

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «Научно-исследовательский институт  
Аджиномото-Генетика»

*На правах рукописи*



**ШМОНОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА**  
**ДЕГИДРОШИКИМАТДЕГИДРАТАЗА ИЗ *CORYNEBACTERIUM***  
***GLUTAMICUM* И ЕЁ ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ**  
**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА 3,4-**  
**ДИГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ**

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
1.5.3. – Молекулярная биология

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, доцент  
Дорошенко Вера Георгиевна

Москва  
2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Понятие расширенного пути шикимата .....	10
1.2 Использование расширенного пути шикимата для синтеза полезных соединений.....	13
1.2.1 Продуценты 3,4-дигидроксибензойной кислоты.....	13
1.2.2 Пара-гидроксибензойная кислота .....	16
1.2.3 Салициловая кислота .....	17
1.2.4 Пара-аминобензойная кислота.....	17
1.2.5 Цис, цис-муконовая кислота .....	18
1.2.6 Ванилин .....	19
1.3 Характеристика дегидрошикиматдегидратаз.....	20
1.3.1 Дегидрошикиматдегидратазы из грибов .....	21
1.3.2 Мембраносвязанные дегидрошикиматдегидратазы.....	23
1.3.3 Бактериальные однодоменные дегидрошикиматдегидратазы .....	24
1.3.4 Бактериальные двудоменные дегидрошикиматдегидратазы .....	28
1.3.4.1 Дегидрошикиматдегидратаза QsuB из <i>C. glutamicum</i> .....	32
1.3.5 QuiC2-подобные дегидрошикиматдегидратазы.....	34
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1 Химические вещества и ферменты.....	37
2.2 Бактериальные штаммы и плазмиды .....	37
2.3 Олигонуклеотиды.....	39
2.4 Среды и условия культивирования .....	42
2.3.1 Культивирование на лабораторных средах .....	42
2.3.2 Проведение ферментаций.....	42
2.4 Манипуляции с ДНК.....	44
2.4.1 ДНК-фрагменты для получения делеций в хромосоме.....	44

2.4.2	Конструирование плазмид с использованием ДНК-полимеразы .....	45
2.4.3	Конструирование плазмид с помощью рестрикции-лигирования.....	48
2.4.4	Введение ДНК в штаммы <i>E. coli</i> и <i>C. glutamicum</i> .....	49
2.5	Конструирование штаммов методами рекомбинационной инженерии .....	50
2.5.1	Конструирование штаммов <i>E. coli</i> .....	50
2.5.2	Конструирование штаммов <i>C. glutamicum</i> .....	51
2.6	Экспрессия и очистка белка.....	52
2.7	Гель-фильтрация .....	53
2.8	Определение активности ферментов.....	54
2.9	ВЭЖХ анализ.....	56
2.10	Выравнивание последовательностей и трехмерный структурный анализ .	56
2.11	Статистический анализ.....	57
	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....</b>	<b>58</b>
3.1	Классификация дегидрошикиматдегидратазы QsuB из <i>C. glutamicum</i> на основании гомологии её аминокислотной последовательности.....	58
3.2	Рекомбинантная экспрессия и определение олигомерного состояния QsuB и его N-концевого домена .....	60
3.3	Исследование функции C-концевого домена QsuB.....	62
3.4	Биохимические свойства QsuB и N-QsuB .....	64
3.4.1	Анализ активности DSD для QsuB и N-QsuB .....	64
3.4.2	Определение оптимального кофактора и pH реакции .....	65
3.4.3	Кинетические кривые QsuB и N-QsuB и их анализ .....	66
3.4.4	Ингибирование QsuB и N-QsuB продуктом реакции.....	67
3.5	Продукция 3,4-DHBA из глюкозы с помощью QsuB и N-QsuB в клетках <i>E. coli</i> .....	68
3.6	Сравнение QsuB с дегидрошикиматдегидратазами других типов.....	70
3.6.1	Рекомбинантная экспрессия дегидрошикиматдегидратаз в <i>E. coli</i> .....	70
3.6.2	Сравнительный анализ металлических кофакторов AsbF, Qa-4 и QsuB	72

3.6.3 Сравнение кинетических свойств дегидрошикиматдегидратаз.....	72
3.6.4 Сравнительный анализ ферментов по ингибированию продуктом реакции.....	74
3.6.5 Температурный оптимум QsuB по сравнению с AsbF и Qa-4.....	77
3.6.6 Продукция 3,4-DHBA в <i>E. coli</i> с помощью AsbF, Qa-4 и QsuB.....	78
3.6.7 Продукция 3,4-DHBA в <i>C. glutamicum</i> с помощью AsbF, Qa-4 и QsuB.	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	83
ВЫВОДЫ .....	85
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	86
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	90
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	110

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Биотехнологическое получение промышленно значимых и биологически активных соединений из возобновляемого сырья является перспективной альтернативой их традиционному химическому синтезу из нефтепродуктов. Последний энерго- и ресурсозатратен, а также менее экологичен.

Для микробиологического синтеза полезных соединений требуется конструирование высокоэффективных продуцентов, которые получают в настоящее время методами метаболической инженерии и синтетической биологии (Stephanopoulos, Aristidou, Nielsen, 1998; Benner, Sismour, 2005; Wendisch, 2014). В качестве платформ для конструирования продуцентов используются микроорганизмы, физиология и молекулярная биология которых известна, а также имеется эффективный генетический инструментарий. Среди бактерий перечисленным критериям, как известно, удовлетворяют лабораторные штаммы *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum*. На основе этих бактерий были созданы промышленные продуценты различных аминокислот (Ikeda, 2017; Дорошенко с соавт., 2014; Liu et al., 2019; Лившиц с соавт., 2004; Sheremetieva et al., 2022; Hermann, 2003; Ikeda, Takeno, 2013; Ikeda, Takeno, 2020). В настоящее время *C. glutamicum* и *E. coli* разрабатываются в качестве платформ для производства товарных химикатов, биотоплива, косметики и фармацевтических препаратов (Cho et al., 2022; Keasling et al., 2021; Cankar, Henke, Wendisch, 2023; Becker, Rohles, Wittmann, 2018; Kogure, Inui, 2018). Путем интеграции синтетической биологии, стратегий метаболической инженерии и информации об организмах, полученной с использованием «омикс»-технологий, создаются новые пути биосинтеза целевых веществ.

3,4-дигидроксибензойная, или протокатеховая, кислота (3,4-DHBA) относится к естественным ароматическим метаболитам некоторых микроорганизмов. Она является сильным антиоксидантом и обладает рядом других полезных свойств (Kakkar, Bais, 2014; Khan et al., 2015; Krzysztoforska et

al., 2019; Masella et al., 2012). 3,4-DHBA может быть использована в фармацевтике и косметике (Daré et al., 2020; Song et al., 2020). 3,4-DHBA синтезируется из 3-дегидрошикимовой кислоты (DHS) с помощью дегидрошикиматдегидратазы (DSD) (EC: 4.2.1.118). Этот фермент был обнаружен, в первую очередь, в почвенных микроорганизмах (прототипом является Qa-4 из *Neurospora crassa*), где он является частью катаболизма шикимовой и хинной кислот (Strøman, Reinert, Giles, 1978). Позже был охарактеризован биосинтетический фермент AsbF, синтезирующий 3,4-DHBA в качестве компонента сидерофора в патогенных видах *Bacillus* (Pfleger et al., 2008; Fox et al., 2008).

DHS является интермедиатом общего ароматического пути, что позволяет конструировать путь синтеза 3,4-DHBA из глюкозы в клетках микроорганизмов. Кроме того, было показано, что из 3,4-DHBA можно получать такие промышленно значимые соединения, как катехол, ванилин, *цис,цис*-муконовую кислоту (ссМА) и др. (Averesch, Kromer, 2018; Kogure, Inui, 2018; Lee, Wendisch, 2017).

К началу нашей работы были систематизированы данные о структурном разнообразии DSD (Peek et al., 2017). Были выделены 4 класса таких ферментов: бактериальные однодоменные (AsbF) и двудоменные, однодоменные из грибов (Qa-4) и мембраносвязанные. Некоторые DSD были охарактеризованы биохимически (Strøman, Reinert, Giles, 1978; Peek et al., 2017; Pfleger et al., 2008; Fox et al., 2008; Shinagawa et al., 2010; Tateoka, Yasuda, 1995). Несмотря на то, что для отдельных DSD было продемонстрировано их применение для синтеза целевых продуктов, сравнительный анализ каталитических свойств разных ферментов для продукции целевого соединения в выбранном организме не проводился.

Изучение ферментов из промышленно значимых непатогенных организмов имеет первостепенное значение, так как для микробиологического производства некоторых соединений бывает актуально использование генов одного организма (self-cloning). Было известно, что *C. glutamicum*, в отличие от *E. coli*, может катаболизировать шикимовую и хинную кислоты. Гены ферментов этого пути

были идентифицированы, но сами ферменты, в том числе и DSD, не были охарактеризованы биохимически (Teramoto, Inui, Yukawa, 2009). Таким образом, изучение DSD из *C. glutamicum* актуально, как для более полной характеристики этой промышленно значимой бактерии, так и с точки зрения потенциального использования этого фермента.

### **Цель и задачи исследования**

Цель настоящей работы – молекулярно-биологическое исследование дегидрошикиматдегидратазы QsuB из *C. glutamicum*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Характеристика QsuB на основании её структуры;
2. Изучение биохимических свойств QsuB;
3. Получение продукции 3,4-DHBA с помощью QsuB в ферментации;
4. Сравнение QsuB с дегидрошикиматдегидратазами других типов.

### **Научная новизна и практическая ценность работы**

Впервые охарактеризована двудоменная дегидрошикиматдегидратаза QsuB из *C. glutamicum*. Белки QsuB и N-концевой домен QsuB, ответственный за дегидрошикиматдегидратазную активность, были выделены и исследованы на олигомерный состав и биохимические свойства. Каталитические свойства QsuB и N-QsuB исследованы *in vivo* с помощью модельных продуцентов 3,4-DHBA на основе *E. coli*, содержащих гены *qsuB* и *n-qsuB*. На основании *in vivo* и *in vitro* исследований QsuB и N-QsuB, сделан вывод о необходимости C-концевого домена для поддержания структурной стабильности QsuB.

Впервые проведен сравнительный анализ дегидрошикиматдегидратаз трёх классов: двудоменной QsuB и однодоменных AsbF и Qa-4 из бактерий и грибов, соответственно. Определены биохимические характеристики, включая ингибирование продуктом реакции, которые существенны для практического использования этих ферментов.

Сделано предположение по практическому использованию дегидрошикиматдегидратаз, связанных с катаболическим и биосинтетическим путями.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации представлялись на конкурсах молодых ученых АО «АГРИ» (2018, 2020); на конференции - The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research (2018); на онлайн симпозиуме EMBO | EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology (2021).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы: 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и тезисы доклада на научной конференции.

**Личный вклад соискателя** состоял в анализе литературных данных, определении стратегий исследования, проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке материалов к публикациям, представлении полученных результатов на конференциях.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из стандартных разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений и обозначений, приложений. Работа изложена на 111 страницах и включает 31 рисунок, 14 таблиц и 167 цитируемых источников.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Дегидрошикиматдегидратаза из *C. glutamicum*, кодируемая геном *qsuB*, состоит из двух доменов. N-концевой домен N-QsuB отвечает за дегидрошикиматдегидратазную активность. C-концевой домен необходим для образования тетра- и октомеров QsuB.

2. С помощью модельных продуцентов 3,4-DHBA на основе *E. coli* исследованы свойства QsuB и N-QsuB, проявляющиеся *in vivo*. Показано, что



штамм, экспрессирующий полноразмерный QsuB, продуцирует значительно больше 3,4-DHBA, чем штамм, экспрессирующий его укороченный вариант.

3. Проведено сравнение биохимических свойств дегидрошикиматдегидратаз QsuB, Qa-4 и AsbF, относящихся к разным классам. Установлено, что ферменты QsuB и Qa-4 имеют на порядки более высокую активность, чем AsbF. Последний обладал значительно более высоким сродством к субстрату и был более подвержен ингибированию конечным продуктом 3,4-DHBA, чем другие ферменты.

4. С помощью модельных продуцентов, экспрессирующих гены дегидрошикиматдегидратаз различных типов, продемонстрировано преимущество ферментов QsuB и Qa-4 для получения продукции 3,4-DHBA в клетках *E. coli*. Выявлено преимущество модельных продуцентов на основе *C. glutamicum*, способной накапливать большую биомассу, по сравнению со штаммами *E. coli*.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Понятие расширенного пути шикимата

Ароматические соединения образуются в общем ароматическом, или шикиматном (исторически названном по первому охарактеризованному интермедиату) пути, присутствующем у микроорганизмов (бактерий, грибов, дрожжей) и растений (Rodriguez et al., 2014). Путь шикимата включает семь последовательных ферментативных реакций, приводящих к образованию хоризмата (СНА) из фосфоенолпирувата (PEP) и эритрозо-4-фосфата (E4P), интермедиатов центрального метаболизма (Рисунок 1.1). Из СНА синтезируются ароматические витамины (например, хиноны, пара-аминобензойная кислота (рАВА)) и ароматические аминокислоты L-Trp, L-Tyr и L-Phe, из которых у растений образуются вторичные метаболиты, фенилпропаноиды (Bentley, Haslam, 1990). В последние десятилетия в результате развития синтетической биологии появилось понятие «расширенного шикиматного пути» (Lee, Wendisch, 2017). Этот термин объединяет совокупность сконструированных *de novo* путей синтеза полезных соединений из интермедиатов общего ароматического пути (Herrmann, Weaver, 1999; Jiang, Zhang, 2016; Nuccetogullari, Luo, Lee, 2019). 3,4-DHBA, синтезу которой из глюкозы посвящена данная работа, является ключевым соединением расширенного пути шикимата (Рисунке 1.1).

3,4-DHBA – водорастворимое производное бензойной кислоты, относящееся к группе фенолокислот, которые совместно с флавоноидами, фенольными спиртами, стилбенами и лигнанами, составляет большую группу полифенолов. Некоторые из таких соединений, в том числе и 3,4-DHBA, могут продуцироваться определёнными видами растений.

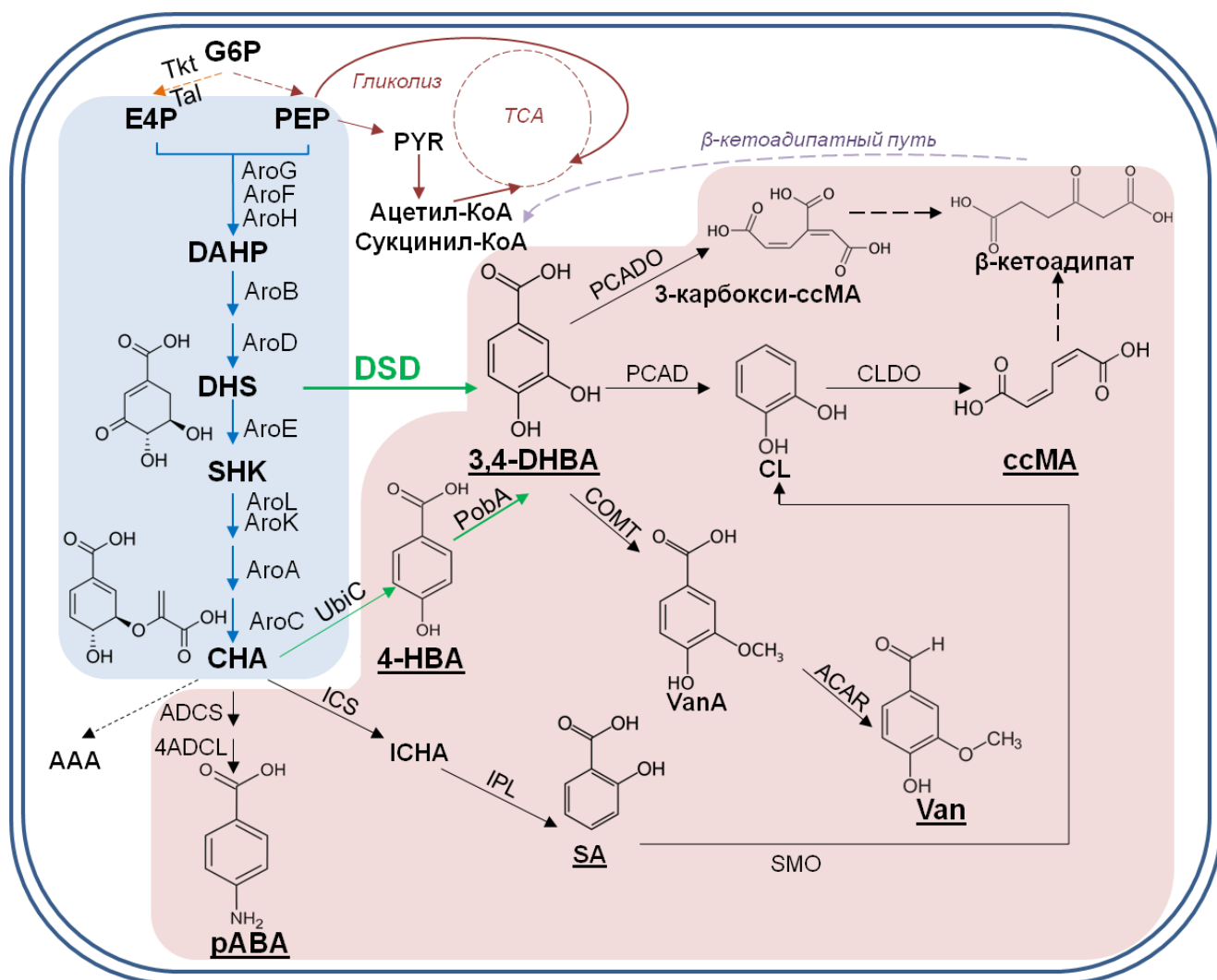


Рисунок 1.1 – Общий ароматический путь (показан голубым цветом) и расширенный путь шикимата (показан розовым)

Обозначения соединений: 3,4-DHBA – 3,4-дигидроксibenзойная кислота; 4-HBA – 4-гидроксibenзойная кислота; AAA – ароматические аминокислоты; cсMA – *цис,цис*-муконовая кислота; CHA – хоризмовая кислота; CL – катехол; DAHP – 3-дезоксид-*D*-арабиногептулозонат-7-фосфат; DHS – 3-дегидрошикимовая кислота; E4P – эритрозо-4-фосфат; G6P – глюкозо-6-фосфат; ICHA – изохоризмовая кислота; pABA – пара-аминобензойная кислота; PEP – фосфоенолпируват; PYR – пируват; SA – салициловая кислота; SHK – шикимовая кислота; Van – ванилин; VanA – ванилиновая кислота.

Реакции шикиматного пути обозначены как гены *E. coli* и кодируют следующие ферменты: AroG, AroF, AroH – DAHP-синтазы; AroD – 3-дегидрохинатдегидратаза; AroE – шикимат-5-дегидрогеназа; каждый из AroL, AroK – шикиматкиназы; AroA – 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу; AroC – хоризматсинтазу. Обозначения ферментов расширенного пути шикимата: DSD – дегидрошикиматдегидратаза; UbiC – хоризматлиаза; PobA – 4-HBA-3-монооксигеназа; 4ADCL – 4-амино-4-дезоксихоризматлиаза; ACAR – редуктаза ароматических

карбоновых кислот; ADCS – аминоксидохоризматсинтаза; CLDO – катехол-1,2-диоксигеназа; COMT – катехол-О-метилтрансфераза; ICS – изохоризматсинтаза; IPL – изохоризматпируватлиаза; PCAD – 3,4-DHBA-декарбоксилаза; PCADO – 3,4-DHBA-3,4-диоксигеназа; SMO – салицилатмонооксигеназа. TCA – цикл трикарбоновых кислот. Сплошные стрелки показывают одиночные ферментативные реакции, а пунктирные – множественные.

Полезные ароматические соединения, выделенные экстракцией из растительных источников, имеют высокую себестоимость, как следствие низкого выхода данного метода. С другой стороны, их химический синтез осуществляется почти исключительно из невозобновляемых нефтяных ресурсов, обычно с использованием канцерогенного бензола в качестве сырья. В связи с этим биотехнологическое производство ароматических соединений и их производных из возобновляемой биомассы может способствовать решению таких проблем, как ограниченная доступность и урожайность растений, истощение запасов нефти, сохранение окружающей среды, здоровья и т.д. (Gallage, Møller, 2015; Okai et al., 2016; Polen et al., 2005; Thompson, Machas, Nielsen, 2016).

При создании продуцентов ароматических соединений, происходящих из интермедиатов общего ароматического пути, помимо конструирования нового пути биосинтеза, руководствуются принципами, разработанными для получения продуцентов ароматических аминокислот (Дорошенко с соавт., 2014). Это делегирование конкурирующих путей биосинтеза (например, *ΔaroE* для продуцентов 3,4-DHBA); усиление потока углерода в общий ароматический путь (усиление ДАНР-синтазы) и последующих реакций общего ароматического пути. Для создания более эффективных продуцентов рекомендуется также увеличение количества предшественников общего ароматического пути. На примере *E. coli* это может быть: усиление гена транскетолазы – *tkt* и переход на транспорт глюкозы, не зависящий от фосфотрансферазной системы (PTS), которая переводит PEP в PYR.

## 1.2 Использование расширенного пути шикимата для синтеза полезных соединений

Впервые синтез 3,4-DHBA и её производных с помощью искусственно скомбинированных реакций в клетках *E. coli* был продемонстрирован в работах группы Фроста (Draths, Frost, 1995). Использовался ауксотрофный по ароматическим аминокислотам штамм *E. coli* AB2834 с инактивированной шикиматдегидрогеназой AroE. Поток углерода на DHS был усилен за счёт амплификации на плазмиде генов *tkt*, *aroF*, *aroB*, кодирующих транскетолазу, ДАНР-синтазу и DHQ-синтазу, соответственно. Для синтеза 3,4-DHBA из DHS использовали DSD AroZ из *Klebsiella pneumonia*, а для получения катехола из 3,4-DHBA – 3,4-DHBA-декарбоксилазу AroY из того же организма. Введение гена *aroZ* в штамм, накапливавший DHS, привело к продукции 4 г/л 3,4-DHBA, а в комбинации с *aroY* к продукции 4 г/л катехола. Ферментацию проводили на среде с глюкозой в колбах. Дальнейшие исследования этой группы были посвящены увеличению продукции катехола (Li, Xie, Frost, 2005), а также получению ванилина (Li, Frost 1998), адипиновой кислоты (Niu, Draths, Frost, 2002).

### 1.2.1 Продуценты 3,4-дигидроксибензойной кислоты

Как видно из Рисунка 1.1, 3,4-DHBA можно синтезировать из DHS с помощью DSD в одну реакцию и из CHA с помощью двух реакций. Это превращение CHA в 4-HBA с помощью хоризмат-пируватлиазы UbiC с последующим преобразованием 4-HBA в 3,4-DHBA посредством NADPH-зависимого фермента пара-гидроксибензоатгидроксилазы RobA. Первый вариант является предпочтительным, как по количеству задействованных реакций, так и с точки зрения стехиометрии. Для синтеза CHA из DHS требуется дополнительно по одному молю АТФ, NADPH и PEP, а для восстановления 4-HBA до 3,4-DHBA еще один моль NADPH.

Для конструирования продуцентов 3,4-DHBA использовали штаммы дрожжей, *E. coli* и *C. glutamicum* (Weber et al., 2012; Örn et al., 2021; Kogure et al., 2021).

В дрожжах ступенчатое превращение ДАНР в EPSP через DHS опосредовано пентафункциональным ферментом Arom, кодируемым геном *ARO1* (Duncan, Edwards, Coggins, 1987; Duncan, Edwards, Coggins, 1988). Для накопления DHS использовали штамм *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1C, содержащий укороченный аллель гена *ARO1* <sup>$\Delta$ aroE</sup>, и его дополнительные копии на плазмиде (Weber et al., 2012). Гены DSD из *Acinetobacter* spp., *Podospira anserina*, *Bacillus thuringiensis* вводили на плаزمидах. Наивысший титр 3,4-DHBA, ~ 0,15 г/л, был получен в присутствии плазмиды с геном *asbF* из *B. thuringiensis* в периодической культуре после 120 часов культивирования. Невысокий титр 3,4-DHBA (~ 400 мг/л) был достигнут и при культивировании в периодической культуре (48 ч) штамма *Schizosaccharomyces pombe* SP887 (Hansen et al., 2009). В этом штамме использовалась DSD из *Podospira pauciseta*. Оба продуцента 3,4-DHBA на основе дрожжей были промежуточными при получении продуцентов ссМА (*S. cerevisiae*) и ванилина (*Sc. pombe*).

Конструирование собственно продуцентов 3,4-DHBA проводилось на основе *E. coli* и *C. glutamicum*. В этих бактериях конструировали синтез 3,4-DHBA как из DHS, так и из СНА.

В *E. coli* для синтеза 3,4-DHBA из DHS использовали DSD из *Ps. putida*, ген которой на плазмиде вводили в штамм-продуцент фенилаланина ATCC 31882 (Örn et al., 2021). Этот штамм содержал делеции генов *aroF*, *aroG*, *tyrR*, *pheA*, *tyrA*, *trpE* и, очевидно, был не оптимизирован для накопления DHS. При культивировании (50 ч) в колбах продукция 3,4-DHBA составила  $1,8 \pm 0,28$  г/л, а в ферментерах с подпиткой глюкозой и хлоридом аммония  $3,8 \pm 0,1$  г/л.

Для получения 3,4-DHBA альтернативным путём также использовали штамм *E. coli* продуцирующий фенилаланин (Pugh et al., 2014). Перенаправление углерода на синтез 3,4-DHBA было достигнуто с помощью нативного фермента UbiC и RobA из *Pseudomonas aeruginosa*. Накопление 3,4-DHBA составляло около

500 мг/л после 96 ч культивирования в периодической культуре. Получение 3,4-DHBA из СНА тестировалось в *C. glutamicum* с использованием генов *ubiC* из *E. coli* и нативного *pobA* (Okai et al., 2016). Накопление 3,4-DHBA также было низким (~ 1 г/л). Причиной этому могло быть ингибирование UbiC продуктом реакции 4-НВА (Siebert, Severin, Heide, 1994). Следовательно, при использовании генов *ubiC* и *pobA* необходимо было совместно тюнинговать их активности.

Биплазмидный штамм, способный утилизировать в качестве источника углерода ксилозу, был создан на основе *C. glutamicum* (Labib et.al., 2021). Пируваткиназа (ген *pyk*), а также большая часть периферических и центральных путей деградации ароматических компонентов были инактивированы. Поток углерода в ТСА был уменьшен за счет снижения активности цитратсинтазы, и усилен в общий ароматический путь за счёт экспрессии кодон-оптимизированного гена *aroF<sup>fbr</sup>* из *E. coli*. Последний был скомбинирован на плазмиде с геном *qsuB*, кодирующем DSD *C. glutamicum*. Титр 3,4-DHBA в ферментации в колбах составил  $9,6 \pm 1,9$  г/л.

Наиболее высокие титры 41,7 и 82,7 г/л 3,4-DHBA (при остановке роста клеток) были достигнуты в *C. glutamicum* при более продуманной инженерии штамма (Kogure et al., 2021). Для синтеза 3,4-DHBA использовали оба пути: через DHS с помощью нативной QsuB, ген которой был сверхэкспрессирован, и через СНА. Для конструирования второго пути синтеза 3,4-DHBA использовали хоризмат-пируватлиазу UbiC из *Providencia rustigianii*, устойчивую к ингибированию конечным продуктом (Kitade et al., 2018). В полученном продуценте 3,4-DHBA на основе *C. glutamicum* была инактивирована деградация 3,4-DHBA (*ΔpcaHG*), а так же собственная дегидрохинатдегидратаза (*qsuD*). Усилен ароматический путь за счет интеграции генов *E. coli*: *aroG<sup>fbr</sup>*, *aroA*, *aroD*, *aroE*, *aroСКВ*. Эти гены экспрессировались под сильным промотором гена *gapA* *C. glutamicum*. Под этим же промотором экспрессировалась дополнительная копия гена *qsuB*, две копии нативного гена *pobA* и гетерологичный ген *ubiC*. Полученный продуцент 3,4-DHBA не являлся ауксатрофом по ароматическим

аминокислотам, что исключало их добавление в ферментационную среду и было экономически выгодно. В то же время синтез 3,4-DHBA через СНА исключал накопление побочных примесей – интермедиатов общего ароматического пути и ароматических аминокислот.

### 1.2.2 Пара-гидроксibenзойная кислота

4-НВА и ее производные широко используются при изготовлении жидких кристаллов, парабенатов и др. (Barker, Frost, 2001; Kitade et al., 2018). В настоящее время 4-НВА синтезируют из бензола. 4-НВА относится к вторичным метаболитам растений и образуется посредством каскадных реакций через фенилпропаноиды (Muller et al., 1995). Поэтому в качестве альтернативы химическому синтезу, было предложено одностадийное получение 4-НВА из СНА с помощью хорионатпируватлиазы, кодируемой геном *ubiC* *E. coli*, где эта реакция является частью биосинтеза убихинона (Barker, Frost, 2001). При использовании системы кокультивации *E. coli* – *E. coli* из смеси глюкозы и ксилозы было получено 2,3 г/л 4-НВА (Zhang et al., 2015). Первый сконструированный штамм продуцировал и секретировал DHS, который утилизировался вторым штаммом, содержащим импортер DHS, кодируемый геном *shiA*, и ферменты для последующих реакций. Для того чтобы штаммы не конкурировали за источник углерода, пути утилизации сахара у обоих штаммов были изменены. Первый штамм утилизировал ксилозу, второй – глюкозу. Более высокое накопление 4-НВА – 36,6 г/л, что соответствовало выходу из глюкозы 41 % (моль/моль), было получено для штамма *C. glutamicum*, в котором путь биосинтеза 4-НВА был сконструирован с помощью ферментов из *E. coli* (Kitade et al., 2018). Несмотря на лучшую переносимость 4-НВА у дрожжей, чем у бактерий, производитель на основе *S. cerevisiae* накапливал только миллиграммы 4-НВА и, следовательно, нуждался в дальнейшем усовершенствовании (Krömer et al., 2013; Williams et al., 2015).



### 1.2.3 Салициловая кислота

SA широко используется в качестве анальгетического, противовоспалительного и жаропонижающего средства (Furman, 2018). В природе, она синтезируется, как вторичный метаболит, в растениях, грибах и бактериях из СНА. В растениях она является фитогормоном и регулирует различные аспекты роста, выживания в стрессовых условиях и защиты от патогенов. В некоторых бактериях SA играет роль предшественника железохелатирующего сидерофора (Mishra, Baek, 2021). В частности, в *E. coli* для получения продукции SA использовали одну из собственных изохоризматпируватлиаз (Noda et al., 2016). Продукт фенилаланина *E. coli* был реконструирован для синтеза SA. Титр SA 11,5 г/л был достигнут с помощью штамма *E. coli*, в котором PTS-транспорт глюкозы был заменён протонным симпортёром Gal и глюкокиназой Glk. Для сохранения PEP были так же инактивированы пируваткиназы. В *C. glutamicum* SA получали с помощью бифункциональной изохоризматсинтазы/изохоризматпируватлиазы Ipr9 из *Yersinia enterocolitica* (Kallscheuer, Marienhagen, 2018).

### 1.2.4 Пара-аминобензойная кислота

pABA широко используется в фармацевтической промышленности, в производстве смол и красителей. В настоящее время pABA производится из толуола. pABA также является естественным метаболитом биосинтеза фолиевой кислоты в растениях и бактериях. Она синтезируется в результате двухстадийной конверсии СНА, катализируемой аминодезоксихоризматсинтазой (ADCS) и 4-амино-4-дезоксихоризматлиазой (4ADCL) (Wegkamp et al., 2007). Впервые продукция pABA была получена в *S. cerevisiae* за счет сверхэкспрессии pABA-синтазы дрожжей. В продуценте pABA были инактивированы конкурирующие пути биосинтеза ароматических кислот из СНА (Krömer et al., 2013). Для этого продуцента изучали влияние различных источников углерода (глюкоза, глицерин и смесь глицерина/этанола) на продукцию pABA. Наибольший титр и выход

pABA 215 мг/л и 2,64 % моль/моль углерода, соответственно, наблюдали из смеси глицерин/этанол (Averesch, Winter, Krömer, 2016). Рекомбинантный штамм *E. coli*, в котором были усилены собственные гены синтеза pABA из СНА: *pabA*, *pabB* (ADCS) и *pabC* (4ADCL), а так же ген ДАНР-синтазы *aroF*, продуцировал 4,8 г/л pABA в периодической ферментации с подпиткой (Koma et al., 2014). Титр pABA 43 г/л был достигнут с помощью продуцента на основе *C. glutamicum*, экспрессирующей *pabAB* из *Corynebacterium callunae* и *pabC* из *Xenorhabdus bovienii* в периодической культуре с подпиткой (Kubota et al., 2016).

### 1.2.5 Цис, цис-муконовая кислота

ссМА – дикарбоновая кислота, используемая в химическом синтезе в качестве предшественника адипиновой кислоты, основного строительного блока нейлона и полиуретана. ссМА может быть эффективно преобразована в адипиновую кислоту гидрированием с выходом 97 % (моль/моль) (Niu, Draths, Frost, 2002). В настоящее время ссМА производится нефтехимически. Известно, что некоторые бактерии, такие как *Pseudomonas putida*, *Arthrobacter* sp. и *Sphingobacterium* sp. синтезируют ссМА из бензойной кислоты или толуола при деградации бензоата, которые не являются возобновляемыми источниками углерода (van Duuren et al., 2011).

Несколько стратегий получения ссМА биологическим методом из глюкозы было разработано *de novo* (Рисунок 1.1) (van Duuren et al., 2012). Во всех случаях непосредственным предшественником являлся катехол (CL), при раскрытии ароматического кольца которого образовывалась ссМА. Основная стратегия основывалась на катаболизме DHS по  $\beta$ -кетoadипатному пути (Sonoki et al., 2018; Ornston, 1966; Fuchs, Boll, Heider, 2011). Достигнутый титр составил 36,8 г/л. Использовался рекомбинантный штамм *E. coli*, содержащий гены DSD (*aroZ*) и 3,4-DHBA-декарбоксилазы (*aroY*) из *K. pneumonia*, а также ген катехол-1,2-диоксигеназы (*catA*) из *Acinetobacter calcoaceticus* (Niu, Draths, Frost, 2002). В других работах ссМА синтезировали из СНА (Рисунок 1.1.) (Averesch, Krömer,

2014). В одном случае, CL получали через 2,3-дигидроксибензойную кислоту (Sun et al., 2014). В другом случае, CL получили из SA с использованием гена *nahG*, кодирующего салицилатмонооксигеназу (SMO) из *Ps. putida* DOT-T1E. Рекомбинантная *E. coli*, экспрессирующая SMO, продуцировала 1,5 г/л SA (Lin et al., 2014).

### 1.2.6 Ванилин

Ванилин (4-гидрокси-3-метоксибензальдегид, Van) широко используется в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Поскольку экстракция из растительного источника *Vanilla planifolia* (Barghini et al., 2007; Sinha, Sharma U., Sharma N., 2008) является дорогостоящей, текущий мировой спрос обеспечивается, в основном, синтетическим ванилином, получаемым с помощью химической конверсии продуктов нефтехимии гваякола и глиоксиловой кислоты (Kaur, Chakraborty, 2013).

Некоторые актиномицеты, такие как *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 и *Amycolatopsis* sp. HR167, способны производить ванилин в качестве интермедиата катаболизма феруловой кислоты (Sutherland, Crawford, Pometto, 1983; Achterholt, Priefert, Steinbüchel, 2000). Штаммы *Pseudomonas*, а также ряд других бактерий (*Delftia acidovorans*, *Amycolaptosis* sp.) синтезируют ванилин из феруловой кислоты и эвгенола с помощью нативных ферментов: ферулоил-КоА-синтетазы (использует КоА (кофермент А), в качестве кофактора, ген *fcs*) и эноил-КоА-гидратазы/альдолазы (ген *ech*), или  $\beta$ -кетотиолазы, (ген *aat*) (Overhage, Priefert, Steinbüchel, 1999; Plaggenborg, Steinbüchel, Priefert, 2001; Di Gioia et al., 2011; Gallage, Møller, 2015; Plaggenborg et al., 2003). Рекомбинантный штамм *E. coli* XL1-Blue, содержащий соответствующие гетерологичные гены *fcs* и *ech* накапливал до 5,14 г/л ванилина из феруловой кислоты за счет использования глиоксилатного шунта, который, по сравнению с ТСА циклом, обеспечивал более эффективное превращение ацетил-КоА в КоА (Lee et al., 2009). Ванилин (7,8 г/л) из феруловой кислоты получали также с помощью двустадийной биоконверсии,

используя штаммы *E. coli*, экспрессирующие кофермент-независимую декарбоксилазу и оксигеназу, соответственно (Furuya et al., 2015). Однако феруловая кислота является дорогостоящим сырьем, поэтому в ряде исследований было показано получение ванилина *de novo* из глюкозы. Изначально двухстадийный процесс включал получение ванилиновой кислоты в рекомбинантном штамме *E. coli*, экспрессирующем DSD AroZ из *Po. anserina* и катехол-О-метилтрансферазу человека (COMT) с дальнейшим восстановлением ванилиновой кислоты до ванилина с помощью *N. crassa*, содержащей редуктазу ароматических карбоновых кислот (ACAR) (Li, Frost, 1998). Впоследствии весь путь синтеза ванилина был успешно реконструирован в *Sc. pombe* и *S. cerevisiae* с использованием ACAR из *Nocardia iowensis* (Hansen et al., 2009).

Как видно из представленных примеров, для конструирования расширенного пути шикимата использовались DSD, выделенные из разных источников и без учёта их характеристик. Исследования DSD из разных организмов проводились независимо от их применения для микробиологического синтеза полезных соединений.

### 1.3 Характеристика дегидрошикиматдегидратаз

Дегидрошикиматдегидратаза была обнаружена в ряде организмов, где она может выполнять разные функции. В большинстве случаев этот фермент является частью катаболического пути организмов, способных утилизировать шикимовую и хинную кислоты (Hawkins et al., 1993; Shen, Zhou, Liu, 2012). Более уникальным является синтез 3,4-DHBA в качестве железосвязывающего компонента сидерофора – петробактина в некоторых патогенных видах *Bacillus*. (Garner, Arceneaux, Byers, 2004; Williams et al., 2012; Wilson et al., 2006). В этих патогенах петробактин необходим для выживания в организме хозяина (Cendrowski, MacArthur, Hanna, 2004). Петробактин и его сульфированное производное (Hickford et al., 2004) являются единственными известными сидерофорами, в которых, в качестве хелатора железа, используется нетипичная для сидерофора

3,4-DHBA. Сидерокалин, белок, который, как часть врожденного иммунного ответа человека, связывает большинство сидерофоров, не способен связывать комплексы железа с петробактином. Поэтому петробактин не только «ускользает» от иммунной системы млекопитающих, но также способствует росту и пролиферации бактерий-патогенов в организме млекопитающего-хозяина (Abergel, Zawadzka, Raymond, 2008; Abergel et al., 2006).

На основании анализа аминокислотных последовательностей Дж. Пик с соав. (2017) выделил 4 класса DSD. Биосинтетический фермент, участвующий в синтезе сидерофора, был отнесён к бактериальным однодоменным, тогда как ферменты, относящиеся к катаболическому пути были разделены на бактериальные двудоменные, однодоменные DSD из грибов и мембраносвязанные (Peek et al., 2017). Мембраносвязанные белки, которые также имели достаточно ограниченное распространение, существенно отличались от белков других классов. Наиболее широко встречающимися оказались двудоменные ферменты, которые обнаружены как в грамотрицательных, так и в грамположительных бактериях. В 2020 году на основании филогенетического анализа был выделен ещё один класс DSD (Xue, Prezioso, Christendat, 2020). Этот класс включает фермент из *Listeria monocytogenes*, который синтезирует 3,4-DHBA, предположительно, для поддержания симбиоза.

### 1.3.1 Дегидрошикиматдегидратазы из грибов

Первой исследованной DSD была Qa-4 из *N. crassa*. Катаболизм хинной кислоты у *N. crassa*, как впоследствии было показано и для других организмов, начинался с трех реакций, ферменты которых кодировались кластером генов *qa* (Case, Giles, 1976; Chaleff, 1974). Ген *qa-2* кодировал катаболическую 3-дегидрохинатгидролиазу (ЕС 4.2.1.10); *qa-3* – хинат-(шикимат-)дегидрогеназу (ЕС 1.1.1.24); а *qa-4* – дегидрошикиматдегидратазу.

Белок Qa-4 представлял собой мономер с молекулярной массой около 37 кДа (Strøman, Reinert, Giles, 1978). Оптимальное значение pH для Qa-4 находилось

в пределах 7,4 – 7,6 (Gross, 1958). Qa-4 проявлял каталитическую активность только в присутствии катионов двухвалентных металлов. Очищенный фермент был чувствителен к термической денатурации. При инкубации при 47 °C в присутствии этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), связывающей ионы металлов, он терял половину исходной активности ( $t^{1/2}$ ) менее чем за 5 мин. Добавление 25 мМ  $MgCl_2$  стабилизировало фермент, и 50 % активности сохранялось в течение 100 мин. Без добавления ЭДТА Qa-4 показал большую устойчивость к термической инактивации,  $t^{1/2} \sim 12$  мин, а в присутствии 25 мМ  $MgCl_2 \sim 220$  минут. Помимо  $Mg^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  и  $Co^{2+}$  активировали Qa-4, тогда как одновалентные катионы, такие как  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $NH_4^+$ , снижали его активность (Strøman, Reinert, Giles, 1978).

У *Aspergillus nidulans* также был обнаружен кластер генов утилизации хинной кислоты, включающий 8 генов, в том числе и *qutC*, кодирующий дегидрошикиматдегидратазу (Hawkins, Francisco Da Silva, Roberts, 1985). Сверхэкспрессия *QutC* в штамме *A. nidulans* вызывала ауксотрофию по ароматическим аминокислотам. Кластеры генов утилизации хинной кислоты у грибов *N. crassa* и *A. nidulans* включали также ген регулятора для индукции катаболических генов в присутствии необходимых субстратов.

Недавно в *E. coli* была экспрессирована, а затем функционально охарактеризована еще одна грибная DSD, EpDSD1 из *Eurpenicillium parvum* (Wei et al., 2022) (Таблица 1.1). Ее последовательность была идентична вышеописанным DSD из *N. crassa* и *A. nidulans* на 30 и 35 %, соответственно. Рекомбинантный белок проявлял максимальную активность DSD при температуре 40 °C и pH 7,5 (Таблица 1.1). Ион металла был так же необходим для её ферментативной активности.

Таблица 1.1 – Биохимические параметры DSD из грибов

Обозначение	Организм	A <sup>a</sup> , мкмоль/мин/мг;		Кофактор, <u>оптим.</u>	Источник
		K <sub>m</sub> , мкМ; k <sub>cat</sub> , мин <sup>-1</sup>	pH; T °C		
Qa-4	<i>N. crassa</i>	257; 590; –	7,5; 37	Mn <sup>2+</sup>	Strøman, Reinert, Giles, 1978
				Mo <sup>2+</sup>	
				Co <sup>2+</sup>	
				Ba <sup>2+</sup>	
				<u>Mg<sup>2+</sup></u>	
QutC	<i>A. nidulans</i>	261; 530; –	7,5; 37	Mg <sup>2+</sup>	Wheeler, Lamb, Hawkins, 1996
				Mn <sup>2+</sup>	
				Zn <sup>2+</sup>	
EpDSD1	<i>E. parvum</i>	0,89; (1,57 ± 0,07) × 10 <sup>3</sup> ; 116,24 ± 2,06	7,5; 40	Mn <sup>2+</sup>	Wei et al., 2022
				<u>Mg<sup>2+</sup></u>	

A<sup>a</sup> – специфическая активность.

### 1.3.2 Мембраносвязанные дегидрошикиматдегидратазы

В эту группу вошли катаболические ферменты, связанные с мембраной. Это, в первую очередь, DSD из *Acinetobacter* spp. и некоторых псевдомонад (Таблица 1.2). Ген DSD *quiC* в *Acinetobacter baylyi* ADP1 был частью оперона *quiBCXA*, который также содержал гены *quiB*, *quiX* и *quiA*, кодирующие дегидрохинатдегидратазу, порин внешней мембраны и хинат/шикиматдегидрогеназу, соответственно. *QuiC* был экспрессирован в *E. coli*, где тестировали активность DSD (Elsemore, Ornston, 1995).

Таблица 1.2 – Биохимические параметры мембраносвязанных DSD

Обозначение	Организм	A, мкмоль/мин/мг;	pH (оптим.);	Кофактор	Источник
		K <sub>m</sub> , мМ	T °C		
QuiC	<i>A. baylyi</i>	19,5;	8;	Mg <sup>2+</sup>	Elsemore, Ornston, 1995
	ADP1	–	комн. <sup>a</sup>		
DSD	<i>V. mungo</i>	0,2;	7,5 (7,4);		Tateoka, Yasuda, 1995
		–	25		
mDSD	<i>G. oxydans</i>	35,1;	6,5 (6 – 8);	не зависит	Shinagawa et al., 2010
	IFO3244	0,5	25		

<sup>a</sup> Точная темп. не указана.

Сообщалось также о мембраносвязанной DSD из бобовых *Vigna mungo* (Tateoka, Yasuda, 1995). Активность DSD тестировалась в клетках только при культивировании в присутствии шикимата. Фермент был частично очищен и охарактеризован (Таблица 1.2). Он обладал достаточно низкой специфической активностью (0,2 мкмоль/мин/мг), ингибировался ЭДТА и сульфгидрильными ингибиторами. Присутствие ионов Mg<sup>2+</sup> стабилизировало фермент, в том числе и при 47 °C.

Мембраносвязанная DSD была обнаружена в *Gluconobacter oxydans* IFO3244 (Shinagawa et al., 2010). Этот фермент не зависел от ионов металлов (Mg<sup>2+</sup>, Mo<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Ba<sup>2+</sup>), был стабилен в растворе в присутствии детергента и проявлял максимальную активность в большом диапазоне pH.

Мембраносвязанные ферменты не являются привлекательными для биотехнологии, как из-за их низкой активности, так и из-за сложностей с экспрессией белков, связанных с мембраной.

### 1.3.3 Бактериальные однодоменные дегидрошикиматдегидратазы

Бактериальные однодоменные ферменты называются так же AsbF-подобными дегидрошикиматдегидратазами по наиболее изученной



дегидрошикиматдегидратазе AsbF из *Bacillus anthracis* и *Bacillus thuringiensis*. Ферменты из этих видов бацилл имели 100 % гомологию последовательностей. Патогенные бациллы продуцировали два типа сидерофоров, в биосинтезе которых участвовали ферменты генетических кластеров *asbABCDEF* и *bacACBEF* (Cendrowski, MacArthur, Hanna, 2004). Оперон *bac* кодировал хорошо изученные ферменты, ответственные за биосинтез сидерофора бацилликсина, которые зависели от нерибосомальной пептидной синтетазы (NRPS). Бацилликсин содержал 2,3-катехолатные группы и продуцировался многими видами *Bacillus*. В свою очередь, оперон *asb* кодировал как NRPS-зависимые, так и NRPS-независимые ферменты, которые в итоге способствовали образованию уникального сидерофора из трех компонентов: цитрата, спермидина и 3,4-DHBA (Lee et al., 2007; Pflieger et al., 2007; Oves-Costales et al., 2007; Oves-Costales et al., 2008). Первоначально функции в сборке петробактина были определены для пяти из шести *asb*-кодируемых белков (Рисунок 1.2). Функция продукта гена *asbF* была установлена только в 2008 году (Koppisch et al., 2008). Биоинформационный анализ показал, что *asb*-кластер является консервативным, присутствует как в грамположительных, так и в грамотрицательных бактериях, выделяемых преимущественно из морских источников.

AsbF представлял собой белок с молекулярной массой ~ 35 кДа. Это была первая DSD, для которой была разрешена кристаллическая структура и построена 3D-модель (PDB: 3DX5) (Рисунок 1.3). Общая топология AsbF представляла собой  $\beta/\alpha_8$ -бочонок ( $(\beta/\alpha)_8$ -barrel) или TIM-баррель, конфигурацию, впервые описанную для триозофосфатизомеразы (Pflieger et al., 2008). В частности, ксилоизомераза (PDB: 5XIN) (Zhang et al. 2002) являлась ближайшим структурным гомологом AsbF. Анализ с помощью статического светорассеяния и эксклюзионной хроматографии выявил димерное состояние фермента в растворе (Pflieger et al., 2008).

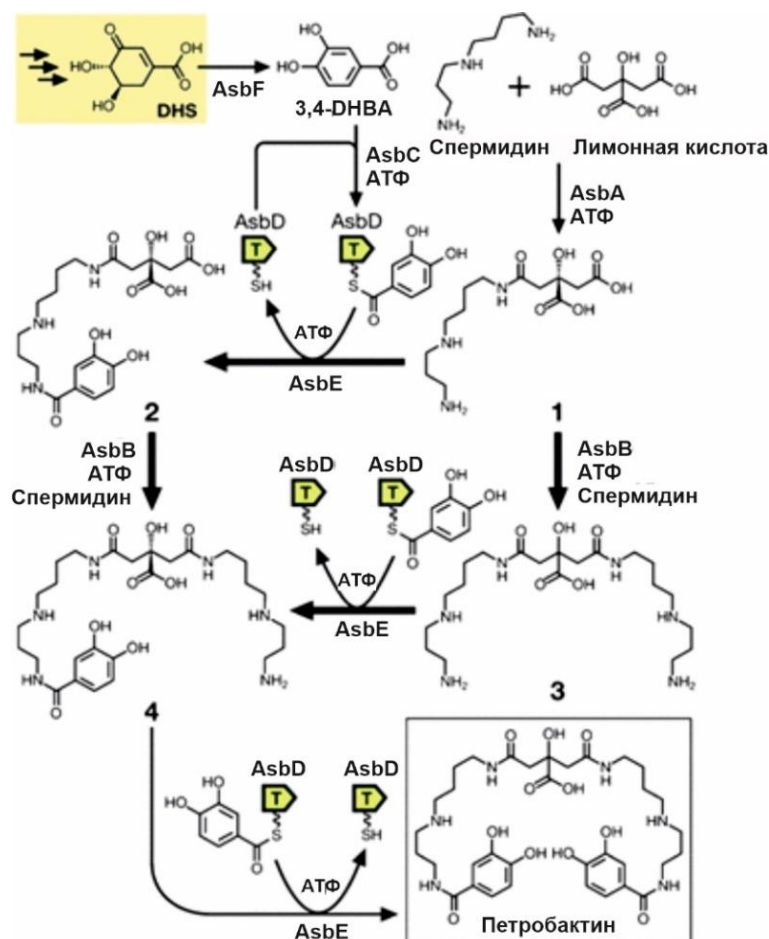


Рисунок 1.2 – Метаболический путь биосинтеза петробактина с помощью ферментов, кодируемых генами оперона *asbABCDEF* (из статьи Хотта с соавт., (2010))

3,4-DHBA была обнаружена в активном центре кристалла AsbF, окруженная несколькими остатками ароматических аминокислот, Phe255, Phe211, Phe104, Tyr217 и His144. 3,4-DHBA взаимодействовала непосредственно с гидроксильными группами Tyr70 и Tyr217, гуанидином Arg102, амином Lys200, имином His175, карбоксилем Glu253 и карбонилем основной цепи Phe211, в основном за счет водородных связей. Более того 3,4-DHBA была плотно закрыта спиральной петлей (остатки 206–224), расположенной между седьмым  $\beta$ -тяжем и седьмой  $\alpha$ -спиралью, и напрямую взаимодействовала с ионом  $Mn^{2+}$ .  $Mn^{2+}$  координировался карбоновыми кислотами боковых цепей Glu142, Asp172, Glu253 (оба атома кислорода), депротонированным имином His198 и 3-гидроксильной группой 3,4-DHBA. Ион марганца AsbF был связан с аминокислотными

остатками, которые могли вносить вклад в катализ, стабилизируя промежуточный лиганд и/или лиганд-продукт, отличный от других дегидратаз (Pfleger et al., 2008).

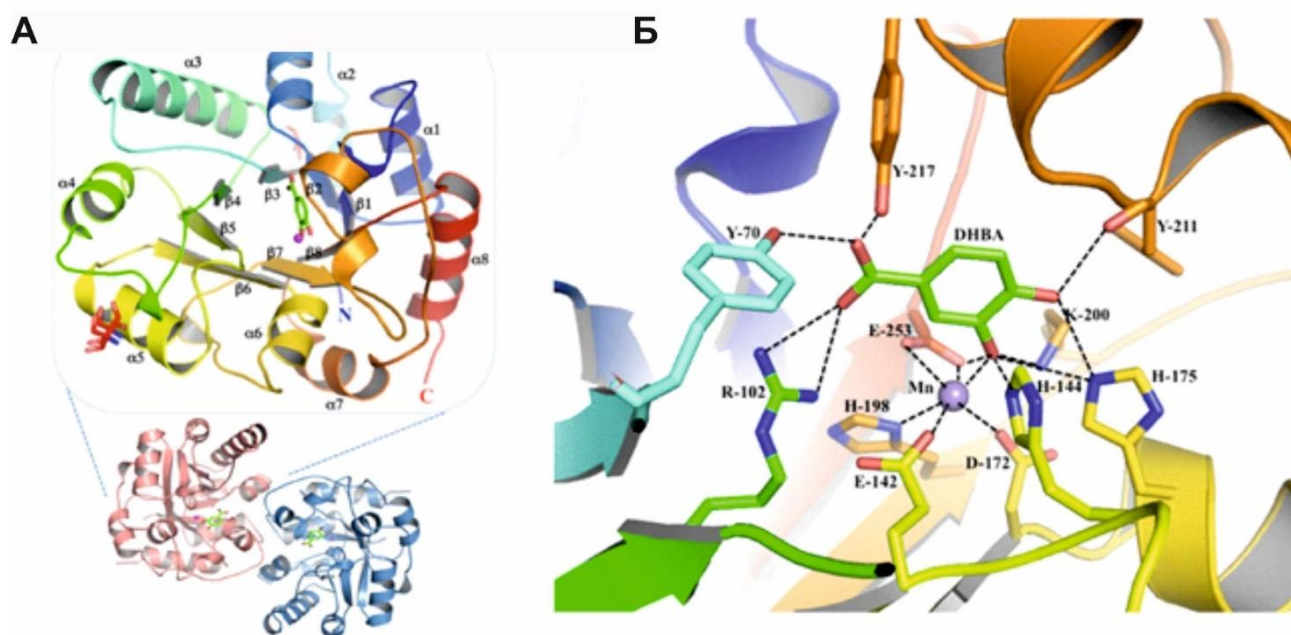


Рисунок 1.3 – Структура AsbF из *B. anthracis*

А. 3D-модель AsbF. Вверху: общий вид увеличенного мономера AsbF. Внизу: димер AsbF. Атом марганца показан фиолетовой сферой. Молекула 3,4-DHBA изображена зеленым.

Б. Активный центр AsbF, демонстрирующий 3,4-DHBA, взаимодействующую с боковыми цепями и координированный марганец. Все водородные связи показаны пунктирными линиями. Изображение заимствовано из статьи Флегера с соавт. (2008).

Кинетические параметры AsbF различались в зависимости от условий проведения реакции и источника белка (Таблица 1.3). При добавлении ЭДТА AsbF полностью утрачивал активность, большая часть которой восстанавливалась при инкубации с двухвалентными металлами (Fox et al., 2008). По данным разных групп исследователей предпочтительным кофактором был  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ .

AsbF был термолабильным ферментом, который терял половину активности в течение  $\sim 10$  мин при температуре  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Добавление ионов двухвалентных металлов стабилизировало фермент (Fox et al., 2008). С помощью комбинаторной библиотеки мутантов, содержащих замены в 18 позициях, предсказанных на основании структурного анализа, удалось отобрать термостабильный мутант  $AsbF^{Mut1}$ , содержащий замены T61N, H135Y и H257P (Harrington et al., 2017). По

сравнению с нативным AsbF<sup>WT</sup> ( $t_{1/2}^{37\text{ °C, WT}} \sim 15$  мин) он был более термостабилен уже при 37 °C ( $t_{1/2}^{37\text{ °C, Mut1}} \sim 170$  мин).

Таблица 1.3 – Биохимические параметры AsbF

Организм	$K_m$ , мкМ $K_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	pH (оптим.); Т °С	Кофактор, <u>оптим.</u>	Источник
<i>B. anthracis</i>	288,7 ± 38,9	7,5;	Co <sup>2+</sup>	Pfleger et al., 2008
	79,84 ± 0,96	комн.	Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> <u>Mn<sup>2+</sup></u>	
<i>B. thuringiensis</i> 97-27	2,2 ± 0,4	8,6;	Mg <sup>2+</sup> <u>Mn<sup>2+</sup></u>	Harrington et al., 2017
	130 ± 3	37		
	4,6 ± 1,4	8,6;	Mn <sup>2+</sup> Co <sup>2+</sup> Ni <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup> <u>Mg<sup>2+</sup></u>	Fox et al., 2008
	29 ± 2	20		
	125 ± 14	8,6 (8,4 – 8,8);		
	217 ± 10	37		
98 ± 11	8,6 (8,4 – 8,8);			
153 ± 7	30			

#### 1.3.4 Бактериальные двудоменные дегидрошикиматдегидратазы

Наиболее охарактеризованным ферментом этого класса DSD на момент начала наших исследований являлся фермент из грамтрицательной почвенной бактерии *Ps. putida*, кодируемый геном *quiC1* (Jimenez et al., 2002). Белок QuiC1 состоял из 635 аминокислот, а последовательность его N-концевого домена была на 25 и 15 % идентична DSD из грибов и AsbF, соответственно. С-концевая часть QuiC1, отсутствующая в других вариантах DSD, имела 30 % идентичности с последовательностью 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы из *Pseudomonas*

*fluorescens* (HPPD), ферментом, катализирующим превращение 4-гидроксифенилпирувата в гомогентизат при деградации тирозина (Moran, 2014).

Кристаллическая структура QuiC1 была разрешена (PDB: 5HMQ) (Рисунок 1.4). Асимметричная единица включала шесть протомеров QuiC1, расположенных в виде трех димеров. Димеризация QuiC1 подтверждалась с помощью эксклюзионной хроматографии. В каждом димере N-концевой домен был ассоциирован главным образом с C-концевым доменом соседней молекулы. N-концевой домен состоял из 275 аминокислот, которые формировали ТИМ-баррель. C-концевой домен QuiC1 (C-QuiC1) состоял из 325 остатков, принимающих ВОС-укладку (Vicinal Oxygen Chelate – хелаторы вицинального кислорода), имеющей значительное структурное сходство с HPPD *Ps. fluorescens* (PDB: 1CJX). N- и C-концевые домены QuiC1 были соединены линкером из 20 аминокислот, который был крайне вариабельным у ортологов QuiC1. В частности, линкер QuiC1 включал пять остатков пролина, в том числе три последовательных (Pro287 – Pro289), предположительно для обеспечения структурной жесткости и возможной стабилизации взаимодействия между N- и C-QuiC1 (Peek et al., 2017). Очищенные QuiC1 и его N-концевой домен N-QuiC1, наработанные в клетках *E. coli*, имели активности DSD (Таблица 1.4). Сродство обоих белков к DHS было одного порядка и значительно хуже, чем для AsbF. Скорости образования продукта реакции на порядки превышали скорость AsbF. QuiC1 был более активен, чем N-QuiC1. При этом экспрессия N-QuiC из *Ps. putida* восстанавливала рост штамма *Ps. aeruginosa* с делетированным геном *quiC1* на квинате и шикимате, в качестве источника углерода. Однако рост такого штамма был замедлен по сравнению с исходным вариантом. Это отставание нивелировалось при выращивании клеток на среде, содержащей шикимат с добавлением 3,4-ДНВА. Было высказано предположение, что C-концевой домен необходим для максимальной активности QuiC1 *in vivo* (Peek et al., 2017).

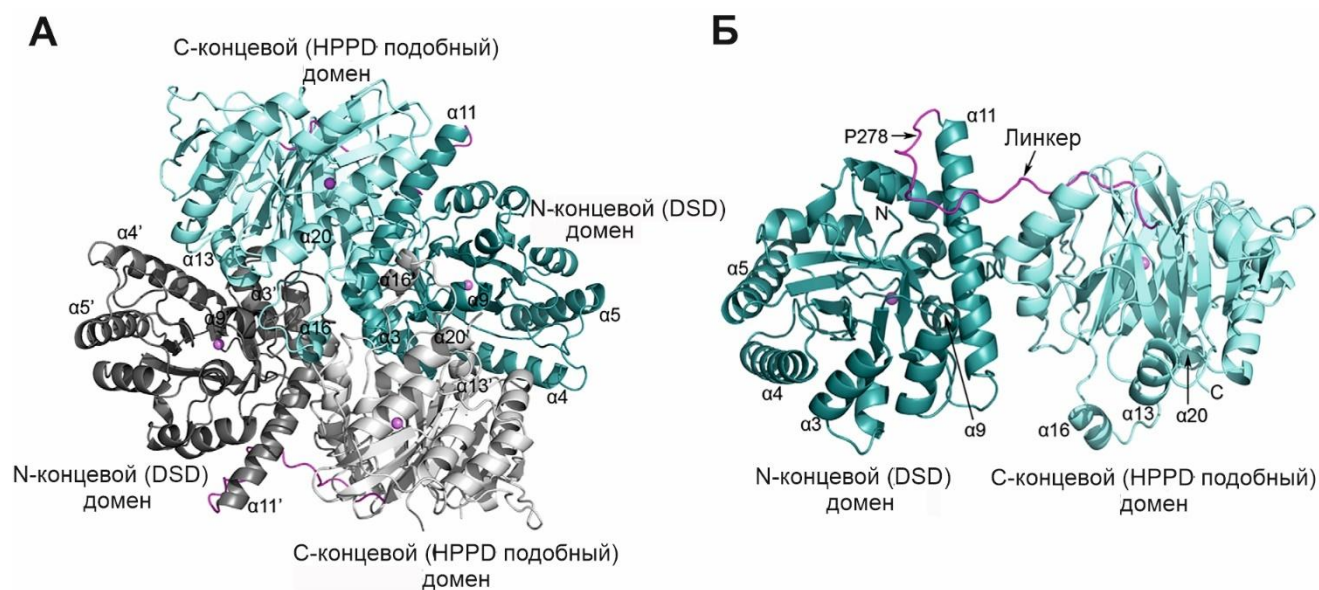


Рисунок 1.4 Кристаллическая структура QuiC1 из *Ps. putida*

А. Димер QuiC1. Б. Протомер QuiC1. N- и C-концевые домены одной молекулы показаны темно- и светло-бирюзовым цветом, соответственно, (темно- и светло-серый – для второй молекулы). Ионы металла показаны в виде розовых сфер. Изображение заимствовано из статьи Пика с соавт. (2017).

Как и в случае других охарактеризованных DSD, QuiC1 ингибировался ЭДТА и активировался различными двухвалентными металлами,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Максимальная активность QuiC1 и N-QuiC1, указанная в Таблице 1.4, наблюдалась в присутствии  $\text{Co}^{2+}$ .

Таблица 1.4 – Биохимические параметры QuiC1

Вариант QuiC1	$K_m$ ; мкМ $k_{cat}$ ; с <sup>-1</sup>	pH; Т °С	Кофактор, <u>оптим.</u>	Источник
QuiC1	331 ± 51	7,5; 25	$\text{Ni}^{2+}$	Peek et al., 2017
	163,6 ± 8,5		$\text{Mn}^{2+}$	
N-QuiC1	205 ± 30 61,2 ± 2,5		$\text{Mg}^{2+}$ <u><math>\text{Co}^{2+}</math></u>	



Активный сайт QuiC1 был предсказан по наложению структур N-WhoC1 и AsbF (Рисунок 1.5). Он образован аминокислотными остатками: Arg64, Leu97, Glu134, Leu136, His168, Asp165, Gln191, Ser206, Arg207, Arg210 и Glu239.

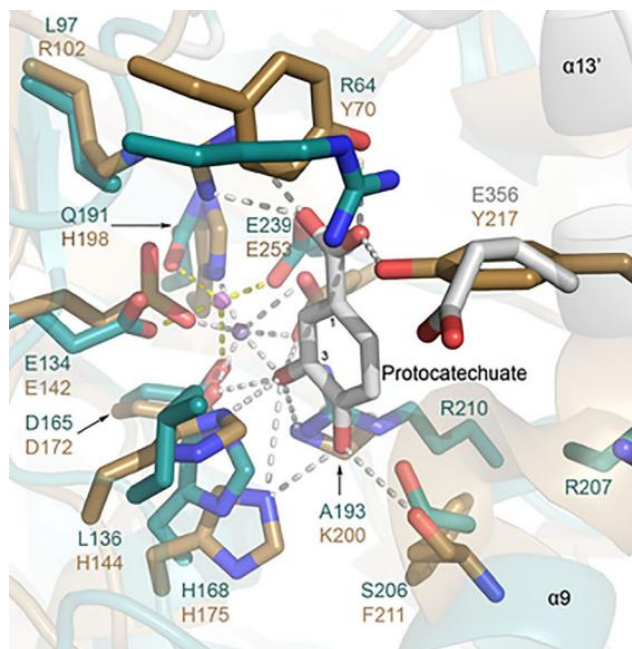


Рисунок 1.5 – Наложение активных сайтов N-WhoC1 (бирюзовый) и AsbF (коричневый) в комплексе с 3,4-DHBA (серый)

Ионы Mg в WhoC1 и Mn в AsbF показаны в виде розовой и фиолетовой сфер. Изображение заимствовано из статьи Пика с соавт. (2017).

Мутации в остатках Ser206, Arg207 значительно повышали  $K_m$ , не сильно влияя на скорость реакции, что доказывало их участие в связывании субстрата. Мутация His168 значительно снижала скорость реакции, не влияя на  $K_m$ . Мутация Arg210 прекращала реакцию, предположительно, изменяя третичную структуру белка (Peek et al., 2017).

Предсказанный по аналогии с HPPD из *Ps. fluorescens* активный центр С-концевого домена был сосредоточен вокруг иона двухвалентного железа, координированного эквивалентными аминокислотными остатками, His443, His521, Glu599. Эти остатки являлись консервативными для большинства двудоменных DSD. Пик с соавт. (2017) впервые высказали предположение о

наличии у QuiC1 диоксигеназной активности по отношению к 3,4-DHBA, которую авторам обнаружить не удалось.

#### 1.3.4.1 Дегидрошикиматдегидратаза QsuB из *C. glutamicum*

*C. glutamicum* утилизирует хинат и шикимат в качестве источников углерода. Соответствующий оперон *qsuABCD*, кодирующий необходимые для этого ферменты, был описан (Рисунок 1.6) (Teramoto, Inui, Yukawa, 2009). Этот оперон включал четыре гена. Ген *qsuA* кодировал белок, идентичный на 40 % транспортеру шикимата *E. coli* (Whipp, Camakarlis, Pittard, 1998), принадлежащему к суперсемейству MFS (Major Facilitator Superfamily – основное суперсемейство переносчиков). Ген *qsuB*, кодировал двудоменную DSD, гомологичную QuiC1 (40 % идент. остатков) (Peek et al., 2017). Ген *qsuC* кодировал дегидрохинатдегидратазу, а *qsuD* – хинат/шикиматдегидрогеназу (Teramoto, Inui, Yukawa, 2009; Kubota et al., 2014).

У *C. glutamicum* отсутствует катаболитная репрессия, поэтому потребление глюкозы и других источников углерода, в том числе и шикимата, происходит одновременно в процессе роста. Это свойство отличало *C. glutamicum* от многих других микроорганизмов, у которых экспрессия генов утилизации хината/шикимата контролируется катаболитной репрессией (Dal, Steiner, Gerischer, 2002; Giles et al., 1985; Grant et al., 1988; Hawkins et al., 1993; Siehler et al., 2007).

Экспрессия *qsuABCD* индуцировалась в присутствии хината и, в большей степени, шикимата (Teramoto, Inui, Yukawa, 2009; Kubota et al., 2014). Оба субстрата связываются с активатором оперона QsuR. Ген *qsuR*, расположенный в обратной ориентации перед опероном, кодирует транскрипционный регулятор типа LysR (LTTR). Обычно LTTR-регуляторы взаимодействуют с небольшими эффекторными молекулами, как правило, тесно связанными с функцией регулируемых генов (Schell, 1993; Maddocks, Oyston, 2008). QsuR в растворе представлял собой гомотетрамер, вероятно, состоявший из димера димеров. Было



показано, QsuR узнаёт консенсусный мотив TAT-N<sub>11</sub>-ATA и специфически связывается с промоторной областью *qsuA*. Штамм *C. glutamicum*, у которого был нарушен ген *qsuR*, плохо рос на минимальной среде с шикиматом в качестве источника углерода.



Рисунок 1.6 – Схема локуса *qsu* *C. glutamicum*, включающего оперон *qsuABCD* (синий) и ген его активатора *qsuR* (лиловый)

3,4-DHBA был промежуточным продуктом деградации, который далее расщеплялся ферментами, кодируемыми *psa* опероном, а затем ферментами  $\beta$ -кетoadипатного пути до метаболитов цикла трикарбоновых кислот, сукцинил-КоА и ацетил-КоА (Kitade, Hiraga, 2020; Shen, Zhou, Liu, 2012; Shen, Liu, 2005) (Рисунок 1.7).

Пути деградации хината/шикимата пересекаются с биосинтезом шикимата в *C. glutamicum* (Рисунок 1.7). В частности, дегидрохинатдегидратаза QsuC участвует как в деградации хината, так и в биосинтезе шикимата, интермедиата общего ароматического пути. Помимо гена *qsuD* *C. glutamicum* имеет ещё два гена шикиматдегидрогеназ (Kubota et al., 2013). Биосинтетические ферменты, в отличие от катаболической QsuD, зависимой от NAD, являются NADPH-зависимыми.

До нашей работы (Shmonova et al., 2020, 2022) QsuB специально не исследовался. Что касается применения этого фермента, то, помимо его использования в продуценте 3,4-DHBA на основе *C. glutamicum* (см. п. 1.2.1), было показано, что рекомбинантная экспрессия QsuB в *Arabidopsis thaliana* нарушала синтез лигнина и тем самым усиливала осахаривание биомассы (Eudes et al., 2015).

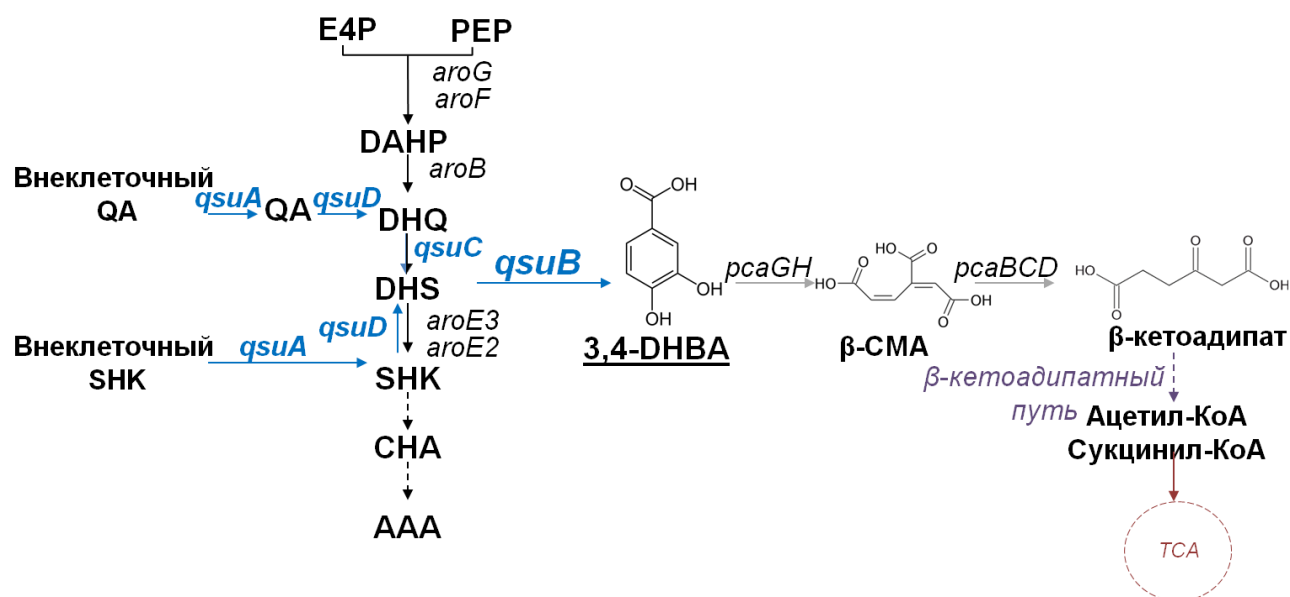


Рисунок 1.7 – Биосинтез шикимата и деградация хината/шикимата в *C. glutamicum*. Около стрелок реакций указаны гены *C. glutamicum*. Путь катаболизма шикимата/хината показан синими стрелками. *qsuA* кодирует пермеазу; *qsuB* – DSD; *qsuC* – 3-дегидрохинатдегидратазу; *qsuD* – хинат/шикиматдегидрогеназу. Гены пути деградации 3,4-DHBA кодируют: протокатехат-3,4-диоксигеназу (*pcaGH*), 3-карбоксит-3,4-диоксигеназу (*pcaBCD*). DHQ – 3-дегидрохинная кислота; QA – хинная кислота.

### 1.3.5 QuiC2-подобные дегидрошикиматдегидратазы

Многие виды *Listeria*, включая *L. monocytogenes*, способны преобразовывать шикимат и хинат в 3,4-DHBA. Были идентифицированы опероны *qui1* и *qui2* кодирующие ферменты этого пути, но не все белковые продукты этих генов функционально охарактеризованы. Одним из сравнительно недавно охарактеризованных белков является DSD, кодируемая геном *quiC2*, находящимся в составе оперона *qui2* (Хуе, Prezioso, Christendat, 2020).

QuiC2 катализировал превращение DHS в 3,4-DHBA (Таблица 1.5), имея более низкое сродство к DHS, чем QuiC1 и грибные ферменты, но более высокую скорость реакции (см. для сравнения Таблицы 1.1 и 1.4). Отличительной особенностью QuiC2 является предпочтительный кофактор  $Ni^{2+}$ .

QuiC2 имеет молекулярную массу около 67,2 кДа и состоит из 284 аминокислотных остатков. Кристаллическая структура QuiC2 была разрешена

(Рисунок 1.8). Мономер QuiC2 имел характерную TIM-баррель укладку (Хуе, Prezioso, Christendat, 2020).

Таблица 1.5 – Биохимические параметры QuiC2

Обозначение	Организм	$K_m$ , мкМ; $k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	pH; Т °С	Кофактор	Источник
QuiC2	<i>L. monocytogenes</i>	1210 ± 263	8;	Mg <sup>2+</sup>	Хуе, Prezioso,
		867 ± 64	25	<u>Ni<sup>2+</sup></u>	Christendat, 2020

Активный центр QuiC2, установленный с помощью наложения структур AsbF и QuiC1 состоял из следующих аминокислотных остатков: Thr79, Asn111, Glu142, Met144, Asp172, His175, Gln198, Cys200, Ser214, Arg218 и Glu248. Согласно множественному выравниванию последовательностей, семь из них (подчеркнуты выше) были консервативны в двудоменных и в грибных ферментах, тогда как только четыре остатка, Glu142, Asp172, His175 и Glu248 присутствовали в AsbF-подобных вариантах (Хуе, Prezioso, Christendat, 2020).

Остатки Glu142, Asp172, Gln198, Glu248, а также две молекулы воды координировали ион Mg в QuiC2.

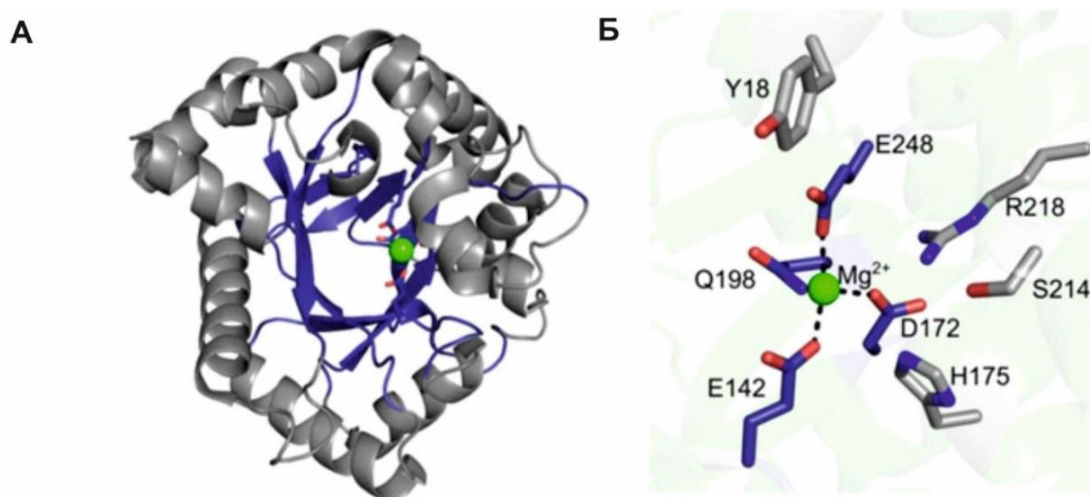


Рисунок 1.8 – 3D-модель мономера QuiC2 (PDB ID: 2G0W) (А) и структура его активного центра (Б)

Изображение заимствовано из Хуе, Prezioso, Christendat, 2020.

На основании филогенетического анализа, QuiC2-подобные ферменты были выделены в отдельный класс DSD. Принадлежность этих ферментов к новому филогенетическому кластеру согласуется с тем фактом, что они могут функционировать в биологическом процессе, отличном от процессов, в которых участвуют DSD других классов.

Действительно, в отличие от других почвенных микроорганизмов у *Listeria* spp. отсутствуют, как  $\beta$ -кетoadипатный путь, необходимый для катаболизма 3,4-DHBA в TCA, так и способность синтезировать петробактин (Prezioso et al., 2018). Известно, что *Listeria* использует сидерофоры других микроорганизмов для транспорта железа из окружающей среды (Simon et al., 1995). В свою очередь другие микроорганизмы, например *Bacillus* spp., способны легко поглощать экскретируемую из *Listeria* spp. 3,4-DHBA и использовать ее для синтеза сидерофора. Предполагается, что синтез 3,4-DHBA с помощью QuiC2 необходим для обеспечения кооперации бактерий в микробных сообществах.

Бактерии вида *Listeria* относятся к патогенам, которые выделяют из продуктов питания, поэтому ферменты из таких организмов могут иметь ограниченное применение.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Химические вещества и ферменты

Химические вещества, если не указано иное, были поставлены «Химмед» (Россия), «Диа-М» (Россия), «Реахим» (Россия).

Основными поставщиками ферментов, а также готовых комплектов для молекулярно биологических манипуляций являлись «Евроген» (Россия), Sigma-Aldrich (США), Thermo Scientific (США).

### 2.2 Бактериальные штаммы и плазмиды

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе представлены в Таблицах 2.1 и 2.2, соответственно.

Таблица 2.1 – Штаммы, использованные в работе

Штамм	Описание	Источник
<i>E. coli</i>		
MG1655	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>ilvG</i> <sup>-</sup> , <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1	ВКПМ <sup>a</sup> B6195
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdSB</i> ( <i>rB</i> <sup>-</sup> <i>mB</i> <sup>-</sup> ), λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]), [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )	Novagen (Merck Millipore, Германия)
BW25141	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , Δ( <i>araB-araD</i> )567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB3</i> ), Δ( <i>phoB-phoR</i> )580, <i>galU95</i> , Δ <i>uidA3</i> :: <i>pir</i> <sup>+</sup> , <i>recA1</i> , Δ <i>endA9</i> ::FRT, <i>rph</i> -1, Δ( <i>rhaB-rhaD</i> )568, <i>hsdR514</i>	Wanner B.L.
MG1655Δ <i>aroE</i>	Δ <i>aroE</i> ::λ <i>attB</i>	
MG1655Δ <i>aroE</i> P <sub><i>lacUV5-qsuB</i></sub>	Интеграции генов DSD в сайт φ80 <i>attB</i> , локализованный на хромосоме MG1655, получены методом «Dual In/Out» (Minaeva et al., 2008)	Данная работа
MG1655Δ <i>aroE</i> P <sub><i>lacUV5-asbF</i></sub>		
MG1655Δ <i>aroE</i> P <sub><i>lacUV5-qa-4</i></sub>		
MG1655Δ <i>aroE</i> P <sub><i>lacUV5-n-qsuB</i></sub>		
<i>C. glutamicum</i>		
AJ1511	ATCC13869, несодержащий плазмиду pAM330	Коллекция АО «АГРИ»
K118	AJ1511Δ <i>aroE</i> Δ <i>prcA</i> HG	Данная работа

<sup>a</sup> ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

Таблица 2.2 – Плазмиды, использованные в работе

Плазмида	Описание/ Применение	Источник
pAH162- $\lambda attL$ -Tet <sup>R</sup> - $\lambda attR$	oriR $\gamma$ , $\phi 80$ - $attP$ , $\lambda attL$ - $tetA$ - $tetR$ - $\lambda attR$ , Tet <sup>R</sup> / интеграционный вектор для метода “Dual In/Out”	Минаева Н.И. (АО «АГРИ»)
pKD46	oriR101, repA101ts, <i>araC</i> , P <sub>araB</sub> -[ $\gamma$ , $\beta$ , $\epsilon$ of phage $\lambda$ ], Ap <sup>R</sup> / хелперная плазмида для $\lambda$ Red-опосредованной интеграции	Datsenko, Wanner, 2000
pMW118- $\lambda attL$ - <i>cat</i> - $\lambda attR$	oriR101, repA, MCS, Ap <sup>R</sup> , $\lambda attR$ - <i>cat</i> - $\lambda attL$ , Cm <sup>R</sup> / матрица для амплификации маркера устойчивости к хлорамфениколу	Каташкина Ж.И. (АО «АГРИ»)
pELAC	Матрица для амплификации промотора P <sub>lacUV5</sub> , Ap <sup>R</sup>	Smirnov et al., 2010
pAH123	oriR101, repA101ts, $\lambda cIts857$ , $\phi 80int$ , Ap <sup>R</sup> / хелперная плазмида, для метода “Dual In/Out”	Минаева Н.И. (АО «АГРИ»)
pMW- <i>int-xis</i>	oriR101, repA101ts, $\lambda cIts857$ , $\lambda P_R \rightarrow \lambda xis-int$ , Ap <sup>R</sup> / хелперная плазмида для удаления маркера	Каташкина Ж.И. (АО «АГРИ»)
pET22b	pMB1ori, f1ori, T7 promoter, Ap <sup>R</sup> / вектор для экспрессии белков	Novagen (Merck Millipore, Германия)
pET22b- <i>qsuB</i>		
pET22b- <i>n-qsuB</i>	pET22b + гены DSD Ap <sup>R</sup> / плазмиды, использованные для	
pET22b- <i>asbF</i>	продукции DSD с гексагистидиновой меткой (His-tag)	
pET22b- <i>qa-4</i>		
pET22b- <i>qsuB</i> *	pET22b + гены DSD Ap <sup>R</sup> / плазмиды, использованные для	Данная работа
pET22b- <i>n-qsuB</i> *	продукции DSD без His-tag	
pAH162- $\lambda attL$ -Tet <sup>R</sup> - $\lambda attR$ -P <sub>lacUV5</sub> - <i>qsuB</i>		
pAH162- $\lambda attL$ -Tet <sup>R</sup> - $\lambda attR$ -P <sub>lacUV5</sub> - <i>asbF</i>	Интеграционные плазмиды, содержащие модификации P <sub>lacUV5</sub> -DSD, Tet <sup>R</sup>	
pAH162- $\lambda attL$ -Tet <sup>R</sup> - $\lambda attR$ -P <sub>lacUV5</sub> - <i>qa-4</i>		

Продолжение Таблицы 2.2

Плазмида	Описание	Источник
pVC-Apr <sup>R</sup> -lacI - P <sub>trc-id2</sub> -recE <sup>564T</sup>	Хелперная плазмида для RecET-опосредованной рекомбинации в <i>C. glutamicum</i> : pBL1 ori, pMB1 ori, recE <sup>564T</sup> , Apr <sup>R</sup>	Лобанова Ю.С. (АО «АГРИ»)
p06-P <sub>dapA</sub> cre	Хелперная плазмида для Cre - опосредованной элиминации маркера в <i>C. glutamicum</i> : укороченный нестабильный вариант pCG1 ori, pMB1 ori, P <sub>dapA</sub> - cre, Gm <sup>R</sup>	Горшкова Н.В. (АО «АГРИ»)
pVK9	Вектор для экспрессии DSD в <i>C. glutamicum</i> : <i>C. glutamicum</i> rep pCG1, <i>E. coli</i> rep ColE1, Km <sup>R</sup>	Nakamura, Hirano, Ito, 2006
pVK9-lacI	Плазмида, содержащая ген лактозного репрессора LacI, Km <sup>R</sup>	Лабораторная коллекция
pVK9-lacI- P <sub>trc-id2</sub> -asbF	Плазмиды, содержащие гены различных DSD под контролем изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) индуцибельного промотора P <sub>trc-id2</sub> и ген лактозного репрессора LacI, Km <sup>R</sup>	Данная работа
pVK9-lacI- P <sub>trc-id2</sub> -qa-4		
pVK9-lacI- P <sub>trc-id2</sub> -qsuB		
pVS7	Вектор для экспрессии AroG4 в <i>C. glutamicum</i> : repB11, Spe <sup>R</sup>	Nishio et al., 2013
pVS7-aroG4	Плазмида, содержащая ген ДАНР-синтазы AroG4, устойчивой к ингибированию AAA, Spe <sup>R</sup>	Лабораторная коллекция

### 2.3 Олигонуклеотиды

Химический синтез олигонуклеотидов, использованных в работе в качестве праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Таблица 2.3), был осуществлен в компании «Евроген» (Россия). Дизайн олигонуклеотидов проводили помощью программного обеспечения «VectorNTI Advance 10.0».







## 2.4 Среда и условия культивирования

### 2.3.1 Культивирование на лабораторных средах

Для культивирования *E.coli* использовали среды LB (10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl) и SOB (20 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 0,5 г/л NaCl, 0,186 г/л KCl, 450,95 г/л MgCl<sub>2</sub>; pH 7,0). Для культивирования *C. glutamicum* использовали готовую среду ВНІ (Sigma-Aldrich, США). При приготовлении соответствующих плотных сред добавляли агар до концентрации 20 г/л. Штаммы *E. coli* и *C. glutamicum* выращивали при 37 °С и 30 °С, соответственно. Штаммы *E. coli*, содержащие плазмиды с термочувствительным *repA101ts* репликоном, культивировали при 30 °С.

Культивирование в жидкой среде, проводили с перемешиванием 240 об/мин в пробирках 13 × 150 мм (не более 3 мл среды) или 18 × 200 мм (не более 10 мл среды).

Антибиотики для *E. coli* использовали в следующих концентрациях (мг/л): ампициллин (Ap) – 200, хлорамфеникол (Cm) – 20, тетрациклин (Tet) – 12,5.

Антибиотики для *C. glutamicum* добавляли по необходимости в концентрациях (мг/л): апрамицин (Apr) – 30, канамицин (Km) – 25, спектиномицин (Spe) – 50, гентамицин (Gm) – 1,5.

ИПТГ добавляли до конечной концентрации 1 мМ. Для индукции синтеза рекомбиназы с плазмиды pKD46 добавляли 10 мМ L-арабинозу.

Для элиминирования хелперных термочувствительных плазмид проводили рассевы клеток на агаризованной LB при 42 °С.

### 2.3.2 Проведение ферментаций

Ферментации штаммов *E.coli* и *C. glutamicum* проводили в пробирках (18 мм × 200 мм), содержащих 2 мл среды. В пробирки с ферментационной средой вносили 0,2 мл посевной культуры. Для приготовления посевной культуры одну

петлю (3 мм) клеток со свежей чашки вносили в пробирку (13 мм × 150 мм), содержащую 3 мл среды для получения посевных (см. ниже).

Ферментационная среда для *E. coli* содержала: 40 г/л глюкозы, 60 г/л CaCO<sub>3</sub>, 10 г/л триптона, 10 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 г/л MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 5 мг/л FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 10 мг/л тиамин и по 5 мг/л 4-НВА, pABA, 2,3-DHBA (pH 7,0). Посевные выращивали в LB при 34 °C с аэрацией (240 об/мин) в течение 3 ч. Ферментацию проводили при 34 °C и 240 об/мин в течение 44 часов.

Для ферментации штаммов *C. glutamicum* (30 °C, 240 об/мин) использовали следующую среду: 50 г/л глюкозы, 0,4 г/л MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 60 г/л CaCO<sub>3</sub> (Kozakai Seiyaku Co. Ltd., Япония), 5 г/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мг/л FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 10 мг/л MnSO<sub>4</sub> × 4H<sub>2</sub>O, 7,2 мг/л ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0,75 г/л гидролизата соевого шрота (Ajinomoto, Япония), 120 мкг/л биотин, 120 мкг/л тиамин, 0,02 г/л pABA и по 1 г/л L-Phe, L-Tyr, L-Trp (pH 7,0). Посевные подращивали в течение 18 ч при 30 °C и 200 об/мин в среде: 5 г/л глюкозы, 10 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 г/л MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0,01 г/л FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0,01 г/л MnSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O, 3 г/л мочевины, 10 мкг/л биотин (pH 7,5). Культивирование проводили до полного потребления глюкозы.

pH всех сред довели с помощью 10M KOH, а для его поддержания в течение ферментации в состав среды входил мел (CaCO<sub>3</sub>). Потребление глюкозы определяли с помощью тест-полосок Глюкофан (Чехия). Остаточную глюкозу (ОГ) измеряли с помощью глюкометра BIOSEN C\_line (EKF - diagnostic GmbH, Германия) согласно инструкции производителя. Для определения ОП культуральный бульон разбавляли в 100 раз 0,1M HCl для растворения мела и анализировали с помощью фотоэлектрического фотометра КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия). Концентрацию продукта определяли с помощью ВЭЖХ.

## 2.4 Манипуляции с ДНК

Манипуляции с ДНК проводили по стандартным методикам (Sambrook, Russel, 2001) и согласно рекомендациям производителей ферментов (GBM, Россия и Thermo Scientific, США). Определение концентрации и анализ ДНК с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле проводили согласно руководству (Маниатис, Фрич, Сэмбрук, 1984). Плазмидную и хромосомную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) и PurElute Bacterial Genomic (Edge BioSystems, США), соответственно. Для очистки ДНК после ПЦР использовали коммерческий набор (Евроген, Россия).

Синтез ДНК оптимизированных для *E. coli* генов *asbF* и *qa-4* осуществлялся в «АТГ Сервис Ген» (Санкт-Петербург, Россия).

ПЦР проводили с Taq ДНК-полимеразой (GBM, Россия). Для амплификации фрагментов ДНК более 3 т.п.н., а также для конструирования плазмид использовали ДНК-полимеразу Phusion<sup>®</sup> (Thermo Scientific, США).

Структуры плазмид и генетические модификации хромосом *E. coli* и *S. glutamicum* были подтверждены секвенированием (Евроген, Россия).

### 2.4.1 ДНК-фрагменты для получения делеций в хромосоме

Фрагмент ДНК  $\lambda attL-cat-\lambda attR$  для интеграции вместо делетируемой области в хромосоме *E. coli* получали с помощью ПЦР и плазмидной ДНК pMW118- $\lambda attL-cat-\lambda attR$  в качестве матрицы. Для делетирования гена *E. coli aroE* и 3'- части *qsuB* в модификации  $P_{lacUV5}-qsuB_{\phi 80attB}$ , интегрированной в хромосому *E. coli*, такой фрагмент амплифицировали с помощью пар праймеров P1/P2 и P3/P4, соответственно. После удаления маркера в хромосоме оставался  $\lambda attB$ . Праймеры, были спланированы таким образом, чтобы после удаления маркера сохранялась рамка считывания.

Для удаления генов *aroE3* (Cg11629) и *pcaHG* в хромосоме *S. glutamicum* получали фрагменты ДНК  $lox71^*-cat-lox66^*$ , фланкированные областями гомологии к хромосоме ~ 700 – 800 п.н. Внутренний фрагмент  $lox71^*-cat-lox66^*$  в

обоих случаях был получен с использованием праймеров P7/P8 и плазмиды pMW118- $\lambda$ attL-cat- $\lambda$ attR, в качестве матрицы. lox71\*/66\* – мутантные сайты lox, исключают образование делеций при последующем введении в хромосому одинаковых маркеров. Области гомологии, фланкирующие делецию *aroE3*, получали с помощью праймеров P5/P9 и P10/P6, а области гомологии для делеции *pcaHG* – P11/P13 и P14/P12. В качестве матрицы использовалась хромосомная ДНК штамма AJ1511. Финальные фрагменты ДНК получали с помощью перекрывающейся ПЦР трёх фрагментов и соответствующих праймеров для  $\Delta$ *aroE3* (P5/P6) и  $\Delta$ *pcaHG* (P11/P12).

#### 2.4.2 Конструирование плазмид с использованием ДНК-полимеразы

Для получения большинства рекомбинантных плазмид использовали CPES (Circular Polymerase Extension Cloning) или «клонирование с помощью кругового полимеразного удлинения» (Quan, Tian, 2009). Для осуществления такого клонирования первоначально с помощью ПЦР получали фрагменты ДНК вектора и вставки, имеющие области гомологии ~ 20 – 30 п.н. на обоих концах. Далее с помощью ПЦР (15 циклов) «собирали» плазмиду. Смесь для такой реакции, помимо общих компонентов (буфера, нуклеотидов, полимеразы) содержала предварительно очищенные фрагменты ДНК вектора и вставки в эквимольных количествах и не содержала праймеров. После денатурации и отжига концы вставки и вектора гибридизовались и амплифицировались на матрицах друг друга. После полного цикла ПЦР должна была синтезироваться круговая ДНК плазмиды с одиночными разрывами в каждой цепи (Рисунок 2.1). Эти разрывы репарировались *in vivo* после введения такой ДНК в клетки бактерий.

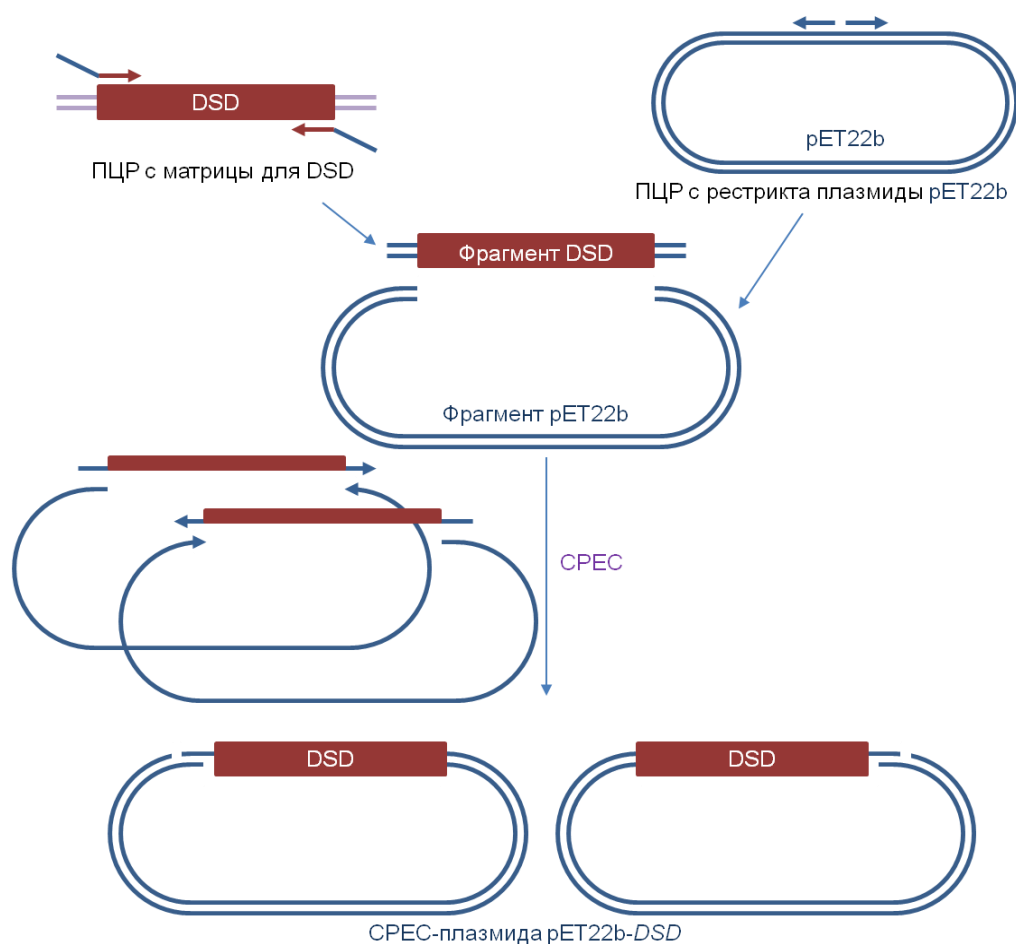


Рисунок 2.1 – Схема получения CPEC-плазмид

Для получения плазмид *pET22b-DSD* (Рисунок 2.2) фрагмент ДНК вектора амплифицировали с праймеров P15/P16 и рестрикта плазмиды *pET22b* по сайту *NotI* в качестве матрицы. Фрагменты ДНК *qsuB* и *n-qsuB* амплифицировали с использованием хромосомной ДНК штамма AJ1511 в качестве матрицы и праймеров P17/P18 и P17/P19, соответственно. Фрагменты ДНК *asbF* и *qa-4* амплифицировали с их синтетических матриц и праймеров P20/P21 и P22/P23, соответственно.

Для получения плазмид *pET22b-qsuB\** и *pET22b-n-qsuB\** фрагмент ДНК вектора амплифицировали с праймеров P15/P44 и рестрикта плазмиды *pET22b* по сайту *NotI* в качестве матрицы. Фрагменты ДНК *qsuB\** и *n-qsuB\** амплифицировали с использованием хромосомной ДНК штамма AJ1511 в качестве матрицы и праймеров P17/P42 и P17/P43, соответственно.

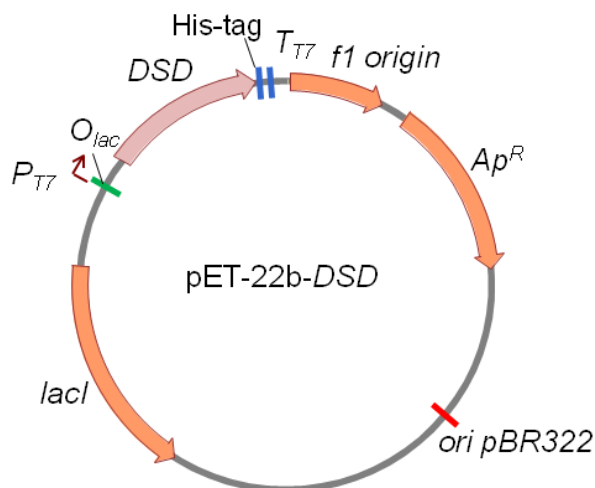


Рисунок 2.2 – Карта плазмид pET22b-DSD

ДНК после проведения СРЕС очищали на колонке и использовали для электропорации в клетки штамма BL21(DE3). Трансформанты, отобранные по маркеру плазмиды  $Ap^R$ , проверяли с помощью ПЦР на присутствие плазмиды с запланированной структурой.

Для получения плазмид  $pVK9-lacI-P_{trc-id2}-DSD$  (Рисунок 2.3) фрагмент ДНК вектора амплифицировали с рестрикта плазмиды  $pVK9-lacI$  по сайту *PstI* в качестве матрицы и праймеров P24/P27, P25/P27 и P26/P27 для *qsuB*, *qa-4* и *asbF*, соответственно. Последовательности сайтов связывания рибосомы (RBS) были включены в праймеры и спланированы таким образом, что эффективность трансляции, оцененная с помощью UTR Designer (Seo et al., 2013), была примерно одинаковой. Фрагменты ДНК *DSD* амплифицировали с использованием рестриктов ранее полученных плазмид  $pET22b-DSD$  по сайту *NdeI* в качестве матрицы и праймеров P28/P29, P30/P31 и P32/P33, для *qsuB*, *qa-4* и *asbF*, соответственно. Целевые плазмиды отбирали после электропорации смеси СРЕС в клетки K118.

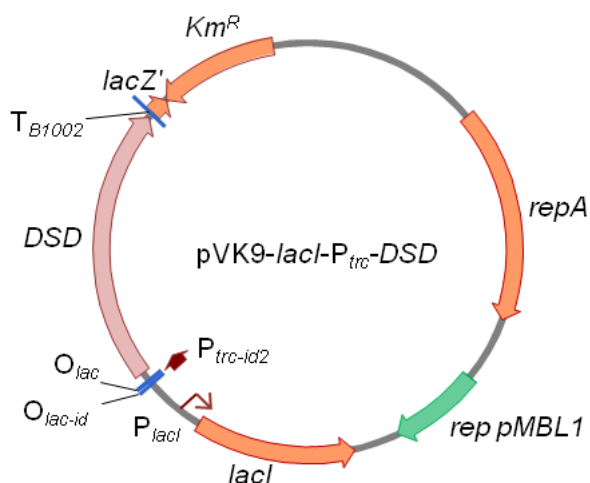


Рисунок 2.3 – Карта плазмид  $pVK9-lacI-P_{trc-id2}-DSD$

### 2.4.3 Конструирование плазмид с помощью рестрикции-лигирования

Для получения плазмид  $pAH162-\lambda attL-Tet^R-\lambda attR-P_{lacUV5}-DSD$  (Рисунок 2.4) использовали стандартный метод клонирования с помощью рестрикции-лигирования. ДНК вектора  $pAH162-\lambda attL-Tet^R-\lambda attR$  и фрагменты ДНК вставок  $P_{lacUV5}-qsuB$ ,  $P_{lacUV5}-asbF$  и  $P_{lacUV5}-qa-4$  обрабатывали рестриктазами *SalI* и *SacI*. Последние получали с помощью перекрывающейся ПЦР фрагментов ДНК, содержащих промотор  $P_{lacUV5}$  (праймеры P34/P35), и *qsuB* (P36/P37), *asbF* (P38/P39), *qa-4* (P40/P41). Перекрывающийся ПЦР проводили с праймеров P34/P37, P34/P39 и P34/P41, соответственно. В качестве матриц использовали ДНК плазмид  $pELAC$  для  $P_{lacUV5}$  и ДНК ранее полученных  $pET22b-DSD$ .

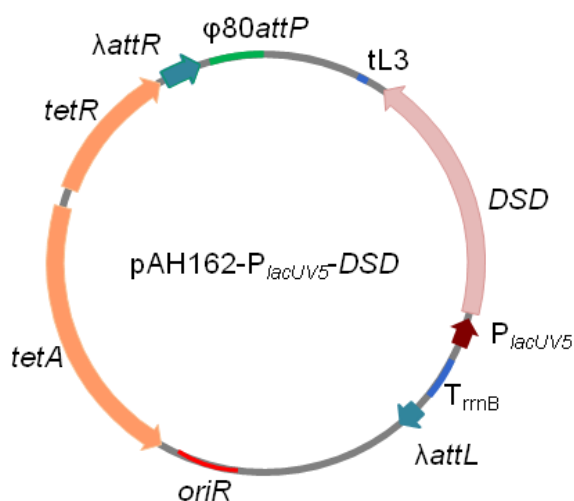


Рисунок 2.4 – Карта плазмид  $pAH162-\lambda attL-Tet^R-\lambda attR-P_{lacUV5}-DSD$



Искомые плазмиды отбирали после трансформации очищенных на колонке лигированных смесей в штамм BW25141.

#### 2.4.4 Введение ДНК в штаммы *E. coli* и *C. glutamicum*

ДНК вводили в клетки бактерий с помощью электропорации. Электрокомпетентные клетки *E. coli* получали подрачиванием в течение 2 ч в среде LB (при введении ДНК плазмид) или SOB среде (при рекомбинационной инженерии и при получении плазмид) до оптической плотности  $OP_{600} \sim 0,6$ . После чего проводили трехкратное отмывание ледяной деионизированной водой и концентрировали клетки в 80-90 раз. К 70 мкл электрокомпетентных клеток добавляли  $\sim 100$  нг ДНК и переносили полученную смесь в предварительно охлажденные кюветы для электропорации с шириной зазора 2 мм («Bio-Rad», США). Электропорацию проводили на аппарате MicroPulser (Bio-Rad, США), используя программу Ec2 (напряженность электрического поля 12,5 кВ/см). После электропорации клетки инкубировали в 1 мл LB или SOC среды (SOB с добавлением 20 мМ глюкозы) с перемешиванием в течение 2 часов, после чего высевали на селективные чашки.

Для получения электрокомпетентных клеток *C. glutamicum* подрачивание проводили в течение 2 ч в ВНИ с добавлением 2 % глицина и 0,1 % Tween 80. Arg/Gm и ИПТГ использовали для поддержания хелперных плазмид и индукции экспрессии генов  $recE^{564T}$ , соответственно. Далее клетки отмывали ледяной деионизированной водой и концентрировали так же, как и клетки *E. coli*. К 50 мкл электрокомпетентных клеток добавляли  $\sim 1$  мкг ДНК и проводили электропорацию в охлажденных кюветах с шириной зазора 1 мм («Bio-Rad», США) (напряженность электрического поля 16 кВ/см). После электротрансформации клетки переносили в 1 мл ВНИ (в случае pVC-Ar<sup>R</sup>-lacI - P<sub>trc-id2</sub>- $recE^{564T}$  с ИПТГ) и инкубировали при 30 °С в течение 2 – 4 часов, после чего высевали на селективные чашки.

## 2.5 Конструирование штаммов методами рекомбинационной инженерии

### 2.5.1 Конструирование штаммов *E. coli*

Интеграции  $P_{lacUV5}$ -*qsuB*,  $P_{lacUV5}$ -*asbF* и  $P_{lacUV5}$ -*qa-4* в нативный сайт  $\phi 80attB$  получали по схеме, изображённой на Рисунке 2.5, с помощью метода “Dual In/Out”, который был разработан в АО «АГРИ» (Minaeva et al., 2008).

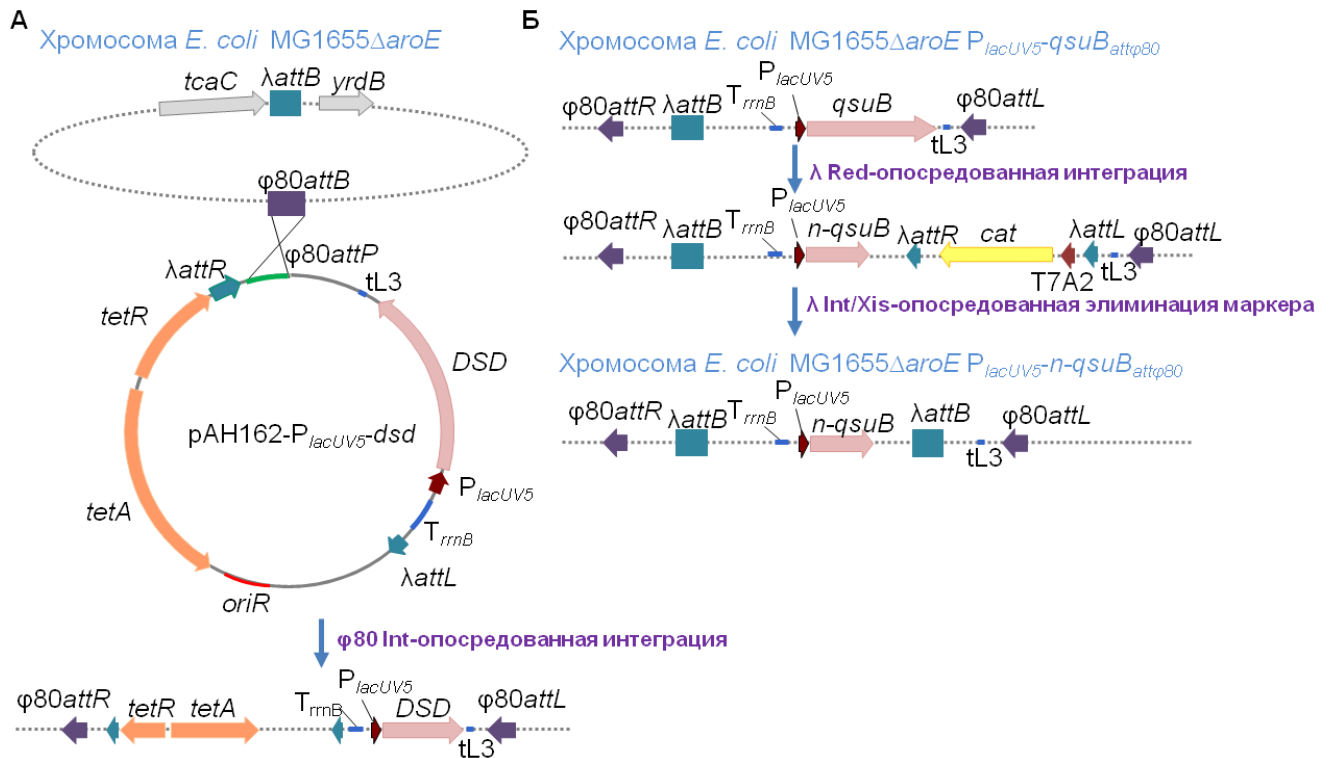


Рисунок 2.5 – Схема интеграции генов DSD в хромосому MG1655 $\Delta$ aroE (А) и делеция 3'-части гена *qsuB* для получения *n-qsuB* (Б)

Хромосома *E. coli* обозначена пунктирной линией. Кодировочные рамки генов показаны стрелками разных цветов: гены устойчивости к тетрациклину и его регулятора – оранжевым; ген устойчивости к хлорамфениколу – жёлтым; ген DSD – розовым. Другие структурные элементы (сайты присоединения (*att*) белков  $\lambda$  и  $\phi 80$ , промоторы (P), терминаторы (T)) подписаны на рисунке и так же обозначены разными цветами.

Инактивацию гена основной шикиматдегидрогеназы *E. coli* *aroE*, а так же получение укороченного варианта гена *qsuB*, предварительно интегрированного в хромосому штамма MG1655 $\Delta$ aroE выполняли с помощью метода  $\lambda$ Red-опосредованной рекомбинации (Datsenko, Wanner, 2000), который был

модифицирован в АГРИ (Каташкина с соавт., 2005). Последний включает использование Int-Xis рекомбиназы фага  $\lambda$  для вырезания *in vivo* маркера устойчивости. Для этого интегрировали в хромосому фрагмент ДНК  $\lambda attL-cat-\lambda attR$ , который имел гомологию в 36 нуклеотидов к соответствующим областям в генах *aroE* и *qsuB*.

### 2.5.2 Конструирование штаммов *C. glutamicum*

Делеции  $\Delta rcaHG$  и  $\Delta aroE$  были последовательно получены в штамме AJ1511 с помощью рекомбинационного метода, основанного на системе RecE/RecT профага  $\lambda$  *E. coli*. Вариант такого метода, как альтернатива  $\lambda$ Red-системы, не работающей в *C. glutamicum*, был разработан в АО «АГРИ» (Lobanova et al., 2022). Он включал использование укороченного с N-конца белка RecE<sup>564</sup>, сохранившего 5' → 3' экзонуклеазную активность к двухцепочечной ДНК, и белка RecT, связывающегося с одноцепочечной ДНК. Белки RecE<sup>564</sup>/RecT, экспрессирующиеся с хелперной плазмиды pVC-Apr<sup>R</sup>-lacI-P<sub>trc-id2</sub>-recE<sup>564</sup>T, обеспечивали гомологичную рекомбинацию между хромосомой и двухцепочечной ДНК в *C. glutamicum*.

Экспрессия рекомбиназы RecE<sup>564</sup>/RecT индуцировалась ИПТГ с помощью гибридного промотора P<sub>trc-id2</sub>, который регулировался LacI (Скороходова с соавт., 2006). В результате двойного скрещивания в хромосому встраивался фрагмент ДНК, содержащий ген маркера устойчивости к хлорамфениколу, фланкированный мутантными сайтами *lox*, *lox71-cat-lox66* (Рисунок 2.6). Маркер удаляли с помощью рекомбиназы Cre, экспрессирующейся с хелперной плазмиды p06-P<sub>dapA</sub>-cre (Gorshkova et al., 2018).

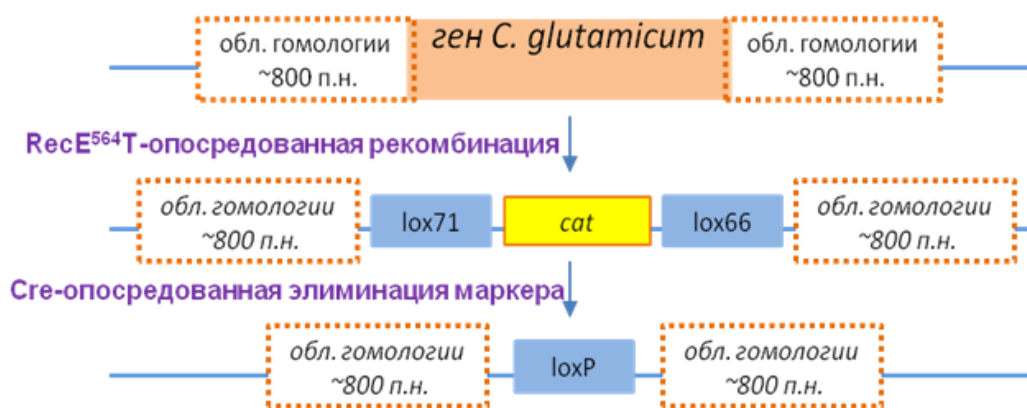


Рисунок 2.6 – Схема делеции генов в хромосоме *C. glutamicum*

## 2.6 Экспрессия и очистка белка

Для исследования QsuB и N-QsuB культуры готовили следующим образом. В колбы, содержащие 30 мл LB с Ar вносили по 300 мкл ночных культур штаммов BL21(DE3)/pET22b-*qsuB* и BL21(DE3)/pET22b-*n-qsuB* (BL21(DE3)/pET22b-*qsuB*\* и BL21(DE3)/pET22b-*n-qsuB*\*). Инкубировали при 25 °C с перемешиванием (200 об/мин) в течение 2 часов, затем добавляли 1 мМ ИПТГ и инкубировали еще 20 часов. Клетки собирали после культивирования центрифугированием при 13200 об/мин в течение 5 мин и дважды промывали стерильным раствором 0,9 % NaCl.

Дальнейшие манипуляции проводили при 4 °C.

Для получения грубых экстрактов осадки ресуспендировали в 0,5 мл буферного раствора следующего состава: 0,1 М K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5); 0,1 мМ ЭДТА; 0,4 мМ дитиотреитола; 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида. Полученные суспензии обрабатывали ультразвуком, а затем центрифугировали при 13200 об/мин в течение 5 мин. Супернатанты декантировали и анализировали с помощью электрофореза в 12 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). В качестве маркеров для оценки молекулярной массы белков использовали PageRuler Prestained Protein Ladder 26616 (Thermo Scientific, США).

Для очистки белков (QsuB, N-QsuB) с гексагистидинового меткой (His-tag) клетки ресуспендировали в 15 мл вышеуказанного буфера и разрушали с помощью Френч-пресса. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при

6000 об/мин в течение 5 мин. Затем супернатант наносили на колонку, содержащую афинную смолу Ni-NTA Affinity Resin (Clontech, США). Белковые фракции элюировали градиентом имидазола от 20 мМ (в буфере для связывания) до 500 мМ (в буфере для элюирования). Фракцию, содержащую очищенный белок, растворяли в буфере: 50 мМ Трис-НСl (Трис – трис(гидроксиметил)аминометан) (рН 7,5), 500 мМ NaCl и 5 % глицерин.

Для сравнительного анализа DSD клетки BL21(DE3)/pET22b-*qsuB*, BL21(DE3)/pET22b-*asbF* и BL21(DE3)/pET22b-*qa-4* подращивали в меньшем объеме (10 мл LB с ампициллином) в пробирках (18 мм × 200 мм), при этом объем инокулята составлял 100 мкл. В случае *AsbF*, после индукции ИПТГ культивирование проводили в течение 3 часов. Грубые экстракты готовили с использованием буфера xTractor™ (Takara Bio, США) в соответствии с инструкциями производителя. Супернатанты декантировали и анализировали с помощью 12 % SDS-PAGE. Чистые DSD с гексагистиридиновой меткой выделяли с использованием набора Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit (Takara Bio, США).

## 2.7 Гель-фильтрация

Определение олигомерного состава проводили методом гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superose 6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, США). Для N-QsuV использовали буферный раствор, содержащий 50 мМ Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (рН 7,0), 150 мМ NaCl при скорости потока 0,5 мл/мин. Для QsuV использовали буферный раствор, содержащий 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 500 мМ NaCl и 5 % об./об. глицерина, и скорость потока 0,4 мл/мин. Белки детектировали, измеряя оптическую плотность при 280 нм. Наборы маркеров для гель-фильтрации MWGF 1000 (29 – 700 кДа) и MWGF 70 (12,4 кДа) были приобретены у Sigma-Aldrich (США).

## 2.8 Определение активности ферментов

Кинетические свойства ферментов определяли путем наблюдения за продукцией 3,4-DHBA ( $\epsilon_{290} = 3,89 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) при 290 нм по описанной методике (Strøman, Reinert, Giles, 1978).  $V_{\max}$  и  $K_m$  были получены путем построения графика в двойных обратных координатах.

Идентификацию продукта проводили путем сравнения его ультрафиолетового (УФ) спектра со спектром стандарта 3,4-DHBA (Рисунок 3.6А) с использованием УФ-видимого спектрофотометра Genesys10S (Thermo Scientific, США). Идентичность соединений стандартам DHS и 3,4-DHBA подтверждали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При приготовлении образцов фермент инактивировали добавлением этанола до концентрации 70 %, затем разбавляли водой в 100 раз и фильтровали. Стандарты DHS и 3,4-DHBA были приобретены у Sigma-Aldrich (США).

Активность DSD определяли *in vitro* с использованием очищенных рекомбинантных белков, содержащих His-tag на С-конце. Для удаления остаточных двухвалентных катионов перед реакциями ферменты инкубировали в присутствии 1 мМ ЭДТА на льду в течение 1 ч. Стандартная реакция проводилась в кювете объемом 1 мл в течение 1 мин при 20 °С и содержала фермент (150 нМ AsbF, 10 нМ Qa-4, 20 нМ QsuB, 50 нМ N-QsuB), 0,1 М Трис-НСl буфер (рН 7,5), 10 мМ соли металла и 0,1 – 5 мМ DHS.

Металлы-кофакторы определяли, наблюдая за реакцией в присутствии 1 мМ DHS и каждой из тестируемых солей металлов:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  и  $\text{ZnSO}_4$ .

Зависимость активности вариантов QsuB от рН получали в присутствии 1 мМ DHS и 10 мМ  $\text{CoCl}_2$ .

Для определения термостабильности QsuB, инкубацию проводили при 46 °С в стандартном буфере в присутствии ЭДТА при физиологическом рН 7,5, но без добавления  $\text{Co}^{2+}$ , который, как и DHS, добавляли непосредственно перед измерением активности. Определение температурного оптимума QsuB проводили

в диапазоне 18 – 37 °С. Для этого QsuB инкубировали в течение 5 мин в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 7,5) при указанной температуре, а затем добавляли остальные предварительно доведенные до необходимой температуры компоненты реакционной смеси и тестировали активность.

Измерение активностей для определения констант полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) проводили в присутствии 1 мМ DHS и с добавлением 0 – 0,9 мМ 3,4-DHBA.  $IC_{50}$  определяли с помощью линейного приближения.

Для QsuB и N-QsuB тип и константы ингибирования ( $K_i$ ,  $K'_i$ ) определяли графическим методом «относительных скоростей» (Yoshino, Murakami, 2009). Экспериментальные данные были представлены в виде графиков зависимости  $(V_{max} - v)/v$  от концентрации ингибитора ( $[I]$ ; 0 – 0,4 мМ 3,4-DHBA) при 0,5/1/1,5 мМ концентрациях DHS, где  $V_{max}$  и  $v$  представляли максимальную скорость и скорость в отсутствии или в присутствии ингибитора при заданных концентрациях субстрата, соответственно. При этом конкурентное ингибирование соответствовало бы прямым линиям, пересекающимся на оси абсцисс в точке, где  $[I] = -K_i$ . Бесконкурентное ингибирование соответствовало бы параллельным линиям с наклоном  $1/K_i$ . Для ингибирования смешанного типа характерно пересечение прямых на графике в третьем квадранте в точке, где  $[I] = -K_i$  и  $(V_{max} - v)/v = -K_i/K'_i$ , а в частном случае неконкурентного ингибирования, где  $K_i = K'_i$ , пересечение происходило бы в точке, где  $[I] = -K_i$  и  $(V_{max} - v)/v = -1$ .

Диоксигеназную активность С-концевого домена тестировали с использованием грубых экстрактов в реакционной смеси 0,1 М Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ  $MgCl_2$ , 0,1 мМ 3,4-DHBA и 3 мкг общего белка.

Влияние His-tag на активность QsuB и N-QsuB оценивали с использованием грубых экстрактов в реакционной смеси 0,1 М Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ DHS и 3 мкг общего белка.

## 2.9 ВЭЖХ анализ

Обнаружение, разделение (Рисунок 3.6Б) и определение концентрации DHS и 3,4-DHBA выполняли при сотрудничестве с аналитическим сектором АО «АГРИ» методом ВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с детектором с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu, США), оснащенной колонкой Zorbax eclipse (XDB-c18; 3,0 мм × 150 мм, 3,5 мкм) (Agilent Technologies, США). В качестве элюента А использовали 0,025N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а в качестве элюента В - метанол (90 % об./ об.). Градиент метанола варьировали следующим образом: 0 мин – 20 %; 7 мин – 35 %; 7 – 9 мин – 35 %; 10 – 12 мин – 50 %; 13 – 18 мин – 20 % при скорости потока 0,25 мл/мин и температуре 30 °С. УФ-детектирование проводили при 235 нм для DHS и 260 нм для 3,4-DHBA.

## 2.10 Выравнивание последовательностей и трехмерный структурный анализ

Множественное выравнивание последовательностей DSD различных типов было выполнено с использованием программного обеспечения T-Coffee (Notredame, Higgins, Heringa, 2000). Соответствующее изображение (Рисунок 3.16) было создано с помощью Jalview (Waterhouse et al., 2009). Поиск гомологичных DSD проводили с помощью алгоритма blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, по состоянию на 10 июля 2018 г.). Аминокислотные последовательности белков были загружены из базы данных белков (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> по состоянию на 10 июля 2018 г.). Филогенетический анализ проводили с помощью Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Трехмерные структуры QsuB и Qa-4 были предсказаны с помощью программы I-TASSER (Roy, Kucukural, Zhang, 2010). Кристаллические структуры AsbF из *B. anthracis* (идентификатор PDB: 3DX5) и QuiC1 из *Ps. putida* (идентификатор PDB: 5HMQ) были загружены из банка данных белков (PDB) (<http://www.rcsb.org>, по состоянию на 19 февраля 2020 г.) (Berman et al., 2000). Работа по изучению образования димеров проводилась совместно с к. х. н. Нольде Д.Е. (ИБХ РАН, Москва). Димеры белков QsuB и N-QsuB моделировали на основе



димера QuiC1 с использованием системы молекулярной графики PyMOL (версия 1.2r3pre, Schrodinger, LLC). Анализ осуществляли с помощью сервиса PISA ([https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html), по состоянию на 19 февраля 2020 г.) (Krissinel, Henrick, 2007).

### **2.11 Статистический анализ**

Все значения на графиках и в таблицах представлены как среднее арифметическое не менее трех независимых экспериментов. Приведенные ошибки являются стандартными отклонениями (SD). Для расчетов использовался Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Классификация дегидрошикиматдегидратазы QsuB из *C. glutamicum* на основании гомологии её аминокислотной последовательности

Аминокислотные последовательности DSD для выравнивания были взяты из базы данных белков Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI, США). Анализ гомологов QsuB с помощью алгоритма blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) подтвердил вывод Дж. Пика с соавт. (2017) о наличии двух доменов. N-концевой домен (1 – 272 а.о.) был гомологичен дегидрошикиматдегидратазам, тогда как С-концевой домен (292 – 618 а.о.) имел гомологию с С-концевыми доменами других двудоменных DSD и более слабую гомологию с гидроксифенилпируватдиоксигеназой (~ 30 %). На основании множественного выравнивания последовательностей было построено филогенетическое дерево, показывающее наличие пяти классов DSD (Рисунок 3.1).

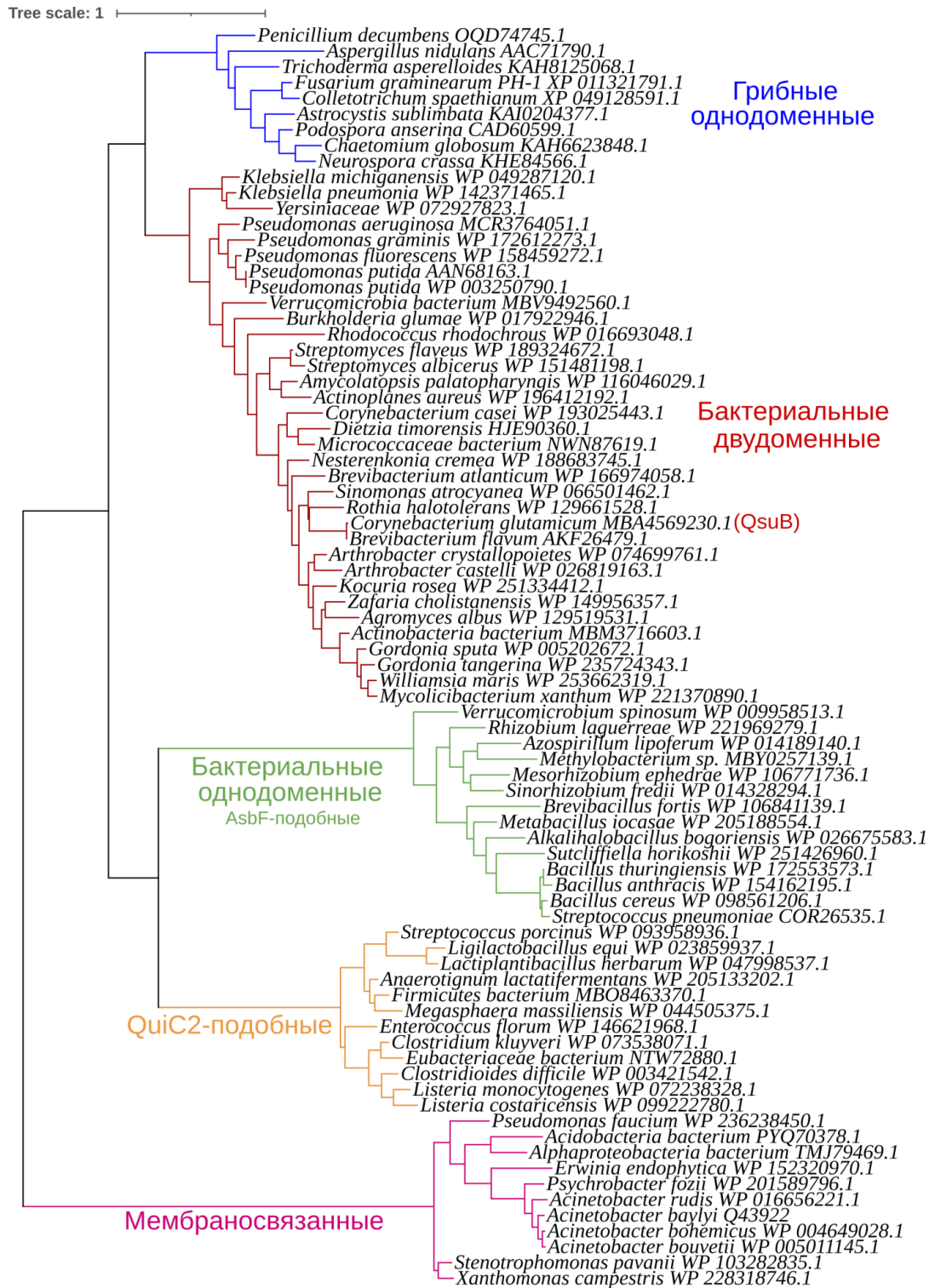


Рисунок 3.1 – Филогенетический анализ, идентифицирующий пять классов различных DSD

Для бактериальных двудоменных DSD в дереве представлены последовательности только N-концевых доменов. Дерево максимального правдоподобия было создано с помощью Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Каждая из четырех основных групп DSD подтверждается значением bootstrap 0,95 из 100 реплик. Изображение было сгенерировано с помощью сервиса iTOL v5 (Letunic, Bork, 2021).

QsuB сравнивали с прототипом двудоменных DSD QuiC1 из *Ps. putida*. Согласно выравниванию последовательностей аминокислот, QsuB и его N-концевой домен (N-QsuB), кодирующий дегидрошикиматдегидратазную активность, имели 39,9 и 50,9 % идентичных остатков с QuiC1 и N-QuiC1, соответственно. Этот уровень идентичности позволил нам предсказать трехмерную структуру QsuB на основе кристаллической структуры QuiC1 (PDB: 5HMQ) (Рисунок 3.2).

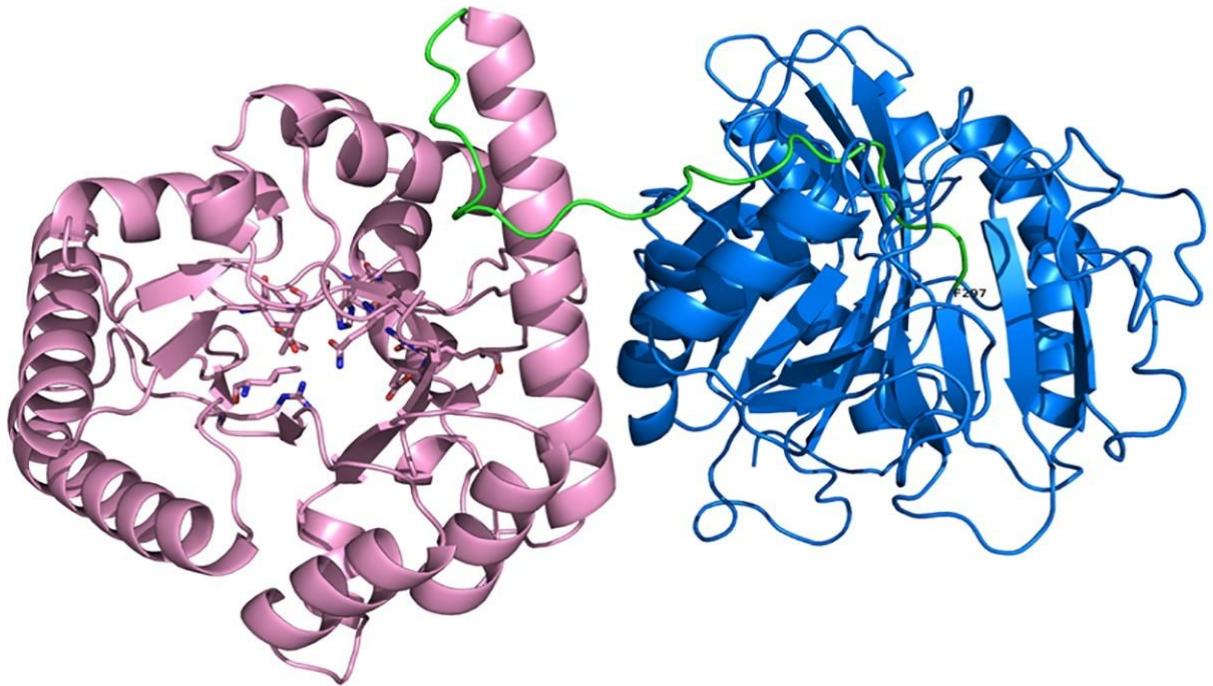


Рисунок 3.2 – Предсказанная структура мономера QsuB

N, C-концевые домены и линкер показаны розовым, синим и зеленым цветами, соответственно. Остатки активного центра DSD выделены красным и синим цветами (см. п. 3.6.4). Стрелкой указан концевой остаток Phe297 белка N-QsuB.

### 3.2 Рекомбинантная экспрессия и определение олигомерного состояния QsuB и его N-концевого домена

Чтобы исследовать необходимость обоих доменов в синтезе 3,4-DHBA, полноразмерный QsuB и N-QsuB были экспрессированы в T7-системе (Рисунок 2.2). Поскольку сравнение исходных белков и их меченных по C-концу His-tag вариантов не выявило существенной разницы в их активности (см. 3.4.1), то для исследований *in vitro* использовались His-tag белки. QsuB и N-QsuB были хорошо

видны на электрофореграммах белков клеточного экстракта и составляли примерно 15 % от общего количества белков (Рисунок 3.3).

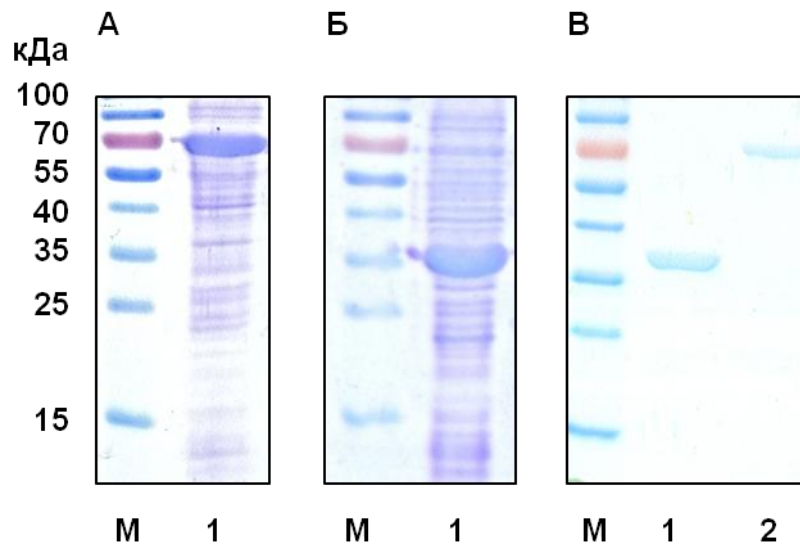


Рисунок 3.3 – Экспрессия QsuV и N-QsuV в T7-системе

Экстракты клеток после индукции ИПТГ анализировали с использованием 12 % SDS-PAGE. М, маркер молекулярного веса. А. Дорожка 1, грубый экстракт клеток BL21(DE3)/pET22b-*qsuB*. Б. Дорожка 1, грубый экстракт клеток BL21(DE3)/pET22b-*n-qsuB*. В. Белки после очистки: дорожка 1, N-QsuV (~ 34 кДа); дорожка 2, QsuV (~ 70 кДа).

Очищенные белки, меченные His-tag (Рисунок 3.3В), использовали в экспериментах по гель-фильтрации (Рисунок 3.4А и 3.4Б). Анализ с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), которую проводили совместно с к. б. н. Смирновым С. В. (АО «АГРИ»), показал, что QsuV имеет тенденцию к образованию мультимерных структур: в водном буфере наблюдались октамерные – 60 %, тетрамерные – 25 % и мономерные – 15 % формы (Рисунок 3.4В). N-QsuV присутствовал в основном в виде мономеров (80 %) (Рисунок 3.4Г). Таким образом, наличие С-концевого домена могло стимулировать образование олигомерных структур.

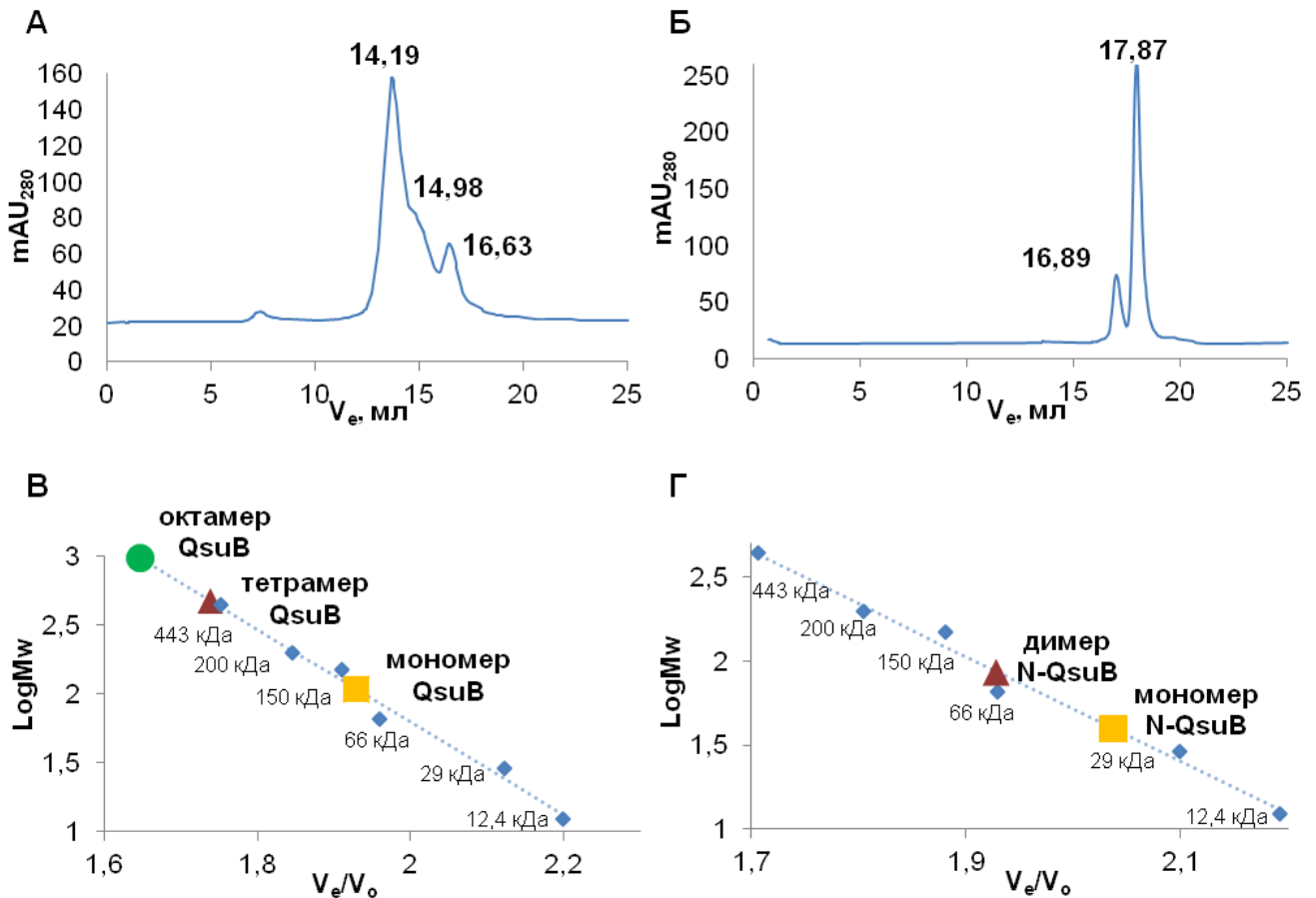


Рисунок 3.4 – Определение олигомерного состава QsuB и N-QsuB

Определение молекулярной массы проводили с помощью SEC. Белки детектировали путем мониторинга поглощения при 280 нм ( $mAU_{280}$ ). А. Гель-фильтрационный анализ QsuB: объемы элюции ( $V_e$ ) для мономерной, тетрамерной и октамерной форм составляли 16,63 мл, 14,98 мл и 14,19 мл, соответственно. Б. Гель-фильтрационный анализ N-QsuB: значения  $V_e$  мономерной и димерной форм составляли 17,87 мл и 16,89 мл, соответственно. Калибровочные кривые молекулярной массы для QsuB (В) и N-QsuB (Г) представляют собой зависимость  $mAU_{280}$  от  $V_e/V_0$ , где  $V_0$  – объем пустой колонки.  $V_0$  определяли экспериментально, как  $V_e$  синего декстрана (2000 кДа). Стандарты белков: цитохром с (12,4 кДа), карбоангидраза (29 кДа), альбумин (66 кДа), алкогольдегидрогеназа (150 кДа),  $\beta$ -амилаза (200 кДа), апоферритин (443 кДа) и тиреоглобулин (669 кДа), представлены синими ромбами.

### 3.3 Исследование функции С-концевого домена QsuB

В процессе деградации до  $\beta$ -кетoadипата ароматическое кольцо 3,4-DHBA подвергается расщеплению. Это расщепление катализирует протокатехат-3,4-диоксигеназа. Соответствующий фермент кодируется генами *pcaHG* у *S. glutamicum* (Рисунок 1.7). Исходя из выявленной гомологии С-концевого домена,

мы предположили, что этот домен QsuB может так же проявлять 3,4-DHBA-диоксигеназную активность. Такая активность была бы нежелательной, как в опытах по измерению активности DSD, так и при получении продукции 3,4-DHBA. Для тестирования деградации 3,4-DHBA, грубый экстракт клеток, содержащий QsuB, инкубировали в присутствии 3,4-DHBA с мониторингом УФ-спектра. Изменений в УФ-спектре, свидетельствующих о появлении  $\beta$ -карбокси-*цис,цис*-муконовой кислоты ( $\beta$ -СМА), продукта диоксигеназной активности, а так же других изменений спектра выявлено не было (Рисунок 3.5).

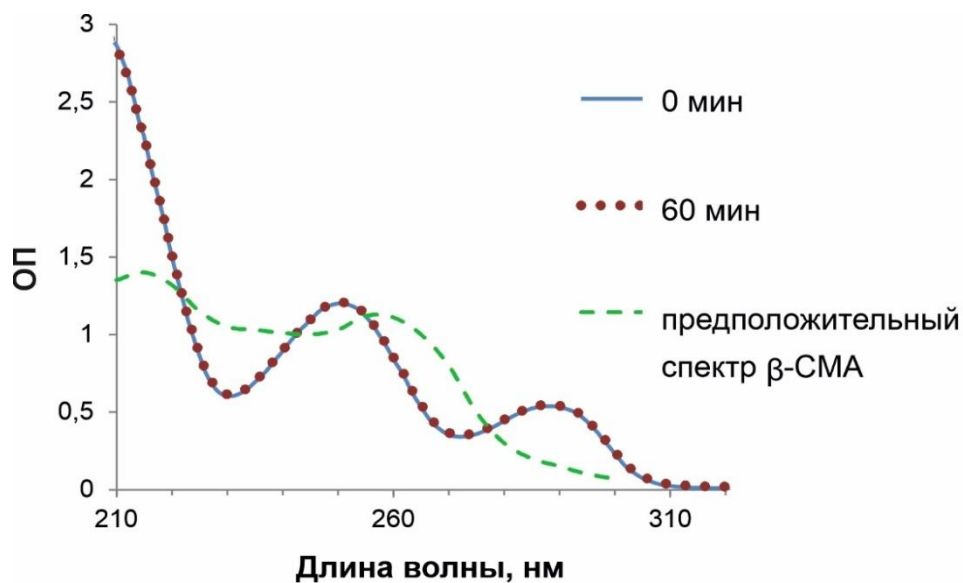


Рисунок 3.5 – Стабильность 3,4-DHBA в присутствии QsuB

УФ-спектр реакционной смеси (рН 7,5), содержащей очищенный QsuB, до и после 60-минутной инкубации с 3,4-DHBA был одинаковым. УФ-спектр  $\beta$ -СМА показан Войтас-Василевской с соавт. (1988).

Выше было высказано предположение, что С-концевой домен может участвовать в олигомеризации, т.е. в образовании тетрамеров и октамеров QsuB, обнаруженных с помощью гель-фильтрации (Рисунок 3.4). Действительно, двудоменный фермент QuiC1 также имел мультимерную структуру, представляющую собой гексамер, состоящий из трех димеров (см. п. 1.3.4). Предположительно, тетра- и октамеры QsuB так же могли образовываться из димеров. Вероятности образования димеров QsuB и N-QsuB были проанализированы. Контактное взаимодействие между мономерами QsuB могло



осуществляться за счёт образования 12 водородных связей и 4 солевых мостиков между остатками N- и C-концевых доменов (Приложение А). После удаления C-концевого домена в димеризации могли быть задействованы всего лишь две водородные связи и два солевых мостика (Приложение Б). В результате, состояние димера QsuB было более устойчивым ( $\Delta G = -31,8$  ккал/моль), чем N-QsuB ( $\Delta G = -1,0$  ккал/моль).

Тем не менее, сама по себе олигомеризация не влияла на ферментативную активность QsuB. Моно-, тетра- и октамерные фракции QsuB были отобраны с помощью SEC и их специфические активности были протестированы. Они составляли  $35 \pm 3$ ,  $36 \pm 4$ ,  $46 \pm 7$  мкмоль/мин/мг, соответственно.

### 3.4 Биохимические свойства QsuB и N-QsuB

#### 3.4.1 Анализ активности DSD для QsuB и N-QsuB

Тестирование активности DSD *in vitro* проводили спектрофотометрически, наблюдая за изменением адсорбции при 290 нм (Рисунок 3.6А).

Идентичность продукта реакции *in vitro* 3,4-DHBA была подтверждена с помощью ВЭЖХ (Рисунок 3.6Б).

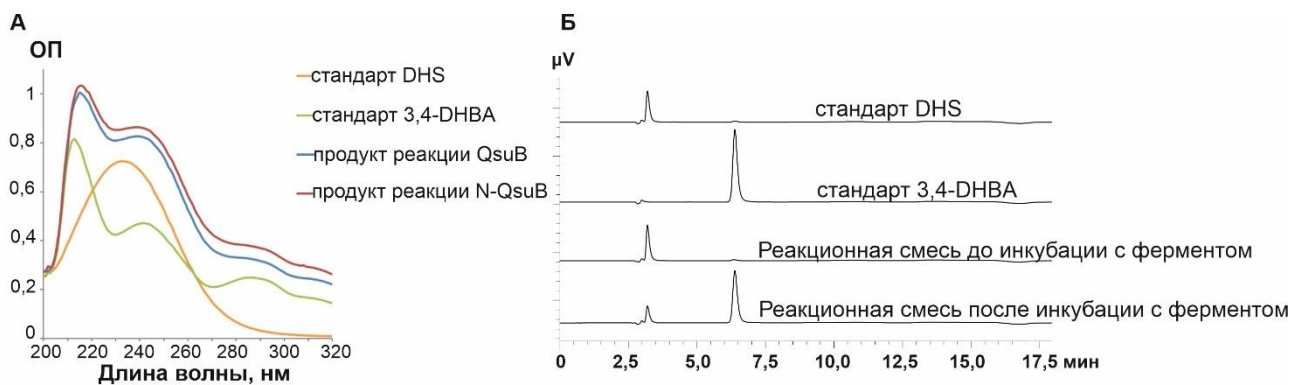


Рисунок 3.6 – Анализ реакционных смесей с помощью УФ-спектрофотометрии (А) и ВЭЖХ (Б) до и после инкубации с DSD

QsuB и N-QsuB стимулировали превращение DHS в 3,4-DHBA.

Для оценки влияния His-tag на активность QsuB и N-QsuB предварительные эксперименты проводили с грубыми экстрактами клеток, экспрессирующими



QsuB и N-QsuB с His-tag и без этой метки. Было установлено, что His-tag не влияет на активность QsuB и N-QsuB (Рисунок 3.7).

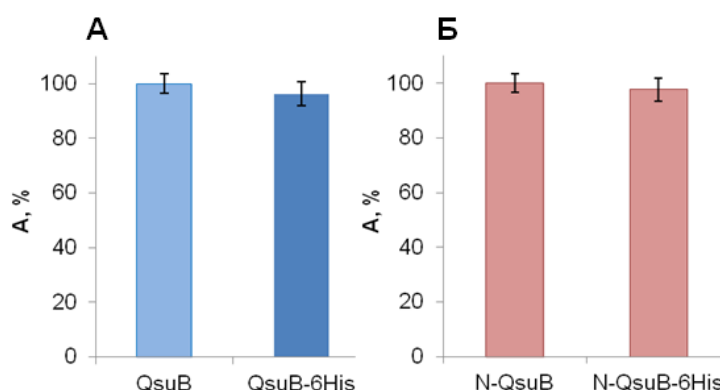


Рисунок 3.7 – Влияние His-tag на активность QsuB (А) и N-QsuB (Б)

### 3.4.2 Определение оптимального кофактора и pH реакции

Как было известно, активность DSD зависит от присутствия двухвалентных катионов (см. Обзор литературы). Очищенные белки QsuB и N-QsuB катализировали реакцию образования 3,4-DHBA без добавления ионов металлов. Они, по-видимому, оставались связанными в активном центре после очистки, т.к. эта активность ингибировалась ЭДТА. Добавление в реакционную смесь  $Mg^{2+}$  и некоторых других катионов восстанавливало активность. Каталитическую активность ферментов тестировали в присутствии ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ . Из рассмотрения умышленно были исключены ионы железа и меди, т.к. было известно, что они изменяют спектр при 290 нм в присутствии DHS без добавления фермента (Fox et al., 2008). Как видно из Рисунка 3.8А, максимальную активность обеспечивали ионы  $Co^{2+}$  и в меньшей степени  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ . Примечательно, что  $Co^{2+}$  также был предпочтительным кофактором для QuiC1 (Таблица 1.4). Концентрация двухвалентных металлов 10 мМ, использованная в тестах *in vitro*, была явно выше физиологической. Тем не менее, *C. glutamicum* могла расти при 2 мМ  $Co^{2+}$  и была к нему более устойчива, чем *E. coli* (менее 1 мМ) (Fanous et al., 2010). Таким образом, с учётом этой устойчивости, кобальт мог быть оптимальным металлом-кофактором для DSD *C. glutamicum*.

Дальнейшие исследования QsuB и N-QsuB, в том числе зависимость от pH, проводили в присутствии  $\text{Co}^{2+}$  (Рисунок 3.8Б). Оптимальный pH для этих ферментов находился в диапазоне 8,0 – 8,4. Фермент AsbF также имел оптимальный pH в щелочной области (см. п. 1.3.3). При физиологических для *S. glutamicum* и *E. coli* pH 7 – 7,8 (Follmann et al., 2009) активность полноразмерного и укороченного ферментов снижалась.

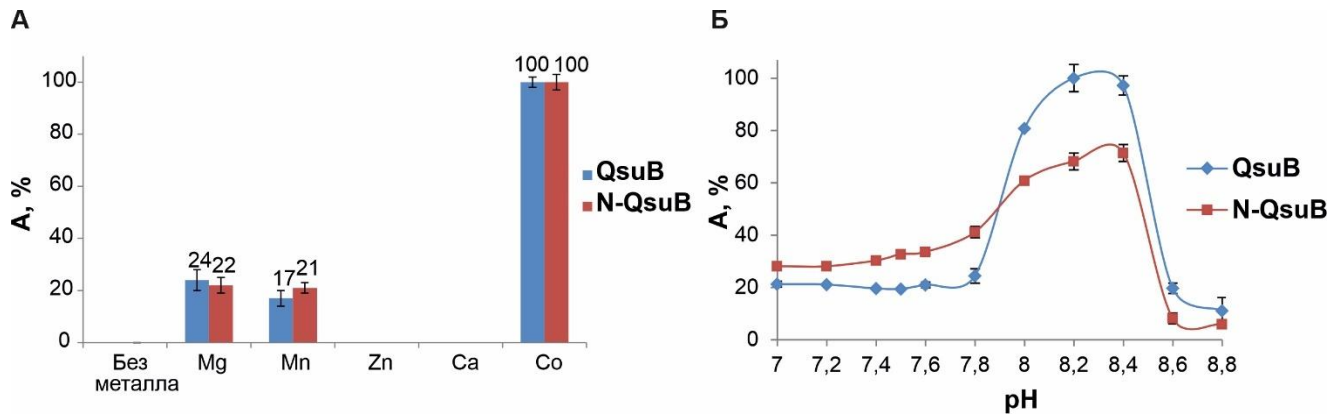


Рисунок 3.8 – Влияние ионов металлов и pH на DSD активность QsuB и N-QsuB (1 мМ DHS)

А. Относительная DSD-активность QsuB и N-QsuB в присутствии двухвалентных металлов, нормализованная по отношению к QsuB и N-QsuB в присутствии кобальта. Б. Зависимость активностей QsuB и N-QsuB от pH.

### 3.4.3 Кинетические кривые QsuB и N-QsuB и их анализ

Кинетические кривые были получены для QsuB и N-QsuB при pH 7,5 (Рисунок 3.9А), по которым и были определены параметры  $K_m$  и  $k_{cat}$  (Таблица 3.1; Рисунок 3.9Б).

Таблица 3.1 – Кинетические свойства<sup>а</sup> QsuB и N-QsuB

DSD	$K_m$ (DHS), мкМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , 10 <sup>-3</sup> /мкМ/с	Источник
QsuB	960 ± 80	60,8 ± 0,9	60 ± 12	Данная работа
N-QsuB	470 ± 70	23,4 ± 0,4	50 ± 6	Данная работа

<sup>а</sup> Кинетические свойства QsuB и N-QsuB определяли при pH 7,5, 20°C.

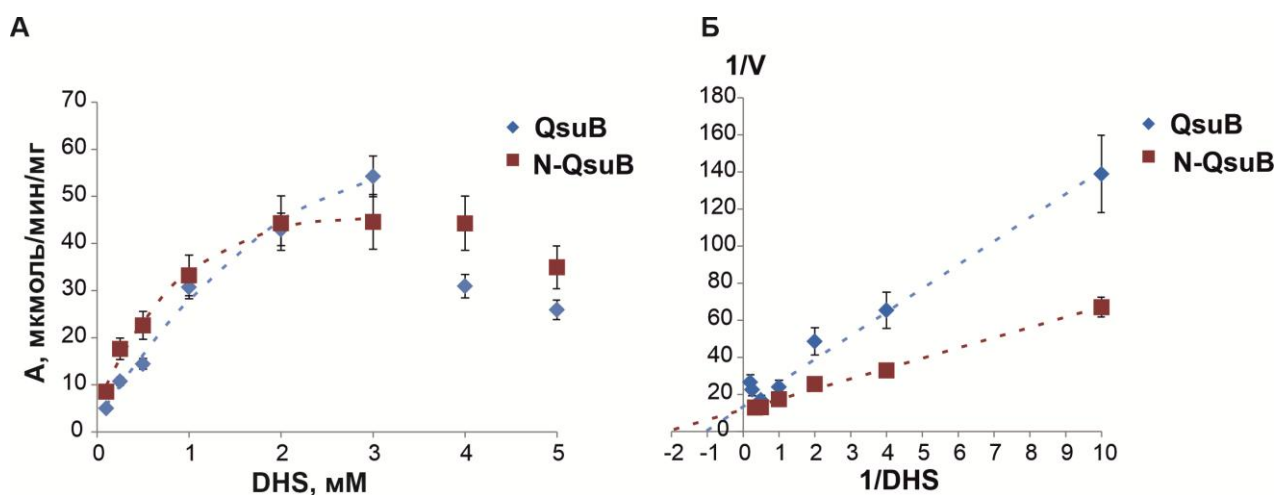


Рисунок 3.9 – Кинетические кривые QsuB и N-QsuB

А. Зависимость активности белка (20 нМ QsuB, 50 нМ N-QsuB) от концентрации субстрата.

Б. Двойные реципрокные графики кинетических кривых.

Как видно из Таблицы 3.1, удаление С-концевого домена QsuB приводило к снижению значений  $K_m$  и  $k_{cat}$  в два и три раза, соответственно, без существенного изменения  $K_{eff}$  ( $k_{cat}/K_m$ ). Достигнув максимума при 3 мМ DHS, активности QsuB и N-QsuB начинали снижаться. Спектр поглощения DHS в концентрациях выше 4 мМ мог влиять на точность определения 3,4-DHBA. Поэтому для подтверждения снижения скорости реакции при добавлении 4 и 5 мМ DHS, концентрацию продукта и субстрата в реакционной смеси проверяли методом ВЭЖХ. DHS снижал активность ферментов QsuB и N-QsuB со значениями  $IC_{50} \sim 4,2$  мМ и  $\sim 5,5$  мМ, соответственно. Эти концентрации полумаксимального ингибирования были рассчитаны на основе данных Рисунок 3.9А.

#### 3.4.4 Ингибирование QsuB и N-QsuB продуктом реакции

Активность DSD QsuB и N-QsuB ингибировалась 3,4-DHBA. Для определения типа ингибирования использовался метод относительных скоростей (Yoshino, Murakami, 2009) Для этого были получены зависимости  $(V_{max} - v)/v$  от концентрации 3,4-DHBA при трёх концентрациях DHS (Рисунок 3.10).

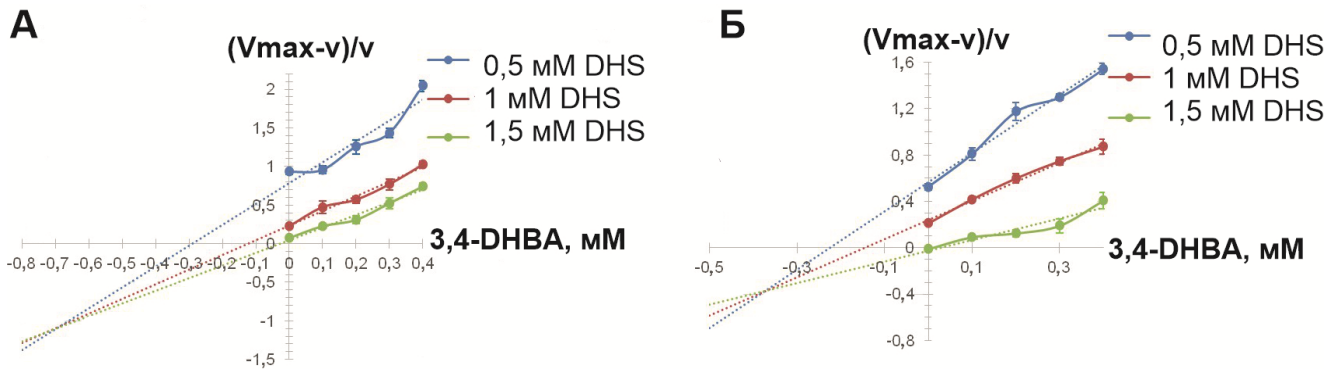


Рисунок 3.10 – Графики относительных скоростей N-QsuB (А) и QsuB (Б)

Различные концентрации DHS представлены цветами: 0,5 (синяя линия), 1 (красная линия) и 1,5 мМ (зеленая линия).

Как видно из Рисунка 3.10А, кривые ингибирования для N-QsuB, полученные при добавлении различных концентраций субстрата, пересекались в точке с координатами  $(-K_i; -1)$ , что соответствовало неконкурентному типу ингибирования ( $K_i \sim 0,69$  мМ). В то время как те же кривые для QsuB (Рисунка 3.10Б) соответствовали ингибированию смешанного типа ( $K_i \sim 0,38$  мМ,  $K'_i \sim 0,96$  мМ). В обоих случаях продукт реакции мог связываться как с ферментом ( $K_i$ ), так и с фермент-субстратным комплексом ( $K'_i$ ). В случае N-QsuB,  $K_i = K'_i$ , и такое связывание может происходить с одинаковой аффинностью. В случае QsuB,  $K_i < K'_i$ , а связывание ингибитора происходит преимущественно со свободным ферментом. Таким образом, удаление С-концевого домена привело к уменьшению сродства свободного фермента к ингибитору.

### 3.5 Продукция 3,4-DHBA из глюкозы с помощью QsuB и N-QsuB в клетках *E. coli*

Клетки *E. coli* не утилизируют 3,4-DHBA, что подтверждалось отсутствием ферментов *pca* оперона (база данных лабораторных штаммов *E. coli* Есосус (Keseler et al., 2021)). Инактивация шикиматдегидрогеназы, кодируемой геном *aroE*, обеспечивала накопление DHS в клетках *E. coli* MG1655 $\Delta$ *aroE*, поэтому ферменты QsuB и N-QsuB тестировали на продукцию 3,4-DHBA в этом штамме. Гены, кодирующие полноразмерный QsuB (*qsuB*) и N-QsuB (*n-qsuB*) были

интегрированы в  $\phi 80attB$  хромосомы MG1655 $\Delta$ aroE под контролем ИПТГ-индуцируемого промотора  $P_{lacUV5}$ . Полученные штаммы тестировали на продукцию 3,4-DHBA в ферментации с глюкозой, в качестве источника углерода (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Продукция 3,4-DHBA из глюкозы (40 г/л) в пробирках

№	Штамм MG1655 $\Delta$ aroE	ОП <sub>540</sub>	DHS, г/л	3,4-DHBA, г/л	Глю (44 ч), г/л	1 мМ ИПТГ	CoCl <sub>2</sub> , мкМ
1		31 ± 3	3,7 ± 0,1	< 0,1	5 ± 1	–	–
2		27 ± 4	4 ± 1	< 0,1	10 ± 1	+	–
3		29 ± 1	5,1 ± 0,1	< 0,1	4,0 ± 0,1	–	10
4	–	29 ± 1	5,0 ± 0,1	< 0,1	5 ± 1	+	–
5		27 ± 1	4,6 ± 0,1	< 0,1	9 ± 1	–	100
6		27 ± 2	5,0 ± 0,1	< 0,1	8 ± 2	+	–
7		28 ± 3	2,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	10 ± 1	–	–
8		30 ± 1	~ 0,1	3,2 ± 0,3	8 ± 3	+	–
9		29 ± 1	3,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	6 ± 1	–	10
10	$P_{lacUV5-qsuB_{\phi 80attB}}$	29 ± 1	~ 0,2	3,9 ± 0,1	7 ± 1	+	–
11		27 ± 1	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,1	8 ± 1	–	100
12		27 ± 1	~ 0,2	3,4 ± 0,1	10 ± 1	+	–
13		27 ± 1	3,4 ± 0,2	~ 0,1	10 ± 1	–	–
14		31 ± 1	2,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	8 ± 4	+	–
15		29 ± 1	5,1 ± 0,1	< 0,1	6 ± 1	–	10
16	$P_{lacUV5-n-qsuB_{\phi 80attB}}$	29 ± 3	4,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	6 ± 1	+	–
17		28 ± 2	4,7 ± 0,1	~ 0,1	7 ± 1	–	100
18		28 ± 3	3,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	8 ± 1	+	–

Как видно из Таблицы 3.2, штамм MG1655 $\Delta$ aroE (строки 1 – 6) продуцировал только DHS. Штаммы с  $P_{lacUV5-qsuB}$  (Таблица 3.2, строки 7 – 12) и с  $P_{lacUV5-n-qsuB}$  (Таблица 3.2, строки 13 – 18) накапливали 3,4-DHBA в культуральной жидкости обратно пропорционально накоплению DHS. Накопление 3,4-DHBA зависело от добавления ИПТГ и было выше у первого штамма в 2,7 – 2,8 раз. Штамм MG1655 $\Delta$ aroE  $P_{lacUV5-n-qsuB}$  продуцировал 3,4-

DHBA только в присутствии ИПТГ. В состав ферментационной среды входил  $Mg^{2+}$ . Добавление  $Co^{2+}$  (10 мкМ) увеличивало продукцию 3,4-DHBA примерно на 20 % для QsuB и на 16 % для N-QsuB (Таблица 3.2, строки 8 и 10; 14 и 16). Увеличение  $Co^{2+}$  до 100 мкМ не сказывалось на продукции 3,4-DHBA для N-QsuB, но увеличивало её на 6 % для QsuB. Добавление  $Co^{2+}$  (10 мкМ) увеличивало накопление не только 3,4-DHBA, но и DHS. Возможно, увеличение продукции DHS было связано с повышением активности ДАНР-синтазы, направляющей поток углерода в ароматический путь (Рисунок 1.1) и являющейся металлозависимым ферментом. Кобальт является одним из возможных кофакторов для AroG *E. coli* (Stephens, Bauerle, 1991).

Во всех случаях штамм MG1655 $\Delta$ aroE  $P_{lacUV5}$ -n-qsuB продуцировал меньше 3,4-DHBA, чем MG1655 $\Delta$ aroE  $P_{lacUV5}$ -qsuB. В оптимальных условиях, т.е. при добавлении необходимой концентрации  $Co^{2+}$ , QsuB практически полностью преобразовывал субстрат в продукт, в отличие от N-QsuB. Таким образом, C-концевой домен был необходим для максимальной активности DSD в клетках *E. coli*. Двудоменный фермент был более оптимален для продукции 3,4-DHBA, чем его укороченный однодоменный вариант, возможно, из-за своей стабильности.

### 3.6 Сравнение QsuB с дегидрошикиматдегидратазами других типов

Согласно литературе, продукцию 3,4-DHBA и её производных уже получали в клетках *E. coli*, но с помощью других DSD. Представляло интерес провести сравнение QsuB и известных однодоменных ферментов для выявления критичных для продукции 3,4-DHBA свойств.

Для сравнения с QsuB были выбраны: грибной фермент Qa-4 из *N. crassa* и бактериальный AsbF из *B. thuringiensis*.

#### 3.6.1 Рекомбинантная экспрессия дегидрошикиматдегидратаз в *E. coli*

Гены *asbF* и *qa-4* (кодон оптимизированные для *E. coli*) были также, как и *qsuB*, клонированы в векторе pET22b и экспрессированы в T7-системе. Анализ

неочищенных экстрактов клеток BL21(DE3), содержащих плазмиды pET22b-*asbF*, pET22b-*qa-4* и pET22b-*qsuB*, выявил более интенсивную полосу белка AsbF по сравнению с таковыми для Qa-4 и QsuB в SDS-PAGE (Рисунок 3.11). Разница в количестве этих белков могла быть вызвана как их различной стабильностью в клетках *E. coli*, так и разным уровнем экспрессии гетерологичных генов. Последний зависел от эффективности области инициации трансляции (Translation Initiation Region - TIR). Эта область включала в себя, помимо общей для всех генов, нетранслируемой последовательности перед ATG-кодоном (~ 25 нуклеотидов, последовательность Шайна-Далгарно гена  $\phi 10$  фага T7 и так называемый трансляционный энхансер ( $RBS_{\phi 10}$ ) (Olins, Rangwala, 1989)), различающуюся 5'-область кодирующей рамки (~ 35 нуклеотидов). Количественная оценка эффективности трансляции клонированных генов была проведена с помощью UTR Designer (Seo et al., 2014). Действительно, оказалось, что TIR конструкции  $RBS_{\phi 10}$ -*asbF* могла обеспечивать в пять и четыре раза более высокую трансляцию по сравнению с TIR  $RBS_{\phi 10}$ -*qsuB* и  $RBS_{\phi 10}$ -*qa-4*, соответственно.

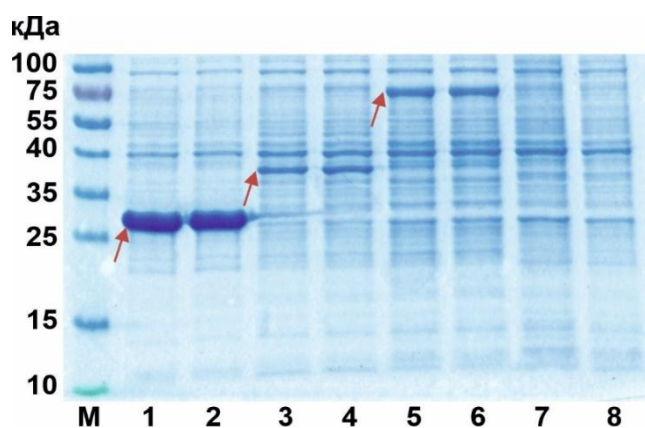


Рисунок 3.11 – SDS-PAGE белков из грубых экстрактов клеток *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*DSD*

Красные стрелки указывают на целевой белок. Дорожка: 1–2 – AsbF, 3–4 – Qa-4, 5–6 – QsuB, 7–8 – отрицательный контроль без DSD. Общая концентрация белка на каждой дорожке была равна 10 мкг.

AsbF, Qa-4 и QsuB были очищены как рекомбинантные DSD с С-концевой His-tag меткой. Полученные образцы белков использовали для анализа активности DSD.

### 3.6.2 Сравнительный анализ металлических кофакторов AsbF, Qa-4 и QsuB

Сравниваемые очищенные белки тестировали на активность DSD после обработки ЭДТА, в присутствии  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  (Рисунок 3.12). Как и QsuB, AsbF и Qa-4 не проявляли активности DSD после обработки ЭДТА. В отличие от QsuB, AsbF и Qa-4 были более активны в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$ , что соответствовало литературным данным (Таблицы 1.1 и 1.3).

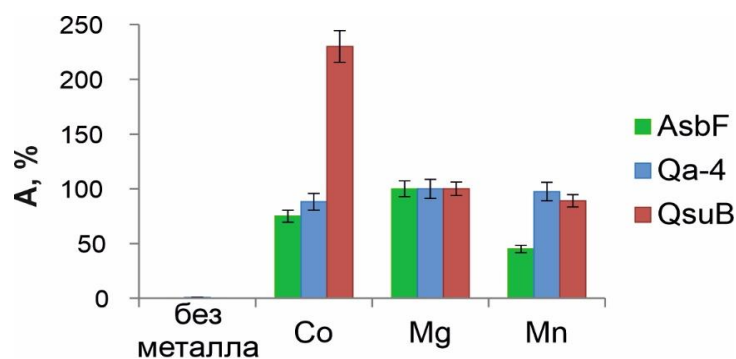


Рисунок 3.12 – Специфическая активность (A) AsbF, Qa-4 и QsuB в присутствии 10 мМ ионов металлов (pH 7,5; 20°C)

A выражена в процентах от активности в присутствии  $\text{MgCl}_2$ .

Дальнейшие эксперименты *in vitro* проводили с предпочтительным для каждого фермента кофактором.

### 3.6.3 Сравнение кинетических свойств дегидрошикиматдегидратаз

Для сравнения ферментов проводили измерения их активности при комнатной температуре, т.к. AsbF и Qa-4 были термолабильными (см. п. 1.3.1, 1.3.3). Активности QsuB и Qa-4 превышали активность AsbF на один и два порядка соответственно (Рисунок 3.13). Различие в уровнях активностей повлияло на расчетные характеристики ферментов (Таблица 3.3).



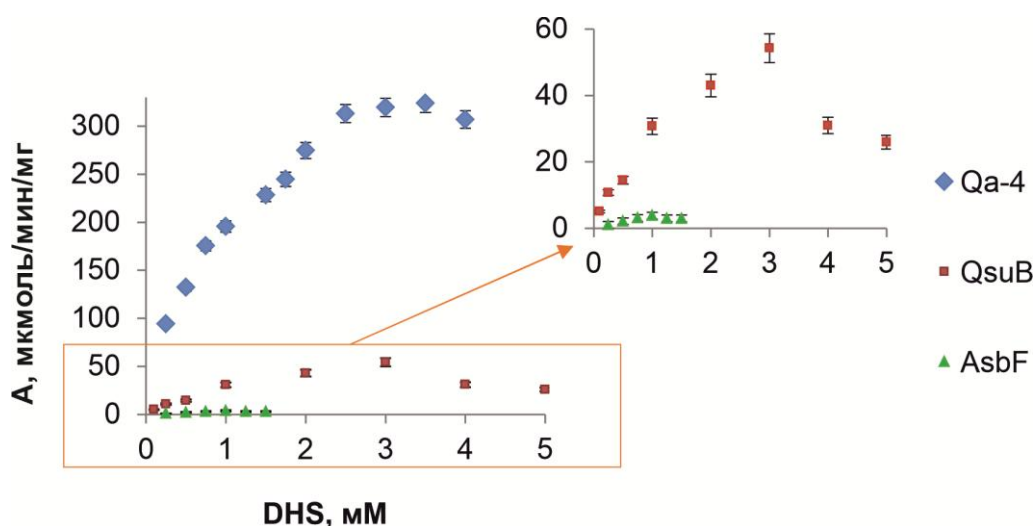


Рисунок 3.13 – Кинетические кривые Qa-4, QsuB и AsbF (pH 7,5; 20 °C)

Измерения проводили в трёх повторностях. Оранжевой рамкой выделен участок, увеличенный справа.

Каталитическая константа  $k_{cat}$  Qa-4 составила  $\sim 220 \text{ c}^{-1}$ , что в  $\sim 3,5$  и  $\sim 200$  раз выше, чем у QsuB и AsbF, соответственно. Субстратная специфичность Qa-4 ( $K_m \sim 600 \text{ мкМ}$ ) была значительно хуже, чем у AsbF ( $K_m \sim 40 \text{ мкМ}$ ), и того же порядка, что и у QsuB ( $K_m \sim 960 \text{ мкМ}$ ). Каталитическая эффективность ( $k_{cat} / K_m$ ) Qa-4 была в 6 и 12 раз выше, чем у QsuB и AsbF, соответственно. Ферменты, Qa-4 и QsuB, относящиеся к катаболическому пути, были более активны, чем AsbF, участвующий в биосинтезе сидерофора. Как и следовало ожидать, последний работал при более низких концентрациях субстрата. Следует отметить, что при сравнении характеристик Qa-4 и AsbF, определённым ранее (Таблицы 1.1 и 1.3), можно было сделать такой же вывод.

Таблица 3.3 – Каталитические свойства DSD (pH 7,5; 20 °C)

Фермент	$K_m$ (DHS), мкМ	$k_{cat}$ , $\text{c}^{-1}$	$k_{cat} / K_m$ , $10^{-3} / \text{мкМ} / \text{c}$
Qa-4	$600 \pm 20$	$219 \pm 1$	$370 \pm 70$
QsuB	$960 \pm 80$	$61 \pm 1$	$60 \pm 12$
AsbF	$36 \pm 7$	$1,1 \pm 0,1$	$29 \pm 7$

### 3.6.4 Сравнительный анализ ферментов по ингибированию продуктом реакции

AsbF и Qa-4 не исследовались ранее на предмет ингибирования продуктом и субстратом реакции. Однако эти параметры могли быть полезными при выборе фермента для микробиологического синтеза 3,4-DHBA. Из Рисунка 3.14 видно, что Qa-4 и AsbF ингибируются 3,4-DHBA. Последний ингибировался продуктом реакции при более низкой концентрации, чем другие ферменты. AsbF терял более половины своей каталитической активности уже в присутствии 0,1 мМ 3,4-DHBA. Ингибирование QsuV и Qa-4 происходило при концентрациях 3,4-DHBA одного порядка. Активность Qa-4 практически не менялась до 0,4 мМ 3,4-DHBA (снижение < 10 %). QsuV демонстрировал значительную потерю активности (~ 42 %) при 0,2 мМ 3,4-DHBA.

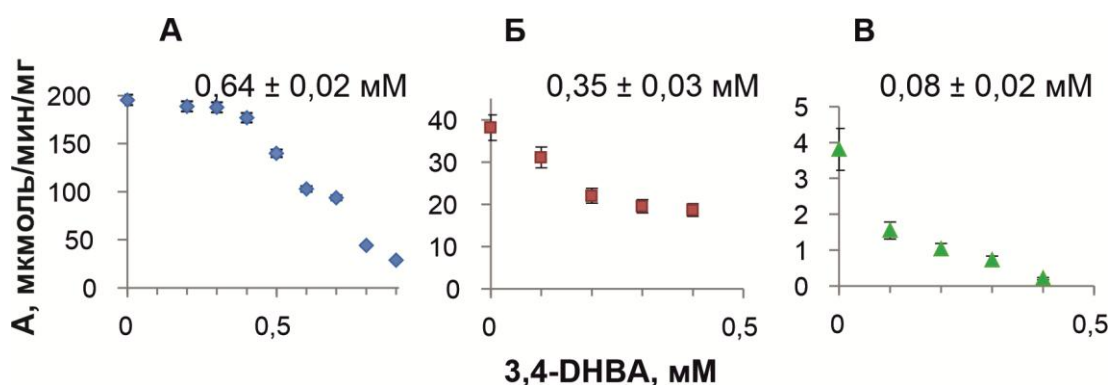


Рисунок 3.14 –Профили ингибирования Qa-4 (А), QsuV (Б) и AsbF (В) 3,4-DHBA. Значения IC<sub>50</sub> указаны в верхней части графиков.

Ингибирование AsbF с помощью 3,4-DHBA было косвенно подтверждено данными рентгеноструктурного анализа (см. п. 1.3.3). В частности, 3,4-DHBA настолько прочно связывался с AsbF, что «случайно» был обнаружен в активном центре этого фермента. Это обстоятельство позволило локализовать активный/связывающий центр AsbF (там же). Для сравнения аминокислотных остатков активных центров были использованы 3D-модели AsbF, QsuV и Qa-4. Активные центры были попарно наложены друг на друга (Рисунок 3.15). Очевидно, что активные центры катаболических ферментов имели большее

сходство между собой, чем с AsbF. Активные центры QsuV и Qa-4 включали 10 а.о., тогда как AsbF – 11. Отсутствующий у катаболических ферментов остаток Tyr217 локализовался в участке аминокислотной последовательности, «пропущенной» у других анализируемых DSD, что отчетливо видно при выравнивании их последовательностей (Рисунок 3.16). В активном центре AsbF гидроксильная группа Tyr217 имела непосредственный контакт с 3,4-DHBA (см. п. 1.3.3). Как видно из наложений AsbF и QsuV (А) и AsbF и Qa-4 (Б), Tyr217 визуально «закрывал» 3,4-DHBA в активном центре AsbF.

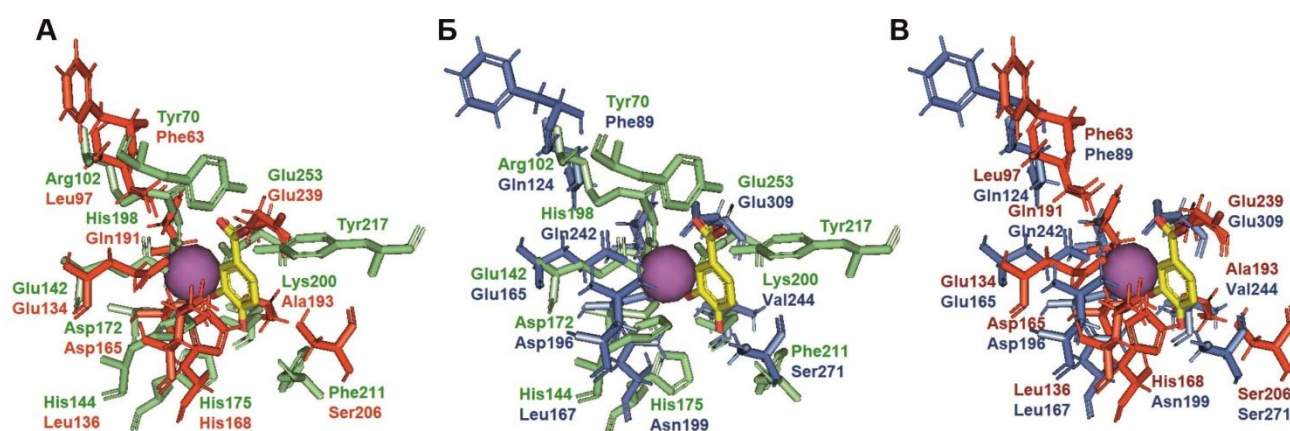


Рисунок 3.15 – Сравнительный анализ активных центров: AsbF и QsuV (А); AsbF и Qa-4 (Б); QsuV и Qa-4 (В)

Положения 3,4-DHBA (желтый цвет) и  $Mn^{2+}$  (фиолетовый шар) были смоделированы на основе кристаллической структуры AsbF (PDB: 3DX5). Остатки зеленого, синего и красного цветами соответствуют AsbF, Qa-4 и QsuV, соответственно.

Отсутствие аналога Tyr217 уже могло быть указанием на то обстоятельство, что 3,4-DHBA может легче выходить из активных центров QsuV и Qa-4. Но были и другие отличия. По данным Флегера с соавт. (2008), 3,4-DHBA в AsbF была окружена другими а.о., Phe255, Phe104, His144, с объемными боковыми цепями, из которых только Phe255 был консервативен в QsuV и Qa-4 (Рисунок 3.16). Если сравнивать катаболические ферменты по сходству с AsbF, то только три остатка (Glu142, Asp172 и Glu253) были консервативны в Qa-4 и четыре (Glu142, Asp172, His175 и Glu253) в QsuV (Рисунки 3.15 А и Б). Общие у трех ферментов остатки

отвечали за координацию металлического кофактора, тогда как His175 в AsbF имел непосредственный контакт с 3,4-DHBA (см. п. 1.3.3).

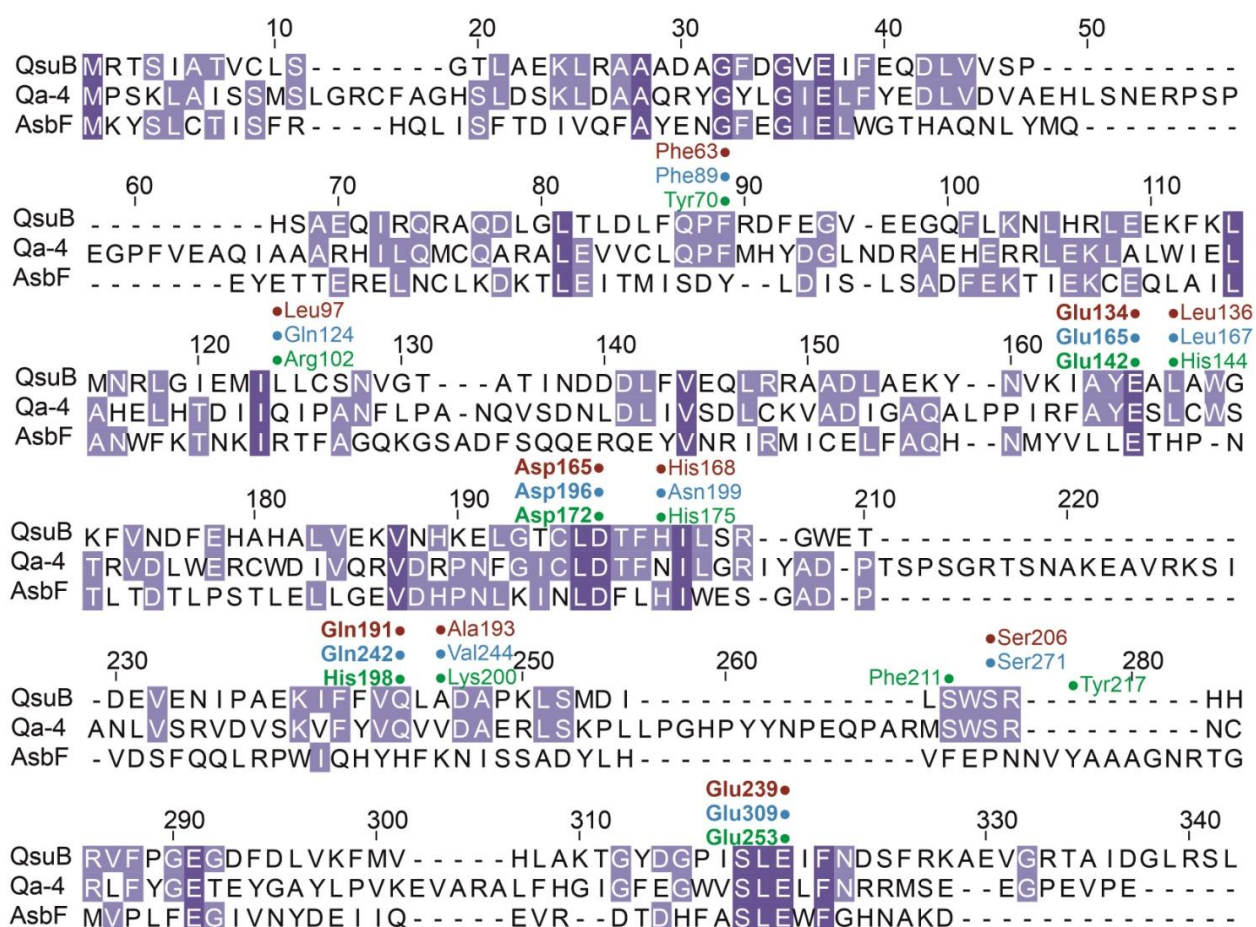


Рисунок 3.16 – Сравнение N-QsuB с однодоменной грибной Qa-4 и бактериальной AsbF

Аминокислотные остатки активных центров QsuB, Qa-4 и AsbF обозначены над выравниванием красным, синим и зеленым цветами, соответственно. Остатки, участвующие в связывании иона металла выделены жирным шрифтом.

Таким образом, обнаруженные различия в структуре активного центра могли объяснять разные каталитические свойства ферментов, в том числе и разницу в ингибировании фермента продуктом реакции. В частности, активный центр QsuB имел немного больше сходства по консервативным остаткам с AsbF, чем Qa-4.

### 3.6.5 Температурный оптимум QsuB по сравнению с AsbF и Qa-4

Для сравнения температурной зависимости дегидрошикиматдегидратаз мы использовали литературные данные для AsbF и Qa-4 и вновь полученные для QsuB.

Термостабильность QsuB тестировали при 46 °C, температуре при которой была показана термолабильность AsbF и Qa-4. Было так же известно, что термолабильность последних ферментов снижалась в присутствии ионов металлов. Поэтому для инкубации QsuB были выбраны наиболее жёсткие условия: в присутствии ЭДТА и без добавления  $\text{Co}^{2+}$ . Как видно из Рисунка 3.17А,  $t^{1/2}$  составляло ~ 40 мин, что заметно превышало время потери половины активности для Qa-4 и AsbF (Таблица 3.4). Мы также наблюдали сохранение 30 % активности QsuB в течении 120 мин, тогда как Qa-4 и AsbF полностью инактивировались в течение ~ 15 и 90 мин, соответственно (Strøman, Reinert, Giles, 1978; Harrington et al., 2017). Таким образом, QsuB был достаточно устойчив к термической денатурации даже без добавления ионов двухвалентных металлов.

Температурный оптимум QsuB находился в пределах 23 – 25 °C (Рисунок 3.17Б), что соответствовало нