

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ НА МЕТАБОЛИЗМ ШТАММОВ *Escherichia coli*

© 2024 г. Н. С. Плеханова^{1, 3, *}, В. А. Лившиц², М. С. Юркова¹, А. Н. Федоров¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”
“Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобные технологии”, Москва, 123182 Россия

³Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, 125047 Россия

*e-mail: plekhanovans@mail.ru

Поступила в редакцию 26.05.2024 г.

После доработки 22.06.2024 г.

Принята к публикации 11.07.2024 г.

Штаммы *Escherichia coli* широко используются в биотехнологии для производства соединений, представляющих большой интерес, таких, как L-аминокислоты и рекомбинантные белки. Цель данного исследования — определить влияние процессов ацетилирования остатков Nε-лизина белков на метаболизм часто используемых штаммов *E. coli* MG1655 и BL21(DE3), а также штаммов-продуцентов аминокислот L-треонина и L-пролина. Продемонстрировано, что профиль ацетилирования одного из ключевых ферментов гликолиза — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) — зависит от штамма, в котором данный белок был синтезирован. Удаление генов, участвующих в метаболизме ацетата и ацетилировании ε-аминогруппы остатков лизина белков влияет на метаболизм штаммов-продуцентов и на продуктивность целевых аминокислот. Подходы, связанные с модулированием ацетилирования белков, могут быть полезными в метаболической инженерии при создании более эффективных штаммов-продуцентов.

Ключевые слова: ацетилкофермент А (ацетил-КоА), ацетил-КоА-синтетаза, ацетилирование остатков Nε-лизина белков, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, ацетилтрансфераза PatZ, деацетилаза CobV, ацетаткиназа AckA

DOI: 10.56304/S0234275824030049

ВВЕДЕНИЕ

Ацетилирование представляет собой распространенную посттрансляционную модификацию, которая осуществляется путем переноса ацетильной группы ацетил-кофермента А (ацетил-КоА) к первичному амину в ε-положении остатка лизина белковой цепи. Схема этих процессов представлена на рис. 1.

Процесс ацетилирования может осуществляться как ферментативно с помощью ацетилтрансфераз, так и неферментативно без участия специальных белков. В последнем случае в качестве донора ацетильной группы может выступать молекула ацетилфосфата. В клетках бактерий ацетилирование регулирует многие клеточные процессы, например, олигомеризацию белков [1], мобильность клетки [2], резистентность к антибиотикам [3], а также ме-

таболизм путем изменения активности ферментов [4–6].

Escherichia coli — самая изученная и часто используемая биотехнологическая платформа для производства широкого спектра ценных соединений [7]. Основная задача при создании штаммов-продуцентов — перераспределение потоков углерода и энергии на путь биосинтеза целевых соединений. При приближении уровня продукции целевого соединения к теоретически максимальному выходу необходимо искать и внедрять новые подходы для увеличения конверсии источника углерода в целевой продукт. Таким образом, любые знания о регулировании потока углерода во время процесса культивирования будут полезны для повышения продуктивности штаммов и увеличения выхода целевого продукта.

Целью данного исследования являлось изучение влияния процессов ацетилирования на метаболизм штаммов *E. coli*. Нами были выбраны широко используемые штаммы MG1655 (*E. coli* K12)

Список сокращений: ОП — оптическая плотность, ЭДТА — Этилендиаминтетрауксусная кислота, ДТТ — Дитиотреитол, ГАФД — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

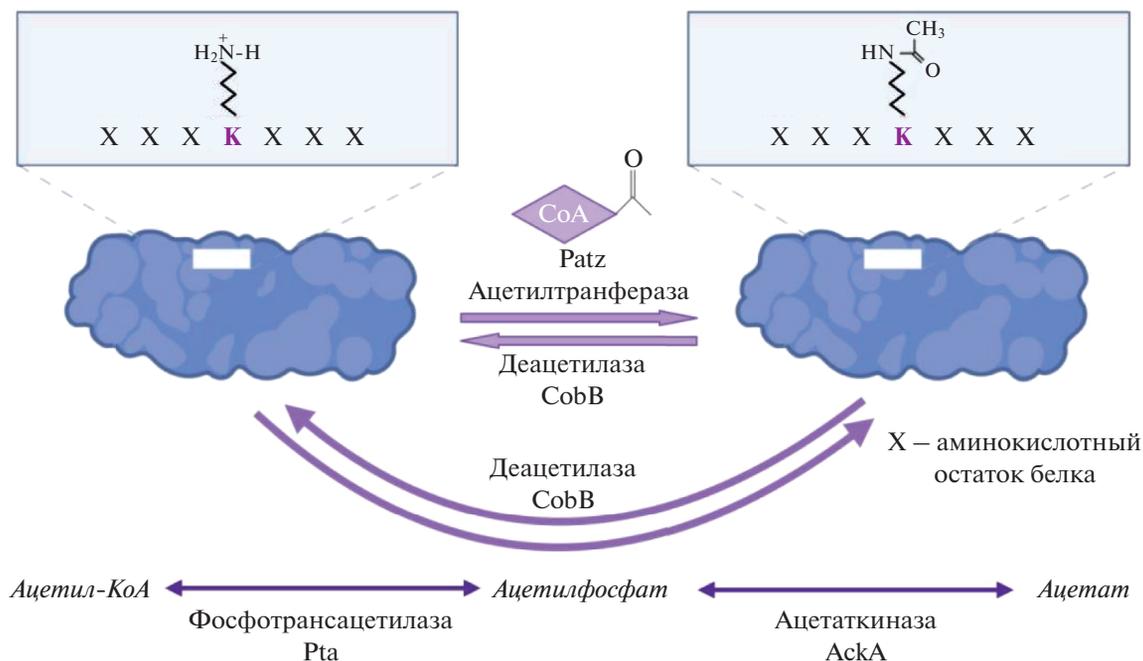


Рис. 1. Механизмы реализации процессов ацетилирования.
Fig. 1. Mechanisms for implementing acetylation processes.

и BL21(DE3) (*E. coli* B), которые показали свою эффективность при получении на их основе продуцентов L-аминокислот и различных рекомбинантных белков, а также штаммы-продуценты L-треонина и L-пролина на основе *E. coli* K12.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Использованные в работе штаммы представле-

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

Штамм	Генотип	Источник
MG1655	<i>ilvG rfb-50 rph-1</i>	CGSC 6300
BL21(DE3)	<i>ompT, hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3)</i>	Лабораторная коллекция
MG1655 Δ <i>ackA</i>	<i>ilvG rfb-50 rph-1, \Delta</i> <i>ackA::kan</i>	Данная работа
MG1655 Δ <i>cobB</i>	<i>ilvG rfb-50 rph-1, \Delta</i> <i>cobB::kan</i>	Данная работа
MG1655 Δ <i>patZ</i>	<i>F-, ilvG rfb-50 rph-1, \Delta</i> <i>patZ::kan</i>	Данная работа
PRO (продуцент L-пролина)	<i>702ilvA</i>	ВКПМ В-8012
PRO Δ <i>ackA</i>	<i>702ilvA, \Delta</i> <i>ackA::kan</i>	Данная работа
PRO Δ <i>cobB</i>	<i>702ilvA, \Delta</i> <i>cobB::kan</i>	Данная работа
PRO Δ <i>patZ</i>	<i>702ilvA, \Delta</i> <i>patZ::kan</i>	Данная работа
THR (продуцент L-треонина)	MG1655 Δ <i>tdh, rhtA23, pVIC40</i>	ВКПМ В-2307
THR Δ <i>ackA</i>	MG1655 Δ <i>tdh, rhtA23, pVIC40, \Delta</i> <i>ackA::kan</i>	Данная работа
THR Δ <i>cobB</i>	MG1655 Δ <i>tdh, rhtA23, pVIC40, \Delta</i> <i>cobB::kan</i>	Данная работа
THR Δ <i>patZ</i>	MG1655 Δ <i>tdh, rhtA23, pVIC40, \Delta</i> <i>patZ::kan</i>	Данная работа

Таблица 2. Праймеры, используемые для делеции генов и проверки полученных мутаций
Table 2. Oligonucleotides used for genes deletion and verification of resulting mutations.

ID	Олигонуклеотид	Последовательность (5'→3')
P1	del- <i>patZ</i> -R	CGTTTAAAATCATTTCGGTCACTTCTGCGGGAGACCGGTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
P2	del- <i>patZ</i> -L	GATTAAGTGGTCAACATTTCCAGTACCTTACTCATGATTCCTGTCAAACATGAGAATTAATTCGG
P3	<i>patZ</i> -up	TCACAGCAGAACAGTTAGAA
P4	<i>patZ</i> -down	TGGGCAAGGTGTTGTTGA
P5	del- <i>cobB</i> -R	CCTTCCTACATCTAACCGATTAACAACAGAGGTTGCTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGT
P6	del- <i>cobB</i> -L	GGCCTGATAAGCGTAGTGCATCAGGCAATGCTTCCCGCTTCTGTCAAACATGAGAATTAATTCGGG
P7	<i>cobB</i> -up	TCTTACCTGTAGCTCGTGTTC
P8	<i>cobB</i> -down	TCGATAATAGCTTTGCGA
P9	del- <i>ackA</i> -R	CTGACGTTTTTTTAGCCACGTATCAATTATAGGTACTTCCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAG
P10	del- <i>ackA</i> -L	CGCCAGCTGAGCTGGCGGTGTGAAATCAGGCAGTCAGGCGGCTCTGTCAAACATGAGAATTAATTCGG
P11	<i>ackA</i> -up	GCATGATGTTAATCATAAATGTCGGTG
P12	<i>ackA</i> -down	GGACACGGTTTATCCTCTTTCGTTAC
P13	Cm-EcoRI	TTTTTTGAATTCTGATCGGCACGTAAGAGGTTCC
P14	Cm-PstI	TTTTTCTGCAGTTACGCCCGCCCTGCCAC
P15	T5-BglII	TTTTTAGATCTTCATAAAAAATTTATTTGCT
P16	T5-XbaI	TTTTTTTCTAGATAATATAAATTGTTATCCGCTCACAA
P17	TrrnB-BamHI	TTTTTTGGATCCATTTGTCCTACTCAGGAGAG
P18	TrrnB-HindIII	TTTTTTAAGCTTCAAATAAACGAAAGGCTCAGTC
P19	<i>patZ</i> -NcoI	TTTTTTCCATGGATGCTGTGCGCTCGGGGT
P20	<i>patZ</i> -BamHI	TTTTTTGGATCCTCAGGCAATGCTTCCCGCT

ны в табл. 1. Трансформацию штаммов *E. coli*, получение трансдуцирующих фагов P1vir и трансдукцию проводили согласно общепринятым экспериментальным протоколам [8, 9].

Методы работы с ДНК.

Выделение ДНК проводили с помощью наборов Plasmid Miniprep и Cleanup Standard, согласно инструкциям производителя (“Евроген”, Россия). Электрофорез ДНК в агарозном геле осуществляли по стандартным методикам. Стандартный метод ПЦР воспроизводили с помощью амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Biorad, США). Химический синтез олигонуклеотидных праймеров для ПЦР осуществляла фирма “Синтол” (Россия). Нуклеотидный состав праймеров приведен в табл. 2.

Измерение активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы

Культуру клеток выращивали в минимальной среде M9 в течение 4–8 ч при 37°C (до ОП₆₀₀ 2.0), центрифугировали в течение 25 мин при 5000 g (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Германия), дважды промывали физиологическим раствором и разрушали с помощью звукового дезинтегратора Sonicator Q55 (США) в буфере следующего состава: 100 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 20 мМ KCl, 0.5 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ.

Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) измеряли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра Thermo Fisher Scientific Genesys 150 (Германия) в клеточных экстрактах по методике, описанной ранее [10], с добавлением НАД⁺ (Serva) (2 мМ). Очистку ГАФД для определения кинетических параметров проводили

Таблица 3. Плазмиды, использованные в работе
Table 3. Plasmids used in this work

Плаزمида	Устойчивость к антибиотикам	Характеристики	Ссылка
pKK-gapA ^{WT}	Amp	ori pBR322, PlacZ, T _{trnB}	[32]
pET15b	Amp	ori pBR322, P _{T7} , T _{T7}	Лабораторная коллекция
pNSP1	Cm	ori pBR322, P _{T5} , T _{trnB}	Данная работа
pNSP1-patZ	Cm	ori pBR322, P _{T5} -patZ-T _{trnB}	Данная работа
pKD20	Amp	ori R101, repA101(ts), P-gam-bet-exo	Лабораторная коллекция
pVIC40	Str	ori pRSF1010, thrA*BC	ВКПМ В-2307

ли фракционным осаждением (NH₄)₂SO₄, как описано ранее [11]. Для дальнейшей работы использовали фракцию белка, осажденную при 75–85% насыщения сульфатом аммония (фракция III).

Электрофорез тотального белка в 15%-ном полиакриламидном геле выполнен в соответствии с методикой Лэмли [12]. Определение количества белка в экстрактах проводили по методу Брэдфорда с использованием реактива Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Германия).

