifK вклад в процесс поглощения треонина, поскольку соответствующие мутанты растут схожим образом на среде с треонином, однако избыток серина лишь незначительно влияет на рост штамма с активным LIV-I. Вклад BrnQ был виден только если в среде содержалось более 200 мкМ треонина, что указывает на то, что его специфичность по отношению к треонину существенно ниже, чем специфичность YifK и LIV-I. Избыток серина не оказывает влияния на рост штамма B2288, что исключает его из потенциальных субстратов системы BrnQ.

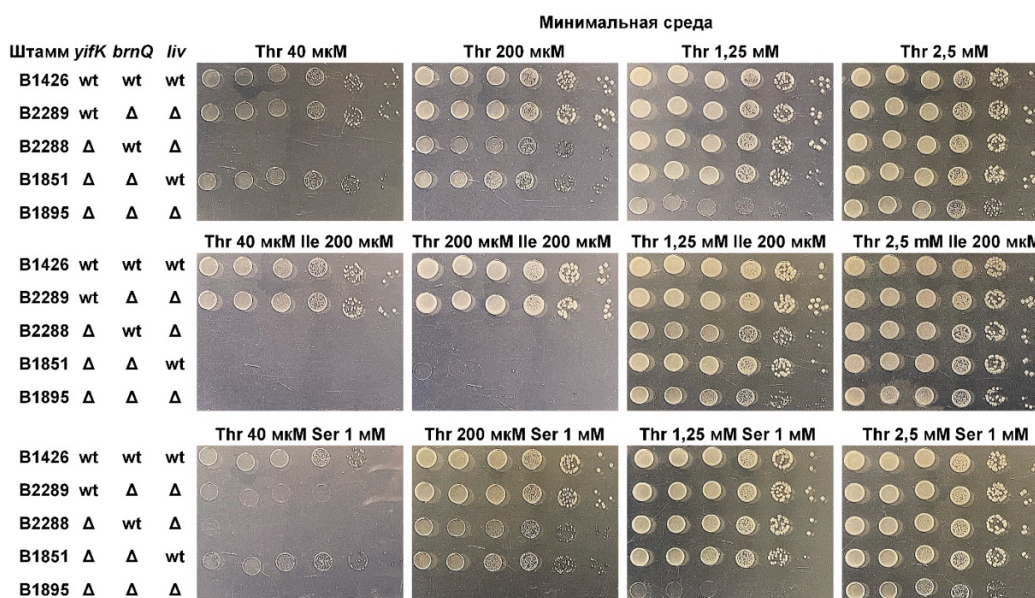


Рисунок 4. Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1426 и его двойных мутантных производных, несущих YifK, BrnQ и LIV-I в качестве единственного переносчика треонина, при постепенном увеличении концентрации L-треонина на агаризованной M9. Влияние конкурирующих субстратов (L-изолейцина и L-серина) оценивали по их способности ингибировать рост клеток. В качестве отрицательного контроля был взят штамм B1895, несущий делеции во всех трех исследуемых генах.

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

В ходе прямого измерения активности YifK, BrnQ и LIV-I по отношению к треонину с использованием живых клеток и меченного L-[U-¹⁴C]-треонина в концентрации 50 мкМ было показано (рис. 5), что клетки тройного мутанта B2394 ($\Delta yifK \Delta brnQ \Delta livK$) полностью потеряли способность накапливать экзогенный треонин. При анализе клеток, в которых активна одна из идентифицированных транспортных систем, было обнаружено, что в условиях этого эксперимента активность наблюдалась только у штаммов, 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.

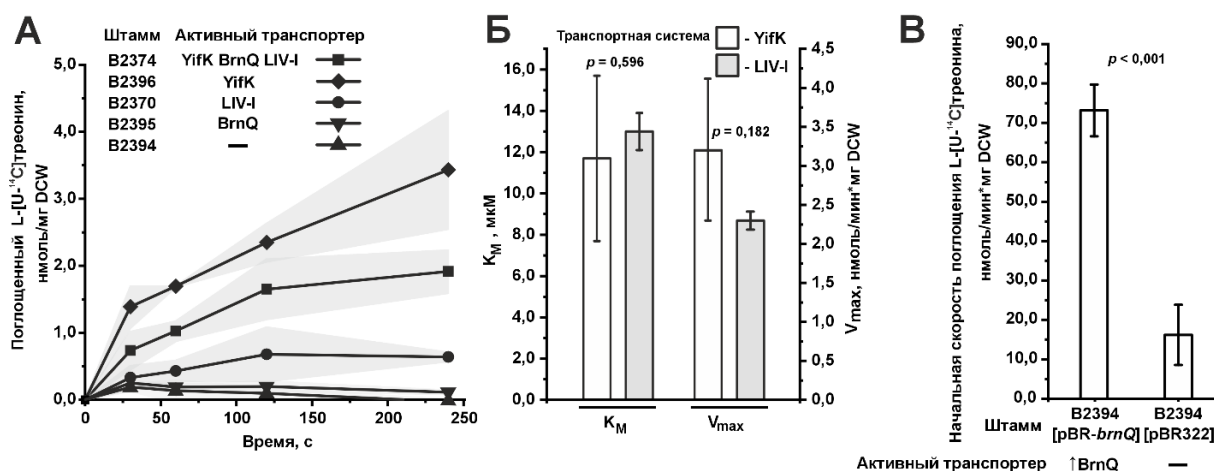


Рисунок 5. Исследование активности YifK, BrnQ и LIV-I *in vitro*. Планки погрешностей обозначают SD. Показанные значения p были рассчитаны с использованием двустороннего t -критерия Стьюдента с неравными дисперсиями. Измерения были выполнены в трех биологических повторах. **А** - Динамика накопления L-треонина клетками штамма B2374 и его двойных мутантных производных, несущих YifK, BrnQ и LIV-I в качестве единственной транспортной системы треонина. 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], оверэкспрессирующего brnQ благодаря многокопийной плазмиде pBR-brnQ. Символ ↑ обозначает оверэкспрессию. Время реакции составляло 1 мин, концентрации треонина в среде – 800 мкМ.

Ввиду высокой скорости поглощения треонина переносчиками 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. 5Б). Кинетический анализ LIV-I по отношению к треонину показал значения K_M и V_{max} , равные $13,0 \pm 0,9$ мкМ и $2,3 \pm 0,09$ нмоль/мин*мг DCW, соответственно (рис. 5Б). В

совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что YifK и LIV-I проявляются высокую специфичность к треонину.

Определение достоверных значений K_M и V_{max} для транспортной системы BrnQ в рамках данного исследования оказалось невозможным. Тем не менее, совокупность полученных результатов однозначно подтверждает участие BrnQ в поглощении треонина. Во-первых, BrnQ является многокопийным супрессором дефекта транспорта треонина. Во-вторых, на агаризованной M9 штамм B2288, экспрессирующий хромосомную копию BrnQ, демонстрирует стабильный рост при 200 мкМ треонина в среде на фоне $\Delta yifK$ и $\Delta livKHMG$, тогда как тройной мутант B1895 ($\Delta yifK \Delta brnQ \Delta livKHMG$) не способен расти в этих условиях (рис. 4). Наконец, в результате прямого измерения активности было продемонстрировано, что скорость поглощения треонина четырехкратно возрастает в штамме, сверхэкспрессирующем этот транспортер за счет плазмиды pBR-brnQ, полученной при скрининге геномной библиотеки (рис. 5B). 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 физиологической концентрации в среде, а его активность при нефизиологично высоком содержании треонина становится доминирующей.

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

Поскольку результаты фенотипического теста указывали на конкурентное ингибирование транспорта треонина избытком серина в клетках, экспрессирующих YifK (рис. 4), его активность по отношению к последнему была измерена *in vitro*. Результаты этого эксперимента свидетельствовали о том, что штамм с диким аллелем YifK способен потреблять экзогенный серин на фоне инактивации всех известных транспортных систем (рис. 6А), тогда как скорость поглощения в клетках *yifK*-мутанта значительно снижается, что доказывает роль YifK в поглощении этой аминокислоты. Рассчитанное значение K_M для серина составило $89,4 \pm 7,9$ мкМ, а V_{max} $14,4 \pm 0,6$ нмоль/мин*мг DCW.

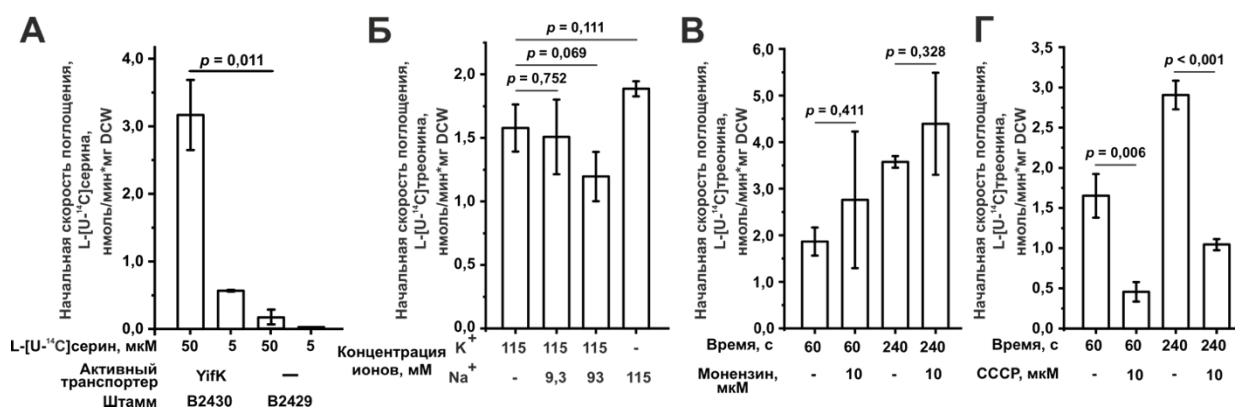


Рисунок 6. Анализ активности YifK и механизма энергизации транспорта. **А** – Активность YifK по отношению к серину. Эксперименты были проведены на клетках штамма B2430, лишённого всех известных транспортеров L-серина, и его производного $\Delta yifK$ штамма B2429 при указанных концентрациях L-серина и времени реакции 1 мин. **Б** - Влияние ионного состава реакционной смеси на транспорт L-треонина, опосредуемый YifK. Время реакции – 60 сек. **В** - Влияние моноензина на транспорт L-треонина, опосредуемый YifK. **Г** - Влияние CCCP на транспорт L-треонина, опосредуемый YifK.

В ходе изучения механизма энергизации транспорта YifK было показано, что ни изменение ионного состава среды, ни прединкубация клеток с Na^+ -разобщителем монензином не оказывает существенного влияния на активность YifK (рис. 6Б, 6В), в то время как прединкубация клеток с протонным разобщителем карбонилцианид-м-хлорфенилгидразоном (CCCP) привело к трехкратному снижению активности транспорта треонина (рис. 6Г). Полученные результаты прямо указывают на то, что активность YifK не зависит от Na^+ градиента, а транспорт субстратов происходит в симпорте с H^+ .

Активность LIV-I по отношению к L-серину

Сравнительный анализ активности LIV-I по отношению к серину *in vitro* в дефектном по транспорту серина штамме B2458 ($\Delta\text{sstT } \Delta\text{tdcC } \Delta\text{yifK } \Delta\text{sdaC}$) и его изогенном производном B2429 ($\Delta\text{sstT } \Delta\text{tdcC } \Delta\text{yifK } \Delta\text{sdaC } \Delta\text{livKHMGF}$), не выявил значительных различий в способности клеток поглощать серин (рис. 7). Для повышения чувствительности анализа была измерена активность поглощения серина в штаммах, оверэкспрессирующих LIV-I благодаря плазмиде pMW-liv. В штамме B2429[pMW-liv] наблюдалась активность по отношению к серину, сопоставимая с SdaC, что свидетельствует о способности LIV-I переносить этот субстрат (рис. 7). На основании полученных данных был сделан вывод, что система LIV-I может участвовать в поглощении серина, однако ее активность при физиологически нормальных условиях незначительна.

