

УДК 579.66

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ L-ЛИЗИНА И ЕГО ТРАНСПОРТЕРА LYSP НА СВОЙСТВА ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА L-ТРЕОНИНА

© 2023 г. А. А. Хозов<sup>1,2,\*</sup>, Д. М. Бубнов<sup>1</sup>, Т. В. Выборная<sup>1</sup>, М. Д. Кудина<sup>1</sup>, А. А. Степанова<sup>1,3</sup>, О. Е. Мелькина<sup>1</sup>, С. В. Молев<sup>1,2</sup>, С. С. Филиппова<sup>1</sup>, А. И. Нетрусов<sup>2</sup>, С. П. Синеокий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

<sup>2</sup>Кафедра микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>3</sup>Химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, 125047 Россия

\*e-mail: khozov.m@student.msu.ru

Поступила в редакцию 07.08.2023 г.

После доработки 19.09.2023 г.

Принята к публикации 01.10.2023 г.

В настоящей работе впервые было показано, что инактивация системы импорта L-лизина из внешней среды приводит к увеличению уровня синтеза L-треонина штаммом *Escherichia coli*, его продуцирующим, тогда как добавление лизина в питательную среду снижает продуктивность немодифицированного штамма, что свидетельствует о влиянии внутриклеточного пула лизина на эффективность биосинтеза треонина. Исследование возможных механизмов этого влияния показало, что ни ранее известные ингибирование активности аспартаткиназы III (LysC), ни репрессия синтеза аспартатполуальдегиддегидрогеназы (Asd) и глутаматдегидрогеназы (GdhA) по отдельности не являются причинами падения продуктивности культуры. Полученные результаты могут свидетельствовать как о наличии прежде неизвестного механизма регуляции метаболизма треонина лизином, так и о том, что влиянию этой аминокислоты подвержены одновременно несколько ферментов в пути биосинтеза треонина. Вместе с тем, изменение проницаемости мембраны для лизина, либо снижение его внутриклеточной концентрации в результате изменения эффективности его биосинтеза является перспективным подходом для совершенствования штаммов-продуцентов треонина.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, L-треонин, продуцент L-треонина, L-лизин, регуляция биосинтеза аминокислот