Идентификация ацетилированных аминокислотных остатков лизина в белках

Протеолитический гидролиз белков из геля проводили трипсином Gold (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя. ВЭЖХ-МС анализ выполняли на квадрупольно-времяпролетном масс-спектрометре высокого разрешения Impact II (Bruker Daltonik, Германия), оснащенным источником ионизации электрораспылением Apollo II (Bruker Daltonik) и УВЭЖХ (Ультра высокоэффективная жидкостная хроматография) Elute (Bruker Daltonik,) на обращенно-фазовой колонке Waters Acquity HSS T3 1.8 мкм 2.1 × 100 мм (Waters, Ирландия) в следующих условиях: объем пробы 10 мкл, скорость потока 0.25 мл/мин, градиентное элюирование от 5 до 60% Б за 30 мин, затем до 95% Б за 3 мин (раствор А: 0.1%-ная муравьиная кислота в воде; раствор Б: 0.1%-ная муравьиная кислота в ацетонитриле), температура колонки 30°C, постколоночное разделение потока 1 : 20, ионизация электрораспылением в положительном режиме ионов, потенциал на капилляре 4.5 кВ, распыляющий газ – азот 1.0 бар, осушающий газ – азот 5.0 л/мин 200°C, диапазон сканирования *m/z* 100–2200, частота сканирования для полного спектра 2 Гц, автоматический режим регистрации спектров второго порядка (активация соударением) с динамической частотой регистрации 2–6 Гц, длина цикла 2 с, предпочтительный газ – азот, динамическая энергия соударений (20 эВ на *m/z* 300, 65 эВ на *m/z* 1300), автоматическая внутренняя калибровка по раствору трифторацетата натрия.

Обработка спектров и идентификация белков осуществлялись с использованием программного пакета BioPharma Compass 3.1.1 (Bruker Daltonik).

Визуализация распределения ацетилированных аминокислотных остатков

В качестве основы для визуализации из базы данных 3Д-структур (PDB) была взята трехмерная структура ГАФД 1S7C. Выравнивание, уточнение и визуализация трехмерных структур осуществлялись с помощью программы PyMOL v.2.5.0.

Конструирование плазмиды pNSP1

Для создания стабильной, многокопийной плазмиды, способной экспрессироваться в любом штамме *E. coli*, вектор pET15b (табл. 3) был реконструирован.

Для постоянного поддержания плазмиды в клетках в течение длительного культивирования маркер устойчивости к ампициллину был заменен на маркер устойчивости к хлорамфениколу с помощью праймеров P13 и P14. Промотор фага T7, способный узнаваться только РНК-полимеразой того же фага, был заменен на промотор фага T5, который узнается РНК-полимеразами *E. coli*, с помощью праймеров P15 и P16. Промотор T5 остался под репрессией *lacI*. С той же целью терминатор T7 заменили на терминатор T_{trnB} с помощью праймеров P17 и P18. Полученный вектор был обозначен как pNSP1.

Клонирование гена patZ

В векторе pNSP1 был клонирован ген, кодирующий ацетилтрансферазу *patZ* с помощью праймеров P19 и P20. В качестве матрицы для амплификации была использована хромосома штамма *E. coli* MG1655. Последовательность всех амплифицированных участков ДНК была подтверждена с помощью секвенирования (“Синтол”), а уровень синтеза белка был проверен в штамме *E. coli* MG1655.

Инактивация генов *cobB*, *patZ* и *ackA*

Инактивацию генов *patZ*, *cobB* и *ackA* в хромосоме штамма *E. coli* MG1655 проводили с использованием Red системы фага λ по методу, описанному в работе [9] с использованием вспомогательной плазмиды pKD20, несущей гены, кодирующие белки, необходимые для интеграции и эксцизии вставок ДНК. Конструирование ДНК-фрагментов маркера устойчивости к канамицину, фланкированного комплементарными участками up- и down-stream генов, осуществляли с помощью праймеров P1-P2 в случае гена *patZ*, P5-P6 в случае гена *cobB* и P9-P10 в случае гена *ackA*; наличие делеций проверяли с помощью ПЦР, с использованием пар олигонуклеотидов P3-P4 в случае гена *patZ*, P7-P8 в случае гена *cobB*, P11-P12 в случае гена *ackA*.

Полученные делеции были перенесены в штаммы-продуценты PRO и THR (описание штаммов приведено в табл. 1) с помощью трансдукции фагом P1. После чего в штамме-продуценте L-треонина был удален маркер устойчивости к канамицину. Процесс контролировали с помощью ПЦР с описанными ранее парами олигонуклеотидов. Затем штамм THR трансформировали плазмидой pVIC40 (см. табл. 3).

Получение кривых роста штаммов *E. coli* и их анализ

Ночные культуры штаммов, выращенные в пробирках на минимальной среде, разводили свежей минимальной средой M9 до ОП₆₀₀ ~ 0.1–0.2 и растили при температуре 37°C со скоростью перемешивания 200 об./мин. Оптическую плотность в течение указанного времени измеряли с помощью спектрофотометра Thermo Fisher Scientific Genesys 150.

Проведение ферментации

Первоначально штаммы-продуценты выращивали в течение 18–24 ч при температуре 37°C на чашках с L-агаром, содержащим антибиотик стрептомицин. Для получения посевной культуры штаммы инкубировали в пробирках размером 20 × 200 мм, содержащих 2 мл LB с добавлением указанного выше антибиотика, на ротационном шейкере при 250 об./мин и 37°C в течение 18 ч. Далее в среду вносили 0.2 мл ночной культуры (10%) и проводили ферментацию в течение 44 ч для треонина и 43 ч для пролина. Количество образовавшегося треонина в среде определяли методом капиллярного электрофореза Agilent CE 7100 (США). Оптическую плотность культуры в конце ферментационного процесса измеряли с помощью спектрофотометра Thermo Fisher Scientific Genesys 150.

Ферментацию штаммов-продуцентов проводили при 32°C и перемешивании 240 об./мин. Состав ферментационной среды для продуцента L-треонина (г/л): глюкоза – 80.0; (NH₄)₂SO₄ – 22.0; NaCl – 0.8; KH₂PO₄ – 2.0; MgSO₄·7H₂O – 0.8; FeSO₄·7H₂O – 0.02; MnSO₄·5H₂O – 0.02; Тиамин–HCl – 0.0002; Дрожжевой экстракт – 1.0; CaCO₃ – 30.0; pH 7.0, для продуцента L-пролина (г/л): глюкоза – 60, (NH₄)₂SO₄ – 25, KH₂PO₄ – 2, MgSO₄·7H₂O – 1.0, L-изолейцин – 0.05; Тиамин–HCl – 0.0001, CaCO₃ – 25, pH 7.2.