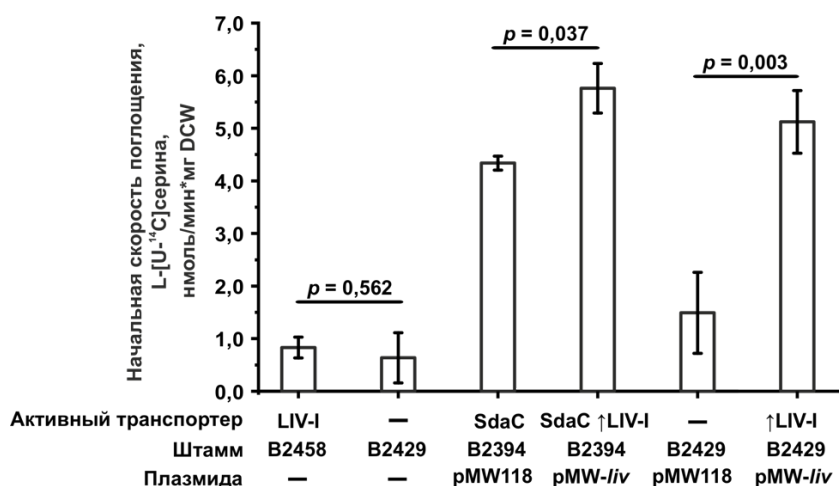


Рисунок 7. Исследование активности LIV-I по отношению к L-серину. Скорость поглощения измеряли при 100 мкМ L-серина в реакционной смеси. Время реакции составляло 1 мин. Вертикальная стрелка ↑LIV-I указывает на оверэкспрессию LIV-I в штаммах, несущих плазмиду pMW-liv. Показанные значения представляют собой среднее значение трех биологических повторов.

Механизмы поглощения L-треонина при нефизиологических концентрациях субстрата в среде

Инактивация ранее охарактеризованных, а также идентифицированных в ходе данной работы переносчиков треонина привела к многократному падению активности транспорта треонина в мутанте B2394 (рис. 5А). 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 М9 при концентрации треонина выше 1,25 мМ (рис. 4). Это

указывало на то, 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.

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

В результате повторного скрининга многокопийных супрессоров, способных восстановить рост B1895 на агаризованной M9 при концентрации треонина 1 мМ, были отобраны как ранее охарактеризованные гены *sdaC*, *alaE* и *proP*, кодирующие мембранные транспортные системы, для которых не была показана функция переноса треонина, так и гены с неизвестной функцией *yjeM*, *ychE*, *ydgl*, *yqeG* и *yhjE*. 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 et al., 2021).

В ходе фенотипической оценки было подтверждено, что амплификация отобранных многокопийных супрессоров на векторе pBR322 способствует восстановлению роста B1895 при непермиссивных концентрациях треонина на агаризованной M9 (рис. 8А). Среди них амплификация *sdaC* и, в меньшей степени *yhjE*, на плазмиде pBR-*sdaC* и pBR-*yhjE* соответственно, придает клеткам чувствительность к высоким концентрациям треонина (рис. 8А). Делеция *yhjE* и *sdaC* приводит к выраженному дефекту роста B2722 и B2794, соответственно, тогда как инактивация остальных генов не вызывает значительных фенотипических изменений (рис. 8Б). Кроме того, в результате прямого измерения активности поглощения треонина было показано, что дефектный по транспорту треонина штамм B2394, оверэкспрессирующий *sdaC*, *yhjE*, и *ydgl* благодаря плазмидам pBR-*sdaC*, pBR-*yhjE* и pBR-*ydgl*, соответственно, демонстрирует примерно двукратное увеличение скорости поглощения треонина по сравнению с клетками, несущими пустой вектор pBR322 (рис. 8В). Полученные результаты свидетельствуют о том, что при условии отсутствия специализированных систем транспорта треонина и высокой концентрации субстрата в среде, SdaC, YhjE и, вероятно, Ydgl, проявляют наибольшую активность по отношению к треонину среди всех идентифицированных многокопийных супрессоров. Поскольку инактивация *ychE*, *yjeM*, *alaE*, *proP* и *yqeG* не оказала выраженного влияния на фенотип клеток (рис. 8Б), а их амплификация не повлияла на активность поглощения треонина (рис. 8В), 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 оверэкспрессии на многокопийном векторе более вероятно, что они обладают активностью по отношению к треонину, которая не детектируется при использованных концентрациях субстрата. Наконец, было показано, что инактивация всех идентифицированных многокопийных супрессоров способствует устойчивости мутанта B2818 к токсичным концентрациям треонина (рис. 8Г), что указывает на значительное снижение проницаемости клеточной мембраны для этого субстрата.