**DOI:** 10.56304/S0234275823040051

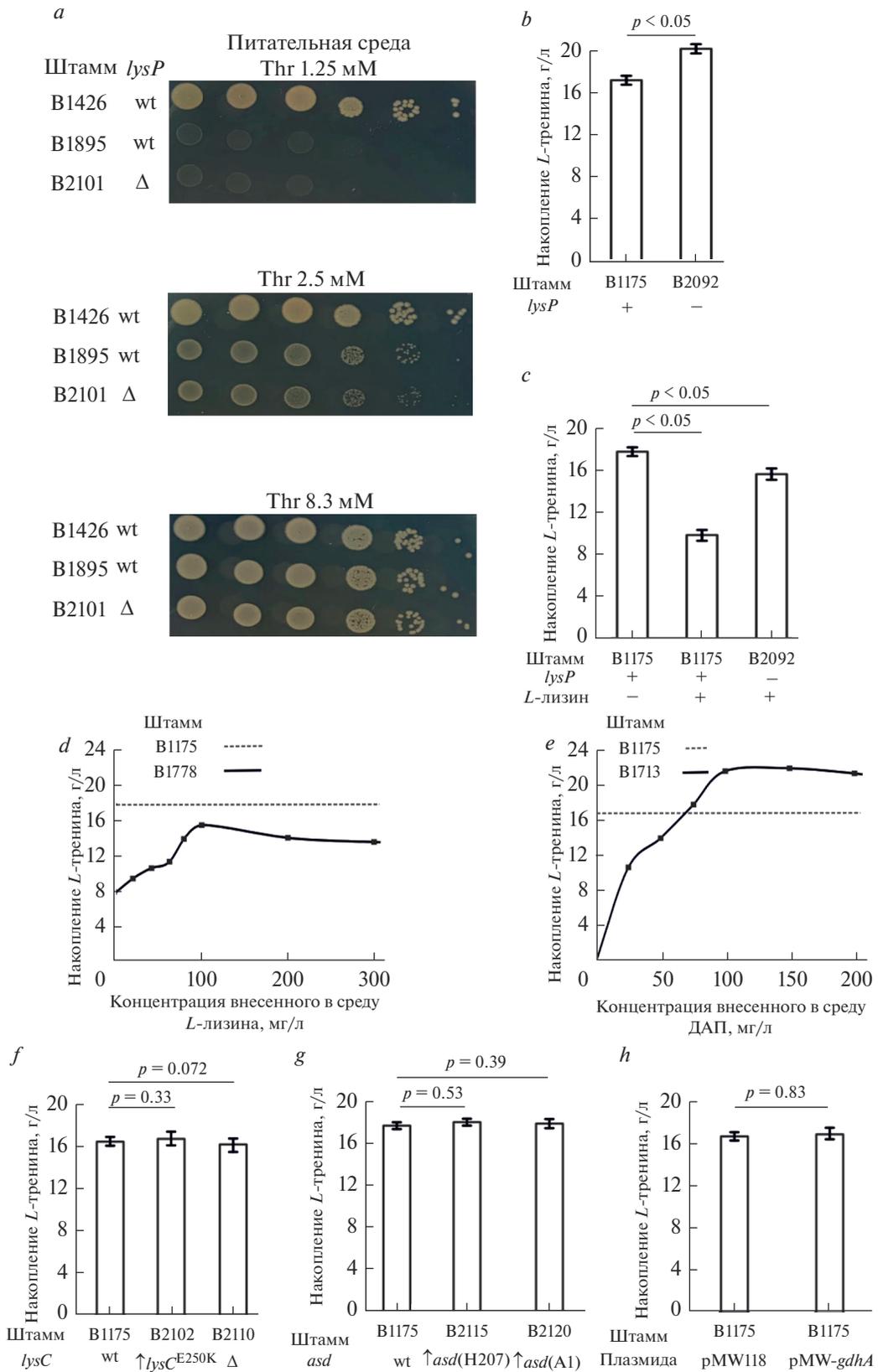
Создание продуцентов аминокислот и, в частности, L-треонина включает в себя комплексную модификацию как метаболизма целевого соединения, так и процессов его транспорта через цитоплазматическую мембрану [1]. Увеличение активности секреции (экспорта) и снижение активности обратного захвата (импорта) способствует снижению внутриклеточной концентрации продукта, что, в свою очередь, позволяет предотвратить его деградацию и избежать ингибирования реакций биосинтеза конечным продуктом [2–4]. Более того, при условии, что перенос целевого метаболита хотя бы в одном из направлений происходит с затратой энергии, его циклический транспорт может привести к непродуктивному расходованию АТФ, в результате чего эффективность биосинтеза продукта падает. Снижение активности поглощения аминокислоты из среды требует

как инактивации известных систем импорта [5–7], так и поиска прежде неописанных переносчиков, вклад которых может возрастать по достижении нефизиологичной концентрации продукта.

Так, в нашей последней работе мы идентифицировали и охарактеризовали новый импортер YifK [8], контролирующий поглощение треонина, а также показали активность по отношению к треонину у известных импортеров разветвленных аминокислот LIV-I (LivKHMGF) и LIV-II (VrnQ) [8–10]. Инактивация этих переносчиков способствовала многократному падению активности поглощения треонина полученным штаммом B1895. Тем не менее, этот мутант все еще был способен использовать экзогенный треонин для роста в условиях отсутствия его биосинтеза (рис. 1а). Этот результат свидетельствовал о возможном наличии все еще неидентифицированных систем импорта.

В связи с этим мы продолжили скрининг транспортеров, которые потенциально могли обладать

Список сокращений: ДАП – мезо-диаминопимелат, АЭЦ – S-(2-аминоэтил)-L-цистеин.