Продуктивность штаммов определяли как отношение количества аминокислоты (г/л) к оптической плотности КЖ (ОП₆₀₀).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в штаммах MG1655 и BL21(DE3)

Для изучения влияния процессов ацетилирования на свойства штаммов *E. coli* в качестве объекта была выбрана глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД). Данный фермент играет одну из ключевых ролей в пути Эмбдена-Мейерхоффа-Парнаса и глюконеогенезе, а также вовлечен во многие важные клеточные процессы.

ГАФД катализирует окисление D-глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-бисфосфоглицерата с восстановлением НАД⁺ до НАДН. Результаты измерений активности ГАФД, кодируемой хромосомной копией гена *gapA* в штаммах MG1655 и BL21(DE3), представлены на рис. 2.

Как следует из рис. 2a, показатели удельной активности ГАФД у этих штаммов значительно различаются. При полной идентичности аминокислотных последовательностей белков в обоих штаммах (рис. 2b), показатель удельной активности белкового препарата ГАФД в штамме MG1655 линии K-12 на 35% превышает удельную активность того же белка в штамме линии B.

Согласно результатам многочисленных исследований, ацетилирование остатков лизина преимущественно нацелено на ферменты, участвующие в центральном метаболизме [13, 14]. Некоторые из этих аминокислотных остатков каталитически активны, поэтому их ацетилирование может изменять активность ряда ферментов и таким образом регулировать метаболизм бактерий, что подтверждает ряд исследований *in vitro* [13–15].

Ранее было показано, что *in vitro* ферментативное ацетилирование ГАФД двукратно увеличивает ее удельную активность [15]. В то же время неферментативное ацетилирование посредством ацетилфосфата приводит к полной утрате ферментативной активности, восстановление которой возможно только путем синтеза новых молекул белка [16].

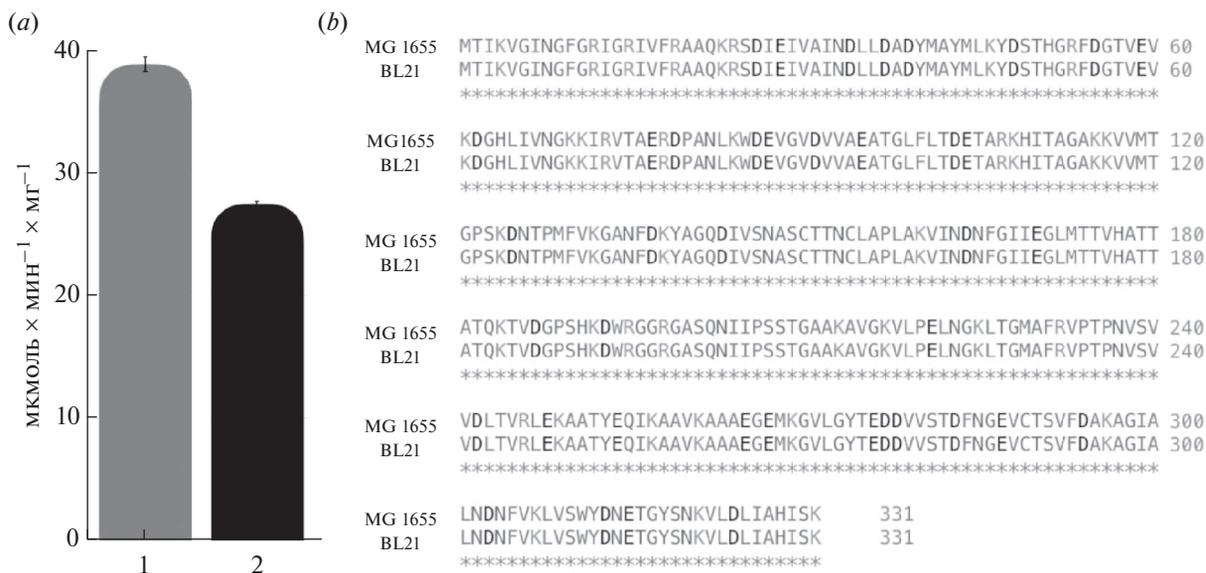


Рис. 2. *a* – НАД⁺-зависимая активность ГАФД исходных штаммов MG1655 (1) и BL21(DE3) (2); представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах; *b* – сравнительное выравнивание аминокислотных последовательностей ферментов ГАФД штаммов MG1655 и BL21.

Fig. 2. *a* – NAD⁺-dependent GAPDH activity of the original strains MG1655 (1) and BL21(DE3) (2); the average values obtained from three independent experiments are presented; *b* – comparative alignment of amino acid sequences of GAPDH enzymes from strains MG1655 and BL21.

Для того, чтобы оценить влияние ацетилирования на активность ГАФД *in vivo* и сравнить с полученными ранее результатами *in vitro*, была сконструирована плаزمида pNSP1-*patZ*, несущая ген *patZ*, основной и наиболее охарактеризованной ацетилтрансферазы *E. coli*. Эта плаزمида совместима с плазмидой рКК-*gapA*^{WT}, и обе плазмиды с одинаковым числом копий поддерживаются в штаммах *E. coli* К и В.

Как показано на рис. 3, удельная активность ГАФД в штамме MG1655 изменяется при введении плазмиды, несущей ген *patZ*.

Показатели активности фермента увеличивались вдвое при совместной экспрессии двух плазмид, несущих гены *gapA* и *patZ*, что не наблюдалось в штамме BL21(DE3), где уровень удельной активности ГАФД мало изменялся в присутствии гена ацетилтрансферазы. Для того, чтобы прояснить причины столь существенного различия в активности фермента в разных штаммах, с помощью масс-спектрометрического анализа были идентифицированы ацетилированные аминокислотные остат-

ки лизина в белках ГАФД, синтезированных в штаммах MG1655 и BL21(DE3). Результаты анализа представлены в табл. 4.

Как следует из данных, приведенных в табл. 4, аминокислотные остатки в белках ацетилированы по-разному, что демонстрирует корреляцию этих процессов с особенностями метаболизма штаммов. При этом реакция, вероятнее всего, проходила по обоим механизмам, ферментативному и неферментативному. Можно предположить, что ферментативному ацетилированию подвергаются одни и те же аминокислотные остатки лизина в анализируемых штаммах. Различие в модификации лизиновых остатков ГАФД в этих штаммах, вероятно, связано с неферментативным механизмом и может быть объяснено особенностями метаболических процессов.