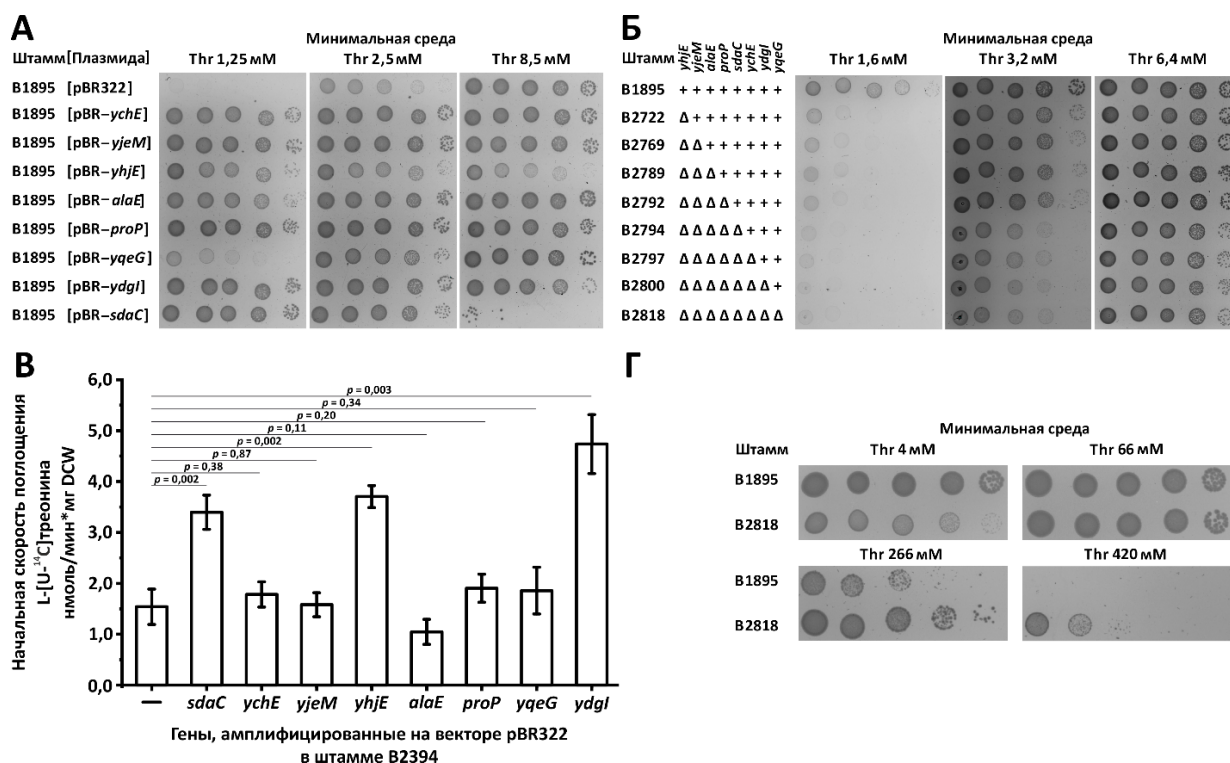


Рисунок 8. Исследование фенотипа идентифицированных многокопийных супрессоров. **А** - Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1895, лишенного всех известных специфических систем поглощения треонина и его производных, несущих плазмиды pBR-*ychE*, pBR-*yjeM*, pBR-*yhjE*, pBR-*alaE*, pBR-*proP*, pBR-*yqeG*, pBR-*ydgl* и pBR-*sdaC* на агаризованной M9 при концентрации треонина 1,25 mM, 2,5 mM и 8,5 mM. **Б** - Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту штамма B1895, лишенного всех известных специфических систем поглощения треонина и его мутантных производных на агаризованной M9 при концентрации треонина 1,6 mM, 3,2 mM и 6,4 mM. **В** - 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. **Г** - Анализ роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1895, и его мутантного производного, лишенного всех идентифицированных многокопийных супрессоров, на агаризованной среде M9 при токсичных концентрациях треонина: 4 mM, 66 mM, 266 mM и 420 mM.

Хромосомные супрессии дефекта по транспорту L-треонина

Второй подход к поиску низкоаффинных переносчиков треонина заключался в отборе случайных мутаций, способных восстановить дефект роста, вызванный инактивацией основных систем транспорта. Для этого был использован штамм B1950, производный B1426, несущий делеции в генах *yifK*, *brnQ*, *livK*, *HMGF*, *yjeM*, *sdaC*, *ydgl* и *ychE*. Секвенирование генома семи независимо отобранных мутантов выявило несколько супрессорных мутаций: *lrp*^{T134A}, *marC*^{G11E}, *marC*^{L10Q}, *marC*^{V145E}, *marC*^{S140SS}, *сусА*^{C110S} и *сусА*^{V226A}. Среди них миссенс-мутация *lrp*^{T134A} затрагивает регуляторный белок. Неохарактеризованный мембранный белок MarC имеет некоторую гомологию с YchE. Пермеаза CusA контролирует захват D-серина, D-аланина, D-циclosерина, L-аланина, глицина и β-аланина в симпорте с H⁺ и обладает гомологией с YifK.

В результате фенотипического анализа было показано, что все штаммы, несущие в своем геноме отобранные мутации, способны расти при непермиссивных для B1950 концентрациях треонина (рис. 9А). 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. 9Б). 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.

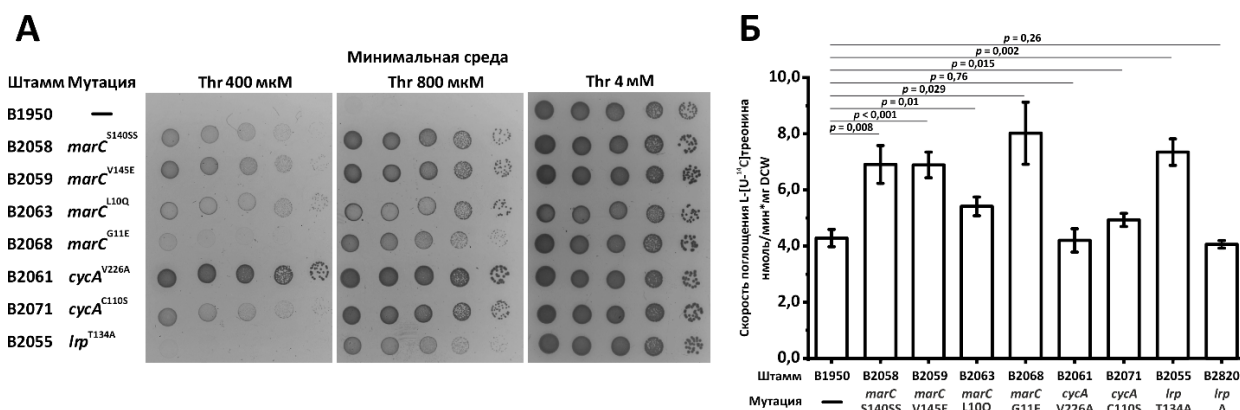


Рисунок 9. Исследование фенотипа идентифицированных хромосомных мутаций. **А** – Фенотипический анализ роста дефектного по синтезу и транспорту штамма B1950 и его производных, несущих миссенс-мутации *marC*^{T93A}, *marC*^{V145E}, *marC*^{L10Q}, *marC*^{G11E}, *cysA*^{V226A}, *cysA*^{C110S}, *lrp*^{T134A} на агаризованной M9 при возрастающей концентрации треонина. **Б** - 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.