**Таблица 1.** Бактериальные штаммы, использованные в работе  
**Table 1.** Bacterial strains used in this work

Штамм	Генотип	Характеристика						Источник			
		биосинтез треонина	<i>ssrT</i>	<i>tdcC</i>	<i>yifK</i>	<i>brnQ</i>	<i>lysP</i>				
B1175	$\Delta tdh P_{H207}\text{-}thrA^{br}BC\text{-}TrrmB \Delta lacI supE \Delta poxB\text{-}ltaE$ $\Delta sstT \Delta tdcBCDE \Delta yifG\text{-}P_{trc}\text{-}pucA P_{LtetO-1}\text{-}rhtA$	+					wt	Лабораторная кол- лекция			
B1713	B1175 $\Delta dapA::cat$							Настоящая работа			
B1778	B1175 $\Delta lysA::cat\text{-}sacB$							Настоящая работа			
B2102	B1175 $cat\text{-}sacB\text{-}P_{L\text{-}tac}\text{-}lysC^{E250K}$							Настоящая работа			
B2110	B1175 $\Delta lysC::aadA1$							Настоящая работа			
B2115	B1175 $aadA1\text{-}P_{H207}\text{-}asd$							Настоящая работа			
B2120	B1175 $aadA1\text{-}P_{A1}\text{-}asd$							Настоящая работа			
B2092	B1175 $\Delta lysP::aadA1$							wt	wt	$\Delta$	Настоящая работа
B1426	F <sup>-</sup> $\lambda\text{-}ilvG^{\text{-}} rfb\text{-}50 rph\text{-}1 \Delta thrBC \Delta sstT \Delta tdcB\text{-}CDE::neo$							-			
B1895	B1426 $\Delta yifK \Delta brnQ \Delta livKHMGF::cat$	$\Delta$	$\Delta$	wt	[8]						
B2101	B1895 $\Delta lysP::aadA1$	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	Настоящая работа						

**Рис. 1.** Анализ влияния аллельного состояния *lysP* и содержания L-лизина в питательной среде на фенотип штаммов дефектных по синтезу и транспорту L-треонина, а также на способность штамма-производителя к накоплению треонина. Конструирование штаммов и плазмид, условия культивирования, исследования продуктивности, анализа потребления треонина, а также *in silico* оценки активности промоторов и RBS описаны в дополнительном материале к статье. Значения, показанные на рисунках *b, c, f, g, h*, представляют собой средние значения по меньшей мере трех биологических повторов. Для сравнения величин использовали двусторонний *t*-тест с неравными дисперсиями. *a* – Анализ способности дефектного по синтезу и транспорту треонина штамма B1426 и его изогенных *yifK liv brnQ* (B1895) и *yifK liv brnQ lysP* (B2101) производных расти на минимальной агаризованной среде с использованием экзогенного треонина. *b* – Уровень накопления треонина штаммом B1175 и его изогенным производным B2092, мутантным по *lysP*. *c* – Влияние лизина (1 г/л) в питательной среде на уровень накопления треонина штаммом B1175 и его изогенным производным B2092, мутантным по *lysP*. *d* – Зависимость уровня накопления треонина ауксотрофным по лизину штаммом B1778 (B1175  $\Delta lysA::cat\text{-}sacB$ ) от концентрации лизина в питательной среде. *e* – Зависимость уровня накопления треонина ауксотрофным по мезо-ДАП штаммом B1713 (B1175  $\Delta dapA::cat$ ) от концентрации мезо-ДАП в питательной среде. *f* – Влияние аллельного состояния и уровня экспрессии *lysC* на способность культуры к накоплению треонина. Штаммы B2102 и B2110 – изогенные производные B1175, несущие аллель *lysC<sup>E250K</sup>* под контролем сильного промотора  $P_{L\text{-}tac}$  и делецию *lysC*, соответственно. *g* – Влияние уровня экспрессии аспаратполуальдегиддегидрогеназы 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. *h* – 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.