Ацетилирование аминокислотных остатков лизина, локализованных на поверхности мономеров белка, может как увеличивать, так и снижать образование активных форм фермента. На рис. 4 и 5 приведены 3Д-модели фермента ГАФД с распре-

Таблица 4. Ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД, полученные в разных штаммах
Table 4. Acetylated amino acid residues of lysine of the GAPDH protein obtained in different strains

Штамм	Ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД																		
		4	70	71	108	115	115	116	124	132	138	213	217	225	249	257	261	321	-C
<i>in vitro</i>																			
MG1655	N-					115	116	124	132	138	213				249	257			
BL(21)DE3)		70	71			115	116	124			192	213	217	225	257	261	321		

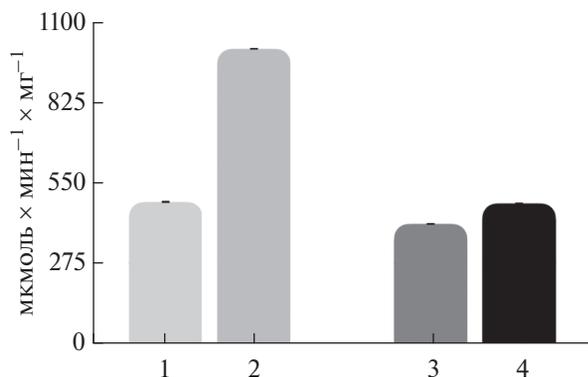


Рис. 3. Влияние плазмид $pKK-gapA^{WT}$ и $pNSP1-patZ$ на активность NAD^+ -зависимой ГАФД штаммов MG1655 и BL21(DE3). (1) – штамм MG1655/ $pKK-gapA^{WT}$; (2) – штамм MG1655/ $pKK-gapA^{WT}$ + $pNSP1-patZ$; (3) – штамм BL21(DE3)/ $pKK-gapA^{WT}$; (4) – штамм BL21(DE3)/ $pKK-gapA^{WT}$ + $pNSP1-patZ$. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Fig. 3. Effect of plasmids $pKK-gapA^{WT}$ and $pNSP1-patZ$ on the activity of NAD^+ -dependent GAPDH of strains MG1655 and BL21(DE3). (1) – strain MG1655/ $pKK-gapA^{WT}$; (2) – strain MG1655/ $pKK-gapA^{WT}$ + $pNSP1-patZ$; (3) – strain BL21(DE3)/ $pKK-gapA^{WT}$; (4) – strain BL21(DE3)/ $pKK-gapA^{WT}$ + $pNSP1-patZ$. The average values obtained from three independent experiments are presented.

деленными несовпадающими уникальными ацетилированными аминокислотными остатками лизина, полученного в штаммах *E. coli*, MG1655 и BL21(DE3), соответственно.

В предыдущей работе [15] нами были идентифицированы ферментативно ацетилированные *in vitro* (табл. 4 верхняя строка) аминокислотные остатки лизина ГАФД, полученного в штамме MG1655, и было показано, что эта модификация увеличивает активность фермента в 2 раза, как и в случае ферментативного ацетилирования *in vivo* в этом штамме. В данной работе для ферментов ГАФД из штаммов MG1655 и BL21(DE3) показано, что некоторые из ранее идентифицированных аминокислотных остатков лизина также ацетилированы, а именно, 115 и 124 остатки для обоих штаммов и 70, 71 остатки для штамма BL21. С другой стороны, в С-концевой части белков также присутствуют ацетилированные аминокислотные остатки лизина. Визуализация распределения ацетилированных остатков лизина показала их локализацию на поверхности белковой глобулы, что позволяет предположить неферментативный механизм их модификации посредством переноса ацетильной группы с молекулы ацетилфосфата. Фермент из штамма BL21(DE3) обладает пониженной активностью. На рис. 5 выделен ацетилированный аминокислотный остаток лизина 192. Он находится в непосредственной близости к сайту связывания кофактора, и это может объяснять снижение энзиматической ак-

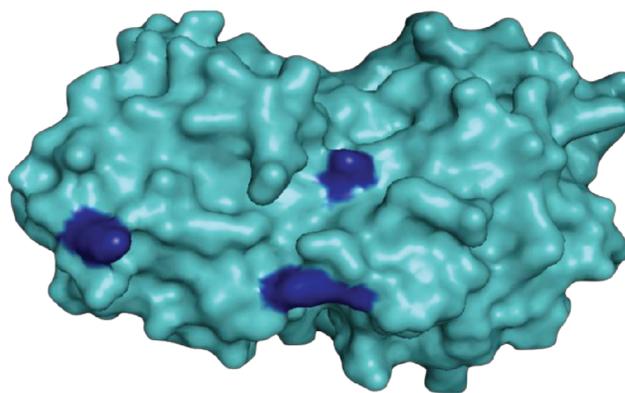


Рис. 4. Распределение несовпадающих (уникальных для штамма) ацетилированных аминокислотных остатков лизина по белковой поверхности ГАФД (PDB 1S7C), полученный в штамме MG1655.

Fig. 4. Distribution of mismatched (strain-unique) acetylated lysine amino acid residues along the protein surface of GAPDH (PDB 1S7C), obtained in strain MG1655.

тивности. Следовательно, неферментативно ацетилированные аминокислотные остатки лизина могут быть причиной снижения активности фермента. Различия в процессах ацетилирования могут быть связаны с различными внутриклеточными концентрациями ацетилфосфата и ацетата в двух штаммах, что может стать серьезной проблемой при промышленном культивировании штаммов *E. coli*, в том числе продуцентов аминокислот. Образование значительного количества ацетата на средах с глюкозой снижает конверсию моносахарида в целевой продукт и угнетает рост клеток. Данный факт необходимо принимать во внимание при выборе штамма в качестве платформы при создании штаммов-продуцентов аминокислот.

Рост штаммов E. coli с нативными и делетированными генами cobB, patZ и ackA

Прецизионное делетирование генов в хромосоме (gene knockout) представляет собой эффективный и надежный метод изучения метаболизма. Этот метод был в первую очередь разработан для штаммов *E. coli*, и он широко используется для данного микроорганизма [18].

Изменения метаболизма в результате целенаправленного делетирования определенных генов влияют на параметры роста штамма, что является наиболее легко фиксируемым индикатором их эффекта. Поэтому для определения влияния делеций генов на метаболизм были, в первую очередь, получены и проанализированы кривые роста штаммов дикого типа и штаммов с инактивированными генами *cobB*, *patZ* и *ackA* (рис. 6).