Сравнительный анализ активности транспорта треонина клетками B2055 (B1950 *lrp*^{T134A}) и изогенного мутанта B2820 (Δ *lrp*) показал, что мутация T134A значительно повышает скорость поглощения треонина, тогда как инактивация Lrp не оказывает эффекта на эту активность (рис. 9Б). На основании этих данных был сделан вывод, что мутантный *lrp*^{T134A} кодирует синтез функционального, но модифицированного регуляторного белка Lrp. Дополнительное подтверждение этой гипотезы было получено в результате прямой оценки функциональности Lrp^{T134A} с помощью транскрипционного фьюжна промотора *uhjE* и оперона *luxCDABE* *P. luminescens* в штаммах, несущих аллели *lrp*^{wt}, *lrp*^{T134A} или Δ *lrp* (рис. 10Б). Эксперимент показал, что Lrp^{T134A} активирует транскрипцию *uhjE* в несколько меньшей степени, чем дикий Lrp. В то же время Δ *lrp* приводит к значительному снижению активности промотора *uhjE* 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.

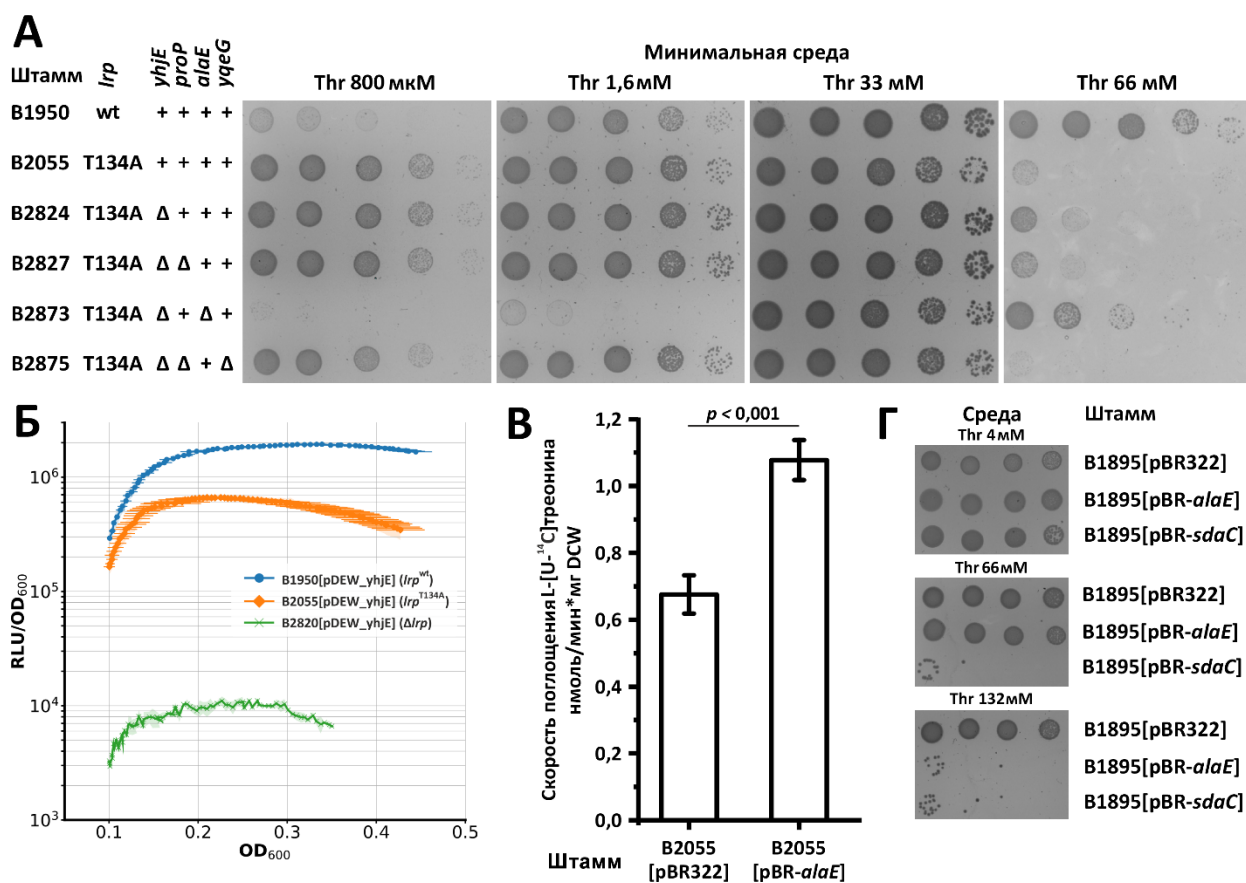


Рисунок 10. Исследование фенотипа мутации *lrp*^{T134A}. **А** – Анализ скорости роста дефектного по синтезу и транспорту штамма B2055 (*lrp*^{T134A}), и его мутантных производных $\Delta yhjE$, $\Delta proP$, $\Delta alaE$ и $\Delta yqeG$, на агаризованной М9 с различными концентрациями треонина. **Б** – 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 . **В** – Оценка активности транспорта треонина клетками штамма B2055 (*lrp*^{T134A}), гиперэкспрессирующем *AlaE* на векторе pBR322. Скорость поглощения измеряли при 800 мкМ треонина в реакционной смеси. Время реакции составляло 1 мин. **Г** – Сравнение скорости роста дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1895 и его производных, гиперэкспрессирующих либо *AlaE*, либо *SdaC*, на агаризованной М9, дополненной 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 привела бы к снижению активности транспорта треонина, и, как следствие, к ухудшению роста полученного мутанта. Действительно, инактивация *alaE* привела к существенному снижению роста мутанта при концентрациях треонина 0,8–1,6 мМ (рис. 10А). 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. 10А), что указывает на снижение проницаемости клеточной мембраны к этому субстрату.