**Fig. 1.** Assay of the allelic state of *lysP* and the content of L-lysine in the culture medium for the phenotype of strains defective in the synthesis and transport of L-threonine, as well as for the ability of the producer strain to accumulate threonine. Strains and plasmids construction, culture conditions, the assessment of the threonine biosynthesis and exogenous threonine utilization capabilities and *in silico* promoter and RBSs strength analysis are described in the Supplementary Materials and Methods. The values shown in figures *b, c, f, g, h* are the average of three biological replicates; error bars indicate SD. The depicted *p*-values were calculated using the two-tailed Student's *t*-test with unequal variances. "Thr," "DAP" stands for threonine and meso-diaminopimelate, respectively. *a* – Assay of the ability of strain B1426, defective in synthesis and transport of threonine, and its isogenic *yifK liv brnQ* (B1895) and *yifK liv brnQ lysP* (B2101) derivatives to grow on a minimal agar medium using exogenous threonine. *b* – Productivity of threonine by strain B1175 and its isogenic derivative B2092 with a mutation in the *lysP* gene. *c* – Impact of lysine (1 g/l) in a nutrient medium on the productivity of threonine by strain B1175 and its isogenic derivative B2092 with a mutation in the *lysP* gene. *d* – Dependence of the level of accumulation of threonine by the lysine auxotrophic strain B1778 (B1175  $\Delta lysA::cat\text{-}sacB$ ) on the concentration of lysine in the nutrient medium. *e* – Dependence of the level of threonine accumulation in the meso-DAP auxotrophic strain B1713 (B1175  $\Delta dapA::cat$ ) on the concentration of meso-DAP in the nutrient medium. *f* – Effects of the allelic state and the level of *lysC* expression on the culture's ability to accumulate threonine. Strains B2102 and B2110 are isogenic derivatives of B1175 carrying the *lysC<sup>E250K</sup>* allele under the control of a strong  $P_{L\text{-}tac}$  promoter and a *lysC* deletion, respectively. *g* – Influence of the expression level of aspartate-semialdehyde dehydrogenase on the ability of the culture to accumulate threonine. Strains B2115 and B2120 are isogenic derivatives of B1175 carrying *asd* gene under the control of strong  $P_{H207}$  and  $P_{A1}$  promoters, respectively. *h* – Influence of the expression level of glutamate dehydrogenase on the ability of the culture to accumulate threonine. In B1175 strain [pMW-*gdhA*], the wild allele of *gdhA* was amplified due to the presence of the pMW-*gdhA* plasmid. The control was B1175 carrying the empty pMW118 vector.

**Таблица 2.** Плазмиды, использованные в работе  
**Table 2.** Plasmids used in this work

Плазмиды	Характеристика	Источник
pMW118	Содержит ориджин репликации pSC101 и маркер <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> ); малокопийный вектор	Лабораторная коллекция
pMW- <i>gdhA</i>	Плаزمида для оверэкспрессии глутаматдегидрогеназы; содержит дикий аллель <i>gdhA</i>	Настоящая работа

некоторой активностью по отношению к треонину. В ходе этой работы мы обнаружили, что инактивация L-лизин-специфичного импортера LysP в штамме B1175 с образованием штамма B2092 приводит к некоторому росту накопления треонина культурой нового продуцента (рис. 1b) [11]. Однако, вопреки ожиданиям, анализ фенотипа мутанта B2101 (B1895  $\Delta$ *lysP*) показал, что LysP практически не участвует в импорте треонина (рис. 1a). Таким образом, целью дальнейшей работы был анализ механизма влияния аллельного состояния *lysP* на процесс биосинтеза треонина.

Отсутствие эффекта мутации *lysP* на способность импортировать экзогенный треонин означало, что увеличение продуктивности штамма B2092 связано, вероятнее всего, с изменением проницаемости клеточной мембраны для лизина. Действительно, внесение лизина до конечной концентрации 1 г/л в ферментационную среду снижало накопление треонина на 55% штаммом B1175 (рис. 1c), но этот негативный эффект был выражен в меньшей степени в случае штамма B2092 с инактивированным LysP (рис. 1c). На основании этих результатов мы предположили, что культивирование клеток в условиях частичного голодания по лизину должно приводить к увеличению продукции треонина. Для проверки этого предположения был сконструирован ауксотрофный по лизину штамм B1778, несущий мутацию в гене диаминопимелатдекарбоксилазы (*lysA*), катализирующей последнюю реакцию биосинтеза лизина [13, 14]. Исследование зависимости продуктивности полученного ауксотрофного мутанта от концентрации добавленного лизина в ферментационной среде не показало увеличения накопления треонина (рис. 1d). Это, вероятно, было связано с тем, что присутствие лизина даже в концентрации менее 1 г/л негативно сказывается на продукции. Альтернативный способ получения ауксотрофности по лизину (и, одновременно, его предшественнику – мезо-диаминопимелату) – инактивация гена *dapA*, продукт которого катализирует конденсацию пирувата и (S)-аспартата- $\beta$ -полуальдегида с образованием (4S)-4-гидрокси-2,3,4,5-тетрагидро-(2S)-дипиколината [15]. Исследование *dapA* мутанта показало, что в условиях недостатка ДАП продукция треонина возрастает на 33% (рис. 1e). 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 синтез треонина.