Выбранные гены кодируют ферменты, которые вносят непосредственный вклад в процессы ацетилирования: ген *patZ* кодирует фермент ацети-

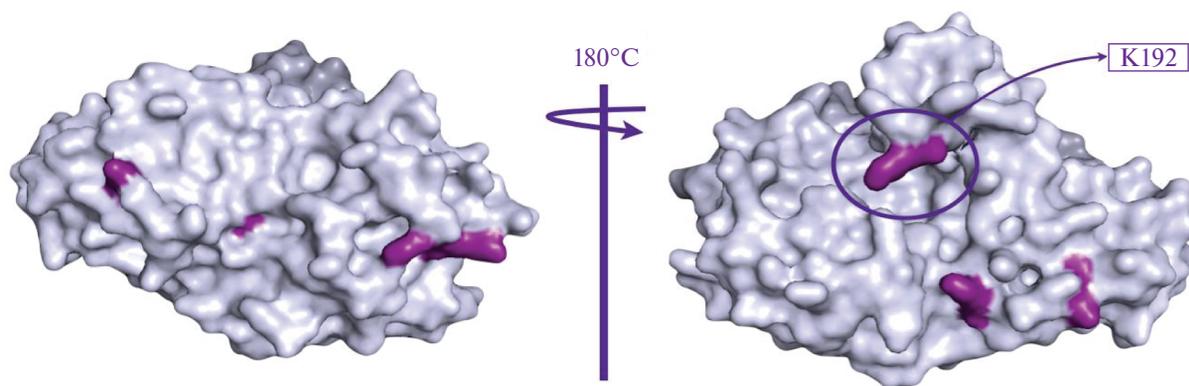


Рис. 5. Распределение несовпадающих ацетилированных аминокислотных остатков лизина по белковой поверхности ГАФД (PDB 1S7C), полученный в штамме BL21(DE3).

Fig. 5. Distribution of mismatched acetylated lysine amino acid residues along the protein surface of GAPDH (PDB 1S7C), obtained in strain BL21(DE3).

лтрансферазу, переносящий ацетильную группу на аминокислотные остатки лизина в белке; ген *ackA* кодирует фермент ацетат киназу (ацетилфосфат-синтазу) – основной фермент биосинтеза ацетилфосфата из ацетата, который, в свою очередь, способен ацетилировать аминокислотные остатки лизина в белках по неферментативному механизму; *cobB* кодирует фермент деацетилазу, удаляющий ацетильную группу независимо от механизма, по которому аминокислотный остаток лизина был ацетилирован. Как следует из рис. 6, все делеционные варианты штамма MG1655 росли на среде M9 с увеличенной по времени лаг-фазой, характеризовались пониженной скоростью роста по сравнению со штаммом дикого типа. При этом ни один из делеционных производных MG1655 не достигал максимальной оптической плотности штамма дикого типа.

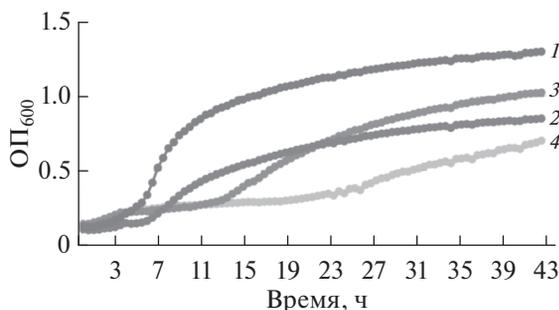


Рис. 6. Рост штаммов *E. coli* MG1655 исходный (1), *MG1655* $\Delta cobB$, без деацетилазы (2), *MG1655* $\Delta patZ$, без ацетилтрансферазы (3) и *MG1655* $\Delta ackA$, без ацетилфосфатсинтазы (4) на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода.

Fig. 6. Growth of *E. coli* strains MG1655 original (1), *MG1655* $\Delta cobB$, without deacetylase (2), *MG1655* $\Delta patZ$, without acetyltransferase (3) and *MG1655* $\Delta ackA$, without acetylphosphate synthase (4) on M9 minimal medium with glucose as the only source carbon.

Аналогичные делеции были введены в штаммы-продуценты PRO и THR. Изменения, наблюдаемые в кривых роста вновь полученных делеционных производных этих штаммов, были аналогичны наблюдаемому для штаммов, производных MG1655 (рис. 7a и 8a).

Таким образом, как и ожидалось, нарушение процессов деацетилирования, ацетилирования и образования ацетил-фосфата негативно влияли на метаболизм клетки.

Эффект делеций генов cobB, patZ и ackA на параметры продуцентов PRO и THR при ферментации в пробирках

Основным параметром при оценке эффективности продуцентов аминокислот является накопление целевого продукта в культуральной жидкости. Этот показатель является определяющим при оценке влияния вносимых в штамм-продуцент генетических изменений.

В нашем исследовании были использованы штаммы продуценты L-треонина и L-пролина. Несмотря на то, что эти аминокислоты относятся к семействам аспартата и глутамата, обе они образуются из интермедиатов цикла трикарбоновых кислот, соответственно, щавелевоуксусной и α -кетоглутаровой кислот. Поэтому для биосинтеза этих аминокислот из глюкозы необходимы ферменты пути Эмбдена-Мейерхоффа-Парнаса, в том числе и ГАФД. Как было уже показано выше, инактивация генов *cobB*, *patZ* и *ackA* в продуцентах PRO и THR приводила к изменению скорости роста в минимальной среде M9. Для оценки накопления целевых продуктов использовали ферментационную среду с глюкозой в качестве единственного источника углерода. Сахар, первоначально добавленный в среду, за время культивирования в процессе был полностью утилизирован клетками во всех об-