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. 10В), тогда как в аналогичном эксперименте с B2394, несущим дикий аллель *lrp*^{wt}, не было выявлено увеличения активности при амплификации *alaE* (рис. 8В). Полученные результаты свидетельствуют о том, что 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. Кроме того, было установлено, что, подобно *sdaC*, оверэкспрессия *alaE* на многокопийном векторе pBR322 придает клеткам B1895 с диким аллелем *lrp* чувствительность к треонину (рис. 10Г). Этот результат впервые указывает на то, что ранее охарактеризованный экспортер аланина AlaE, также может участвовать в поглощении треонина даже на фоне дикого аллеля *lrp*, тем самым сочетая две разнонаправленные функции экспорта и импорта аминокислот в зависимости от состава питательной среды.

Исследование конкурентного ингибирования транспорта L-треонина

Третий подход к идентификации низкоаффинной транспортной системы специфичной к треонину и функционирующей в клетках штамма B1895 (*yifK ΔbrnQ Δliv*) заключался в поиске аминокислот, избыток которых по сравнению с треонином в среде М9 подавляет рост этого штамма. Такой фенотип может быть вызван конкурентным ингибированием активности переносчика одним субстратом по отношению ко второму. Для этого клетки дефектного по синтезу и транспорту 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. 11А), тогда как фенотип дикого штамма MG1655 и его *ΔthrBC ΔsstT ΔtdcC* производного B1426 остается неизменным.

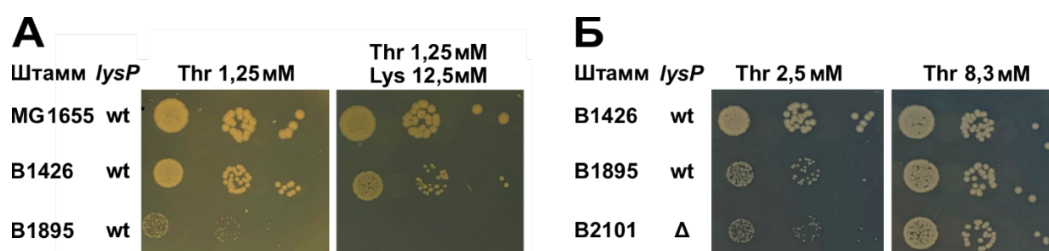


Рисунок 11. Анализ влияния избытка L-лизина в агаризованной среде М9 и аллельного состояния *lysP* на фенотип клеток, дефектных по синтезу и транспорту L-треонина. **А** – Анализ дикого штамма способности дикого штамма MG1655, и дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1426, и его изогенного *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. 11Б), что исключает значимую роль LysP в транспорте треонина.

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

Снижение проницаемости клеточной мембраны для треонина, обусловленное инактивацией систем его поглощения из питательной среды, может способствовать усилению его биосинтеза за счёт уменьшения внутриклеточной концентрации треонина и ослабления эффекта ретроингибирования (Yuzbashev et al., 2013). Так, в ходе пробирочной ферментации продуцента треонина B1175 было показано, что инактивация $\Delta yifK$ (B1792), $\Delta sdaC$ (B1794), $\Delta yhjE$ (B1798) и $\Delta brnQ$ (B1805) увеличивает продукцию треонина культурой на 5–7% (рис. 12). Неожиданно, но инактивация *lysP* (B2092) в B1175 привела к увеличению продукции треонина на 18%, что превосходит эффект инактивации ранее идентифицированных транспортеров треонина. Учитывая, что ранее было показано, что LysP не участвует в поглощении треонина, дальнейшее исследование было направлено на выявление механизма его влияния на продукцию треонина в штамме-продуценте B1175.

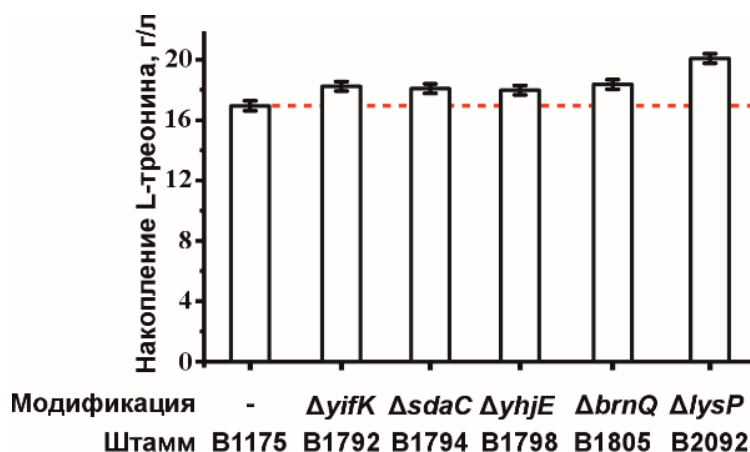


Рисунок 12. Анализ способности штамма-продуцента B1175 и его изогенных мутантных производных к накоплению экзогенного треонина. Значения, показанные на рисунке, представляют собой средние значения по меньшей мере трёх биологических повторов, планки погрешностей отражают SD. Для сравнения величин использовали двусторонний *t*-тест с неравными дисперсиями. Для всех анализируемых пар значение *p*-value < 0,05.

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. 11Б) и, как следствие, на его способность поглощать экзогенный треонин, означало, что увеличение продуктивности штамма-продуцента B2092 (рис. 13А), вероятнее всего, связано с изменением проницаемости клеточной мембраны для его основного субстрата, а именно лизина. 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. 13Б). Напротив, при проведении ферментации в условиях частичного голодания по лизину, с использованием ауксотрофного по лизину штамма B1713, изогенного производного B1175 с мутацией в *dapA*, продукция треонина возрастала на 33% (рис. 13В). 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.

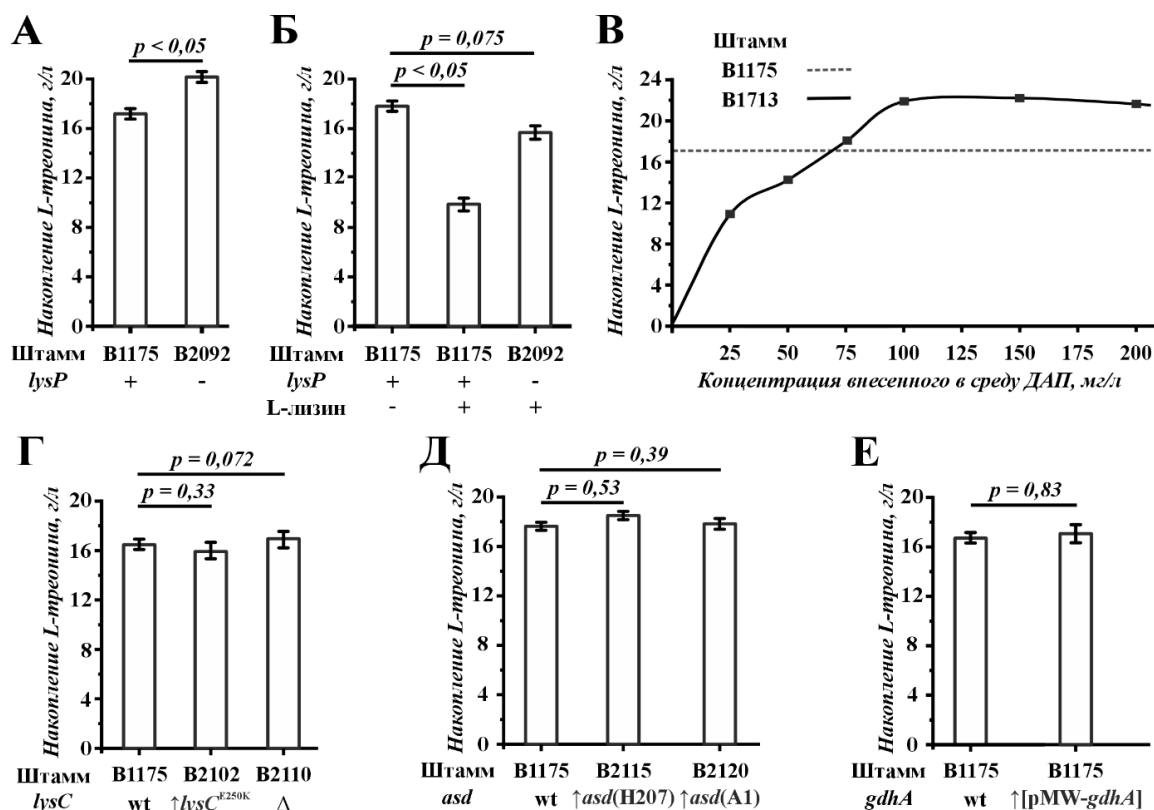


Рисунок 13. Анализ способности штамма-продуцента к накоплению треонина. А – Уровень накопления треонина штаммом B1175 и его изогенным производным B2092, мутантным по *lysP*. Б – Влияние лизина (1 г/л) в питательной среде на уровень накопления треонина штаммом B1175 и его изогенным производным B2092, мутантным по *lysP*. В – Зависимость уровня накопления треонина ауксотрофным по мезо-ДАП штаммом B1713 (B1175 $\Delta dapA$) от концентрации мезо-ДАП в питательной среде. Г - 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. Д– 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. Е - 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 три фермента, синтез или активность которых контролируется внутриклеточным пулом лизина: аспартаткиназа III (LysC), аспартатполуальдегиддегидрогеназа (Asd) и глутаматдегидрогеназа (GdhA). Однако в ходе работы было показано, что на уровень продукции треонина не влияет ни введение в *lysC* десенсибилизирующей к лизину мутации E250K (Kikuchi et al., 1999) с одновременной заменой нативного промотора на сильный конститутивный промотор P_{L-tac}, ни полная инактивация LysC (рис. 13Г). Исходя из полученных результатов можно сделать 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^{br}). Таким образом, механизм влияния лизина на продукцию треонина не связан с LysC. Кроме того, было продемонстрировано, что лизин не оказывает ингибирующего эффекта на Asd и GdhA, поскольку их амплификация также не влияет на уровень продукции треонина клетками, несущими дикий аллель *lysP* (рис. 13Д, 13Е). 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 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, впервые был идентифицирован H⁺-зависимым симпортер L-треонина и L-серина YifK, который обладает более высоким сродством к L-треонину. Эти свойства позволяют классифицировать YifK как бифункциональный транспортер, основной субстрат которого определяется концентрацией этих аминокислот в окружающей среде. Ввиду его большей специфичности к L-треонину, мы предлагаем для него новое обозначение - ThrP.

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.

Инактивация YifK и BrnQ позволила показать непосредственное участие транспортной системы LIV-I в поглощении L-треонина и L-серина *in vitro*. LIV-I

обладает сродством к L-треонину, сравнимым с YifK. Вместе с тем низкая транспортная активность LIV-I по отношению к L-серину, наблюдаемая лишь при условии гиперэкспрессии генов LIV-I, указывает на малый вклад переносчика в его поглощение.

На основе полученных данных можно представить законченную модель поступления L-треонина и L-серина в клетку *E. coli* (рис. 14). Так, при физиологически нормальных условиях, захват L-треонина опосредуется переносчиками, специфичными к L-серину (SstT, TdcC, YifK) и аминокислотам с разветвленным радикалом (LIV-I и BrnQ). Вклад каждого отдельного транспортера в минимальной среде при физиологических концентрациях субстрата может быть представлен как SstT = YifK > LIV-I > BrnQ. Если исключить из рассмотрения незначительную транспортную активность LIV-I по отношению к L-серину, то его поглощение происходит посредством SdaC, YifK и SstT.

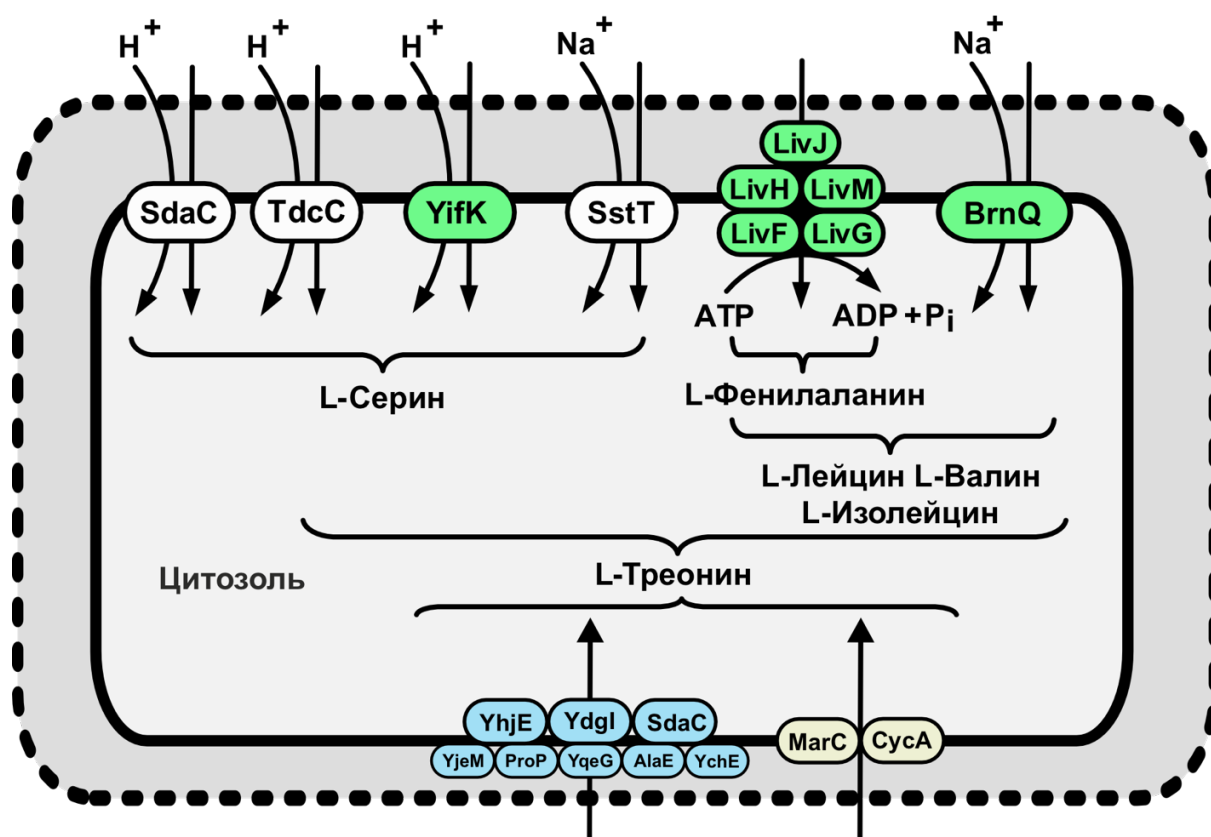


Рисунок 14. Схема путей поглощения L-серина и L-треонина в клетках *E. coli* K-12. Пунктирные и сплошные линии обозначают внешнюю и цитоплазматическую мембраны, соответственно. Белым цветом выделены ранее известные переносчики L-серина/L-треонина (SdaC, TdcC и SstT). Зеленым цветом выделены специализированные 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, было выявлено 10 генов, кодирующих мембранные белки, а именно *yhjE*, *yjeM*, *ydgl*, *ychE*, *yqeG*, *sdaC*, *alaE*, *proP*, *cysA* 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 фенотипу 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 переносчиками L-треонина на фоне мутаций Δ *sstT*, Δ *tdcC*, Δ *yifK*, Δ *brnQ* и Δ *livKHMGF*. Наконец, было показано, что идентифицированная мутация *lrp*^{T134A} приводит к синтезу функционального, но изменённого Lrp, который, в свою очередь, дерепрессирует транскрипцию *AlaE*, что повышает активность поглощения L-треонина. Ввиду того, что функции генов *yhjE*, *yjeM*, *ydgl*, *ychE*, *yqeG* и *marC* на текущий момент неизвестны, полученные данные могут быть использованы для дальнейшего описания роли указанных генов и поиска их физиологически релевантных субстратов.

В контексте задач промышленной биотехнологии было показано, что инактивация транспортных систем *yifK*, *sdaC*, *brnQ* и *yhjE* способствует улучшению уровня продукции L-треонина штаммом-продуцентом *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 L-треонина культурой продуцента. Однако в этом случае, улучшение способности продуцента к накоплению L-треонина напрямую связано со снижением проницаемости мембраны для L-лизина и, как следствие, 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 трех 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 возможность плейотропного 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-продуцентов 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 CusA 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 работ, опубликованных по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

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, Q3)]

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)

Патенты РФ:

1. **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)

2. **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)

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