В прошлом, одним из этапов конструирования продуцентов треонина являлся отбор устойчивости к структурному аналогу лизина – S-(2-аминоэтил)-L-цистеину (АЭЦ) [16, 17]. Предполагалось, что такая мутация приводит к дерепрессии синтеза аспартаткиназы III (LysC), катализирующей АТФ-зависимое фосфорилирование L-аспартата с образованием L-аспартил-4-фосфата (рис. S1, дополнительные материалы), или ее десенсибилизации по отношению к лизину [18, 19]. Однако, недавно было показано, что в подавляющем большинстве случаев устойчивость к АЭЦ вызвана инактивацией LysP [20]. С одной стороны, это не исключает того, что механизмом, посредством которого лизин ингибирует биосинтез треонина является его взаимодействие с аспартаткиназой 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 [21]. С другой стороны, возникновение мутаций, которые придадут 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, мы сконструировали штамм B2102, в котором в ген *lysC* была введена десенсибилизирующая мутация E250K [22], нативная промоторная область заменена на сильный конститутивный промотор P<sub>L-tac</sub> [23], а дикий 5'-UTR был заменен на последовательность 5'-UTR гена 10 фага T7. По результатам *in silico* сравнения P<sub>L-tac</sub> демонстрирует ~25 раз большую активность, чем нативная промоторная область, а гетерологичный 5'-UTR превосходит дикий в 15 раз по величине эффективности инициации трансляции. Методика сравнения детально описана в разделе “Материалы и Методы” в дополнительном материале к статье. Исследование продуктивности показало, что введенные мутации не приводят к значительному повышению накопления треонина по сравнению с родитель-

ским штаммом (рис. 1f). Сходным образом, полная инактивация *LysC* не оказывала никакого влияния на продуктивность штамма B2110 (рис. 1f). Таким образом, в штамме B2110 способность к биосинтезу треонина не зависит от активности аспараткиназы III, а реакция фосфорилирования аспартата полностью контролируется нечувствительной к ретроингибированию треонином аспараткиназой I (*ThrA<sup>fb</sup>*) [24, 25]. Из этих результатов следует, что механизм влияния лизина на продукцию треонина не связан с *LysC*.

Из литературных данных известно, что в пути биосинтеза треонина участвуют еще два фермента, синтез которых контролируется внутриклеточным пулом лизина: аспаратполуальдегиддегидрогеназа (*Asd*) и глутаматдегидрогеназа (*GdhA*) (рис. S1, дополнительные материалы) [26]. *Asd* осуществляет промежуточную стадию в пути биосинтеза треонина, катализируя НАДФН-зависимое превращение L-аспартил-4-фосфата в L-аспаратполуальдегид [3, 27, 28]. Аспаратполуальдегиддегидрогеназа подвержена мультивалентному ингибированию лизином, треонином и L-метионином, причем влияние лизина является доминирующим [3]. *GdhA* катализирует НАДФН-зависимое аминирование  $\alpha$ -кетоглутарата с образованием L-глутамата [29–31]. Негативная регуляция глутаматдегидрогеназы опосредуется транскрипционным фактором *ArgP* для которого лизин является ко-эффектором [32]. Для исследования влияния активности аспаратполуальдегиддегидрогеназы мы сконструировали два штамма B2115 и B2120, в которых нативный промотор гена *asd* был заменен на H207 и A1, которые относятся к сильнейшим конститутивным  $\sigma$ 70-зависимым промоторам [33]. 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 относительно дикого аллеля в случае A1 и H207, соответственно (табл. S6, дополнительные материалы). Гетерологичный 5'-UTR демонстрировал в 2.5–11 раз большую эффективность инициации трансляции по сравнению с диким (табл. S7, дополнительные материалы). Зависимость продуктивности от уровня экспрессии глутаматдегидрогеназы исследовали с использованием штамма B1175, содержащего плазмиду *rMW-gdhA*, в составе которой находился дикий аллель *gdhA*. 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, оценка накопления треонина полученными штаммами показала, что ни замена нативного промотора *asd*, ни амплификация