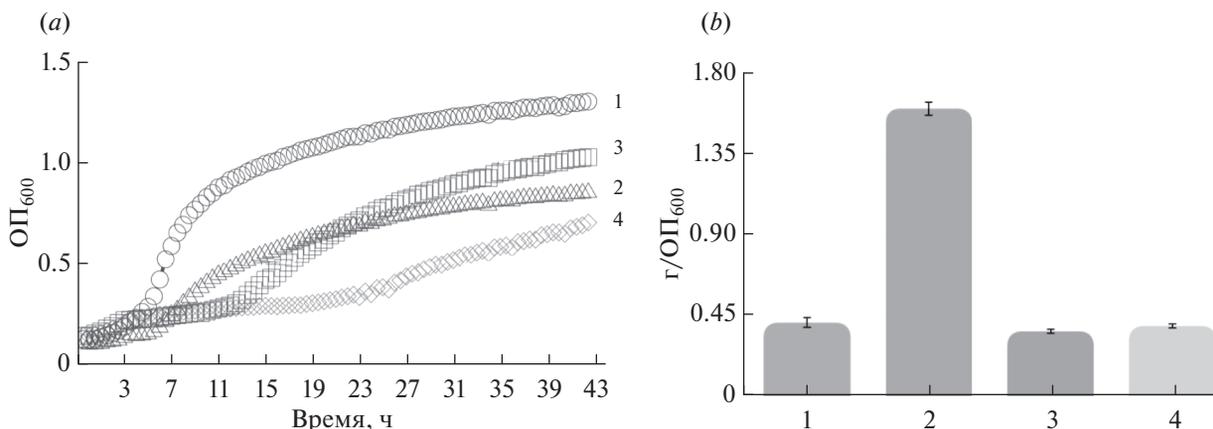


Рис. 7. Рост и продуктивность штаммов-продуцентов L-пролина на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода. *a* – Рост штаммов: PRO, исходный (1), PRO Δ*cobB*, без деацетилазы (2), PRO Δ*patZ*, без ацетилтрансферазы (3) и PRO Δ*ackA*, без ацетилфосфатсинтазы (4). *b* – Продуктивность штаммов (обозначения те же). Стандартные отклонения от средних значений указаны в виде планок погрешностей.

Fig. 7. Growth and productivity of L-proline producing strains on M9 minimal medium with glucose as the only carbon source. *a* – Growth of strains: PRO, original (1), PRO Δ*cobB*, without deacetylase (2), PRO Δ*patZ*, without acetyltransferase (3) and PRO Δ*ackA*, without acetylphosphate synthase (4). *b* – Productivity of strains (same designations). Standard deviations from the means are shown as error bars.

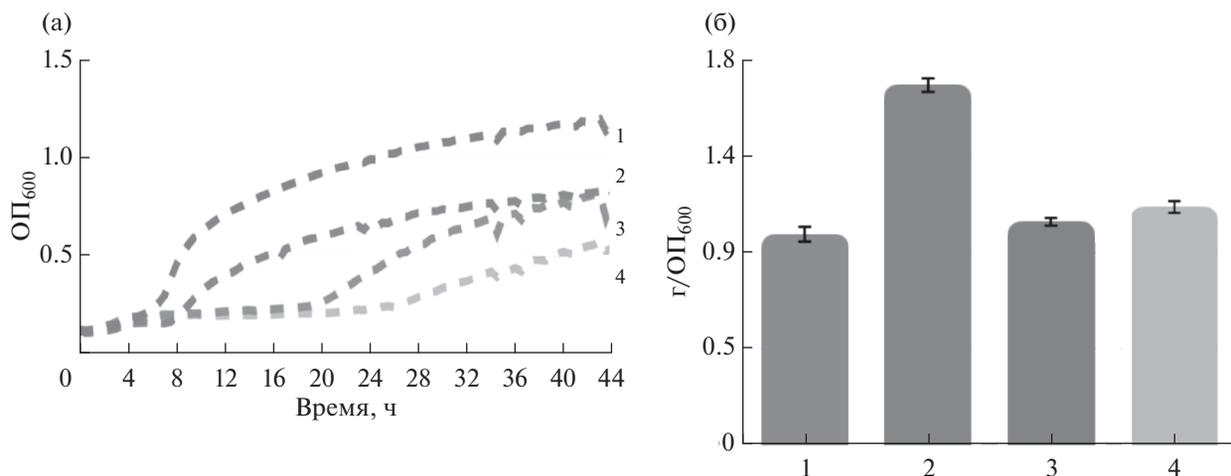


Рис. 8. Рост и продуктивность штаммов-продуцентов L-треонина на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода. *a* – Рост штаммов: THR, исходный (1), THR Δ*cobB*, без деацетилазы (2), THR Δ*patZ* без ацетилтрансферазы (3) и THR Δ*ackA* без ацетилфосфатсинтазы (4). *b* – Продуктивность штаммов (обозначения те же). Стандартные отклонения от средних значений указаны в виде планок погрешностей.

Fig. 8. Growth and productivity of L-threonine producing strains on M9 minimal medium with glucose as the only carbon source. *a* – Growth of strains: THR, original (1), THR Δ*cobB*, without deacetylase (2), THR Δ*patZ*, without acetyltransferase (3) and THR Δ*ackA*, without acetylphosphate synthase (4). *b* – Productivity of strains (same designations). Standard deviations from the means are shown as error bars.

разцах, кроме штаммов с делецией деацетилазы (Δ*cobB*). Для сравнения штаммов между собой ввиду различия скорости роста, утилизации источника углерода и конечной оптической плотности культуры, была рассчитана продуктивность (см. материалы и методы) штаммов-продуцентов, представленная на рис. 7*a* и 8*b*.

Как следует из рис. 7 и 8, штаммы-продуценты пролина и треонина с инактивированным ге-

ном *cobB* продемонстрировали замедленный рост и усвоение глюкозы, но вместе с тем повышенную продуктивность. Очевидно, это может быть связано с нарушением процесса деацетилирования. Следует отметить, что НАД⁺ является одновременно кофактором фермента ГАФД и субстратом деацетилазы *CobB*. Эта конкуренция за НАД⁺ особенно важна для статуса ацетилирования остатков лизина, ацетилирование которых совместно регу-

лируется ацетилфосфатом и CobV [19–21]. При этом биосинтез аминокислот пролина и треонина также является НАД⁺-зависимым процессом и, как было показано ранее [10], создание НАДФ⁺-зависимой формы ГАФД приводит к увеличению продукции этих аминокислот.

На сегодняшний день нет исследований, посвященных ацетилированию белков как инструменту, позволяющему конструировать более производительные бактериальные штаммы-продуценты. В данной работе показано, что уровень активности ГАФД, одного из ключевых ферментов гликолиза, зависит как от метаболических характеристик самого штамма, так и от уровня ацетилирования этого фермента. Оптимизация активности ГАФД, в конечном итоге, существенно влияет на основные параметры штаммов-продуцентов аминокислот. Это следует учитывать при выборе исходного штамма для метаболической инженерии продуцентов биологически активных веществ на его основе.

Детальное изучение ацетилирования белков у бактерий позволит разработать новые подходы “тонкой настройки” метаболизма, путем влияния на уже синтезированные белки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторский коллектив выражает благодарность за помощь в проведении экспериментов и плодотворное обсуждение результатов зав. лабораторией Экологии и геохимической деятельности микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН доктору биологических наук Хижняк Татьяне Владимировне.

В работе использовали оборудование центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019–2027 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1071).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *de Diego Puente T., Gallego-Jara J., Castaño-Cerezo S., Bernal Sánchez V., Fernández Espín V., García de la Torre J., Manjón Rubio A., Cánovas Díaz M.* The Protein Acetyltransferase PatZ from *Escherichia coli* Is Regulated by Autoacetylation-induced Oligomerization. *J. Biol. Chem.*, 2015, 290(38), 3. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.649806>
2. *Fraiberg M., Afanjar O., Cassidy C.K., Gabashvili A., Schulten K., Levin Y., Eisenbach M.* CheY's acetylation sites responsible for generating clockwise flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2015, 95(2), 231–244. <https://doi.org/10.1111/mmi.12858>
3. *Fu Y., Zhang L., Song H., Liao J., Lin L., Jiang W., Wu X., Wang G.* Acetylome and Succinylome Profiling of *Edwardsiella tarda* Reveals Key Roles of Both Lysine Acetylations in Bacterial Antibiotic Resistance. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(7), 841. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070841>
4. *Sun M., Guo H., Lu G., Gu. J., Wang X., Zhang X.E., Deng J.* Lysine acetylation regulates the activity of *Escherichia coli* S-adenosylmethionine synthase. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2016, 48(8), 723–731. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw066>
5. *Schilling B., Basisty N., Christensen D.G., Sorensen D., Orr J.S., Wolfe A.J., Rao C.V.* Global Lysine Acetylation in *Escherichia coli* Results from Growth Conditions That Favor Acetate Fermentation. *J. Bacteriol.*, 2019, 201(9). <https://doi.org/10.1128/JB.00768-18>
6. *Bi J., Wang Y., Yu H., Qian X., Wang H., Liu J., Zhang X.* Modulation of Central Carbon Metabolism by Acetylation of Isocitrate Lyase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Rep.*, 2017, 21(7), 44826. <https://doi.org/10.1038/srep44826>
7. *Huang C.J., Lin H., Yang X.* Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 39(3), 383–399. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>
8. Jeffrey H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics – A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor 1992. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN: 0–87969–349–5.
9. *Маниатис Т., Фрич Э., и Сэмбрук Д.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984, 480.
10. *Slivinskaya E.A., Plekhanova N.S., Altman I.B., Yampolskaya T.A.* Engineering of *Escherichia coli* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase with Dual NAD⁺/NADP⁺ Cofactor Specificity for Improving Amino Acid Production. *Microorganisms*, 2022, 10(5), 976. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050976>
11. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
12. *Nakayasu E.S., Burnet M.C., Walukiewicz H.E., Wilkins C.S., Shukla A.K., Brooks S., Plutz M.J., Lee B.D., Schilling B., Wolfe A.J., Müller S., Kirby J.R., Rao C.V., Cort J.R., Payne S.H.* Ancient Regulatory Role of Lysine Acetylation in Central Metabolism. *mBio*, 2017, 8(6), e01894-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01894-17>
13. *Ouidir T., Kentache T., Hardouin J.* Protein lysine acetylation in bacteria: Current state of the art. *Proteomics*, 2016, 16(2), 301–309. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500258>

14. Brunk E, Chang R.L., Xia J., Hefzi H., Yurkovich J.T., Kim D., Buckmiller E., Wang H.H., Cho B.K., Yang C., Palsson B.O., Church G.M., Lewis N.E. Characterizing posttranslational modifications in prokaryotic metabolism using a multiscale workflow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, 115(43), 11096–11101. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811971115>
15. Plekhanova N.S., Altma I.B., Yurkova M.S., Fedorov A.N. The Effects of Nε-Acetylation on The Enzymatic Activity of *Escherichia coli* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2023, 59(6), 778–785. <https://doi.org/10.1134/S000368382306011X>
16. Schastnaya E., Doubleday P.F., Maurer L., Sauer U. Non-enzymatic acetylation inhibits glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. *Cell. Rep.*, 2023, 42(1), 111950. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111950>
17. Tong C., Liang Y., Zhang Z., Wang S., Zheng X., Liu Q., Song B. Review of knockout technology approaches in bacterial drug resistance research. *PeerJ*, 2023, 17, 11, e15790. <https://doi.org/10.7717/peerj.15790>. PMID: 37605748
18. Castaño-Cerezo S., Bernal V., Post H., Fuhrer T, Cappadona S., Sánchez-Díaz N.C., Sauer U., Heck A.J., Altelaar A.F., Cánovas M. Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.*, 2014, 10(11), 762. <https://doi.org/10.15252/msb.20145227>
19. Kuhn M.L., Zemaitaitis B., Hu L.I., Sahu A., Sorensen D., Minasov G., Lima B.P., Scholle M., Mrksich M., Anderson W.F., Gibson B.W., Schilling B., Wolfe A.J. Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation. *PLoS One*, 2014, 9(4), 94816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094816>
20. AbouElfetouh A., Kuhn M.L., Hu L.I., Scholle M.D., Sorensen D.J., Sahu A.K., Becher D., Antelmann H., Mrksich M., Anderson W.F., Gibson B.W., Schilling B., Wolfe A.J. The *E. coli* sirtuin CobB shows no preference for enzymatic and nonenzymatic lysine acetylation substrate sites. *Microbiologyopen*, 2015, 4(1), 66–83. <https://doi.org/10.1002/mbo3.223>

The Influence of Protein Acetylation and Deacetylation on the Metabolism of *Escherichia coli* strains

N. S. Plekhanova^{a, c, #}, V. A. Livshits^b, M. S. Yurkova^a, and A. N. Fedorov^a

^a*Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Kurchatov Complex of NBICS – Nature-like Technologies, Moscow, 123182 Russia*

^c*Russian University of Chemical Technology named after D.I. Mendeleev, Moscow, 125047 Russia*

[#]*e-mail: plekhanovans@mail.ru*

Abstract—*Escherichia coli* strains are widely used in biotechnology for the production of compounds of great interest, such as L-amino acids and recombinant proteins. The aim of this study was to determine the effect of protein Nε-lysine acetylation processes on the metabolism of commonly used *E. coli* strains MG1655 and BL21(DE3), as well as strains producing the amino acids L-threonine and L-proline. We demonstrate that the acetylation profile of one of the key enzymes of glycolysis, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD), depends on the strain in which this protein was synthesized. Deletion of genes involved in acetate metabolism and acetylation of the ε-amino group of protein lysine affects the metabolism of the producer strains and the productivity of the target amino acids. Approaches involving modulation of protein acetylation may be useful in metabolic engineering in creating more efficient producer strains.

Keywords: acetyl coenzyme A (acetyl-CoA), acetyl-CoA synthetase, Nε-lysine acetylation of proteins, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, acetyltransferase PatZ, deacetylase CobB, acetate kinase AckA