*gdhA* не приводят к увеличению продуктивности (рис. 1g, 1h). Следовательно, 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. Согласно полученным результатам, падение активности ни одного из трех ферментов, а именно *LysC*, *Asd* и *GdhA* не является единственной и достаточной причиной снижения способности к накоплению треонина в присутствии экзогенного лизина. Это может свидетельствовать о существовании прежде не описанных или непрямых механизмов взаимодействия внутриклеточного пула лизина и ферментов, контролирующих путь биосинтеза треонина. Вместе с тем, нельзя исключить возможность плейотропного эффекта лизина, в результате которого к наблюдаемому фенотипу приводит падение активности сразу нескольких ферментов. Более детальный анализ этой проблемы требует дальнейших исследований. Тем не менее, результаты настоящей работы однозначно свидетельствуют о том, что вне зависимости от механизма действия, снижение внутриклеточной концентрации лизина либо путем изменения активности ферментов, катализирующих его биосинтез, либо в результате уменьшения проницаемости клеточной мембраны для экзогенного лизина является перспективным подходом для совершенствования штаммов-продуцентов треонина.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование влияния L-лизина на накопление L-треонина штаммами, мутантными по *lysP*, *lysA*, и изучение зависимости накопления L-треонина от мезо-диаминопимелата *dapA* мутантом выполнены в рамках Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”. Исследование влияния уровня экспрессии *asd*, *gdhA*, *lysC* на способность культуры к накоплению L-треонина выполнено при государственной финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1659.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала: <https://sciencejournals.ru/journal/biotekh/>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuzbashev T.V., Vybornaya T.V., Larina A.S., Gvilava I.T., Voyushina N.E., Mokrova S.S., Yuzbasheva E.Yu., Ma-

- nukhov I.V., Sineokiy S.P., Debabov V.G.* Directed modification of *Escherichia coli* metabolism for the design of threonine-producing strains. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, 49(9), 723–742. <https://doi.org/10.1134/S0003683813090056>
2. *Bearer C.F., Neet K.E.* Threonine inhibition of the aspartokinase-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli*. Threonine binding studies. *Biochemistry*, 1978, 17(17), 3512–3516. <https://doi.org/10.1021/bi00610a014>
  3. *Boy E., Pate J.C.* Multivalent repression of aspartic semialdehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1972, 12(1), 84–92. <https://doi.org/10.1128/jb.112.1.84-92.1972>
  4. *Théze J., Kleidman L., St Girons I.* Homoserine kinase from *Escherichia coli* K-12: properties, inhibition by L-threonine, and regulation of biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 1974, 118(2), 577–581. <https://doi.org/10.1128/jb.118.2.577-581.1974>
  5. *Kim Y.M., Ogawa W., Tamai E., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T.* Purification, reconstitution, and characterization of Na<sup>(+)</sup>/serine symporter, SstT, of *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 2002, 132(1), 71–76. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003201>
  6. *Sumantran V.N., Schweizer H.P., Datta P.* A novel membrane-associated threonine permease encoded by the *tdcC* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1990, 172(8), 4288–4294. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4288-4294.1990>
  7. *Hama H., Shimamoto T., Tsuda M., Tsuchiya T.* Characterization of a novel L-serine transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1988, 170(5), 2236–2239. <https://doi.org/10.1128/jb.170.5.2236-2239.1988>
  8. *Khozov A.A., Bubnov D.M., Plisov E.D., Vybornaya T.V., Yuzbashev T.V., Agrimi Gennaro, Messina Eugenia, Stepanova A.A., Kudina M.D., Alekseeva N.V., Netrusov A.A., Sineoky S.P.* A study on L-threonine and L-serine uptake in *Escherichia coli* K-12. *Front. Microbiol.*, 2023, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1151716>
  9. *Rahmanian M., Claus D.R., Oxender D.L.* Multiplicity of leucine transport systems in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1973, 116(3), 1258–1266. <https://doi.org/10.1128/jb.116.3.1258-1266.1973>
  10. *Radi M.S., Salcedo Sora J.E., Kim S.H., Sudarsan S., Sastry A.V., Kell D.B., Herrgård M.J., Feist A.M.* Membrane transporter identification and modulation via adaptive laboratory evolution. *Metab. Eng.*, 2022, 72, 376–390. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.05.004>
  11. *Steffes C., Elli J., Wu J., Rosen B.P.* The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. *J. Bacteriol.*, 1992, 174(10), 3242–3249. <https://doi.org/10.1128/jb.174.10.3242-3249.1992>
  12. *Хозов А.А., Бубнов Д.М., Выборная Т.В., Кудина М.Д., Синеокий С.П.* Штамм *Escherichia coli* с инактивированным геном *yjeM* – продуцент L-треонина. Патент RU 2775206C1, опубл. 28.06.2022. бюлл. № 19.
  13. *Dewey D.L., Work E.* Diaminopimelic acid decarboxylase. *Nature*, 1952, 169(4300), 533–534. <https://doi.org/10.1038/169533a0>
  14. *Davis B.D.* Biosynthetic interrelations of lysine, diaminopimelic acid, and threonine in mutants of *Escherichia coli*. *Nature*, 1952, 169(4300), 534–536. <https://doi.org/10.1038/169534a0>
  15. *Blickling S., Renner C., Laber B., Pohlentz H.D., Holak T.A., Huber R.* Reaction mechanism of *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase investigated by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 1997, 36(1)24–33. <https://doi.org/10.1021/bi962272d>
  16. *Jinho Lee, Oh Jong-Won, Hyunhwan Lee, Hyunghwan Hyun.* Method for producing L-threonine. Patent KR920008365B1, publ. 26.09.1992.
  17. *Komatsubara S., Kisumi M., Chibata I.* Participation of lysine-sensitive aspartokinase in threonine production by S-2-aminoethyl cysteine-resistant mutants of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 38(5), 777–782. <https://doi.org/10.1128/aem.38.5.777-782.1979>
  18. *Richaud F., Phuc N.H., Cassan M., Pate J.C.* Regulation of aspartokinase III synthesis in *Escherichia coli*: isolation of mutants containing *lysC-lac* fusions. *J. Bacteriol.*, 1980, 143(1), 513–515. <https://doi.org/10.1128/jb.143.1.513-515.1980>
  19. *Théze J., Margarita D., Cohen G.N., Borne F., Pate J.C.* Mapping of the structural genes of the three aspartokinases and of the two homoserine dehydrogenases of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1974, 117(1), 133–143. <https://doi.org/10.1128/jb.117.1.133-143.1974>
  20. *Bassalo M.C., Garst A.D., Choudhury A., Grau W.C., Oh E.J., Spindler E., Lipscomb T., Gill R.T.* Deep scanning lysine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.*, 2018, 14(11), 8371. <https://doi.org/10.15252/msb.20188371>
  21. *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. *Microb. Cell. Fact.*, 2015, 14, 86.
  22. *Kikuchi Y., Kojima H., Tanaka T.* Mutational analysis of the feedback sites of lysine-sensitive aspartokinase of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 173(1), 211–215.
  23. *Рыбак К.В., Сливинская Е.А., Саврасова Е.А., Ахвердян В.З., Клячко Е.В., Машко С.В., Дорошенко В.Г., Айрих Л.Г., Леонова Т.В., Гусятинер М.М., Ворошилова Е.Б., Козлов Ю.И., Хара Йо., Уеда Т.* Патент RU2304615C2, опубл. 20.08.2007. бюлл. № 23.
  24. *Starnes W.L., Munk P., Maul S.B., Cunningham G.N., Cox D.J., Shive W.* Threonine-sensitive aspartokinase-homoserine dehydrogenase complex, amino acid composition, molecular weight, and subunit composition of the complex. *Biochemistry*, 1972, 11(5), 677–687. <https://doi.org/10.1021/bi00755a003>
  25. *Clark R.B., Ogilvie J.W.* Aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I of *Escherichia coli* K12. Subunit molecular weight and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate binding. *Biochemistry*, 1972, 11(7), 1278–1282. <https://doi.org/10.1021/bi00757a025>
  26. *Dong X., Quinn P.J., Wang X.* Microbial metabolic engineering for L-threonine production. *Subcell Biochem.*, 2012, 64, 283–302. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5055-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5055-5_14)
  27. *Biellmann J.F., Eid P., Hirth C., Jörnvall H.* Aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and general properties. *Eur. J. Biochem.*, 1980, 104(1), 53–58. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04398.x>
  28. *Haziza C., Stragier P., Pate J.C.* Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*: absence of a typical attenuation signal. *EMBO J.*, 1982, 1(3), 379–384. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01178.x>
  29. *Veronese F.M., Boccu E., Conventi L.* Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: induction, purification and properties of the enzyme. *Biochim. Bio-*

- phys. Acta*, 1975, 377(2), 217–228.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90304-6](https://doi.org/10.1016/0005-2744(75)90304-6)
30. Sakamoto N., Kotre A.M., Savageau M.A. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.*, 1975, 124(2), 775–783.  
<https://doi.org/10.1128/jb.124.2.775-783.1975>
31. McPherson M.J., Wootton J.C. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *gdhA* gene. *Nucleic Acids Res.*, 1983, 11(15), 5257–5266.  
<https://doi.org/10.1093/nar/11.15.5257>
32. Marbaniang C.N., Gowrishankar J. Role of ArgP (IciA) in lysine-mediated repression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2011, 193(21), 5985–5996.  
<https://doi.org/10.1128/jb.05869-11>
33. Deuschle U., Kammerer W., Gentz R., Bujard H. Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. *EMBO J.*, 1986, 5(11), 2987–2994.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04596.x>

## Study of the Influence of L-Lysine and its Transporter LysP on the Properties of L-threonine Producer Strain

A. A. Khozov<sup>a, b, #</sup>, D. M. Bubnov<sup>a</sup>, T. V. Vybornaya<sup>a</sup>, M. D. Kudina<sup>a</sup>, A. A. Stepanova<sup>a, c</sup>, O. E. Melkina<sup>a</sup>, S. V. Molev<sup>a, b</sup>, S. S. Filippova<sup>a</sup>, A. I. Netrusov<sup>b</sup>, and S. P. Sineoky<sup>a</sup>

<sup>a</sup>NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

<sup>b</sup>Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>c</sup>Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 125047 Russia

<sup>#</sup>e-mail: khozov.m@student.msu.ru

**Abstract**—In this work, it was shown for the first time that inactivation of the L-lysine up-take transport system from the external environment leads to an increase in the level of L-threonine synthesis by the *Escherichia coli* strain that produces it, while the addition of lysine to the culture medium reduces the productivity of the unmodified strain, which indicates the influence of the intracellular pool of lysine on the efficiency of threonine biosynthesis. A study of the possible mechanisms of this influence showed that neither the previously known inhibition of aspartate kinase III (LysC) activity, nor the repression of the synthesis of aspartate semialdehyde dehydrogenase (Asd) and glutamate dehydrogenase (GdhA) individually are the reasons for the decrease in culture productivity. The results obtained may indicate both the presence of a previously unknown mechanism for the regulation of threonine metabolism by lysine, and the fact that several enzymes in the threonine biosynthesis pathway are simultaneously affected by this amino acid. At the same time, changing the permeability of the membrane to lysine, or reducing its intracellular concentration as a result of changing the efficiency of its biosynthesis, is a promising approach for improving threonine-producing strains.

**Keywords:** *Escherichia coli*, L-threonine, L-threonine producer, L-lysine, regulation of amino acids biosynthesis

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
 ПИ № ФС77-75946 от 13 июня 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,  
 информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 15.09.2023 г. Дата выхода в свет 20.09.2023 г. Формат 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub> Усл. печ. л. 14.76 Уч.-изд. л. 15.0  
 Тираж 117 экз. Зак. 6498 Цена договорная

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение  
 «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»»

Издатель: НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1  
 Исполнитель по контракту № 35-3-23-44-139 от 03.08.2023 г. ООО "СИС",  
 129164, г. Москва, Ракетный б-р, д. 16, пом. XXXI, пом. 23  
 Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),  
 390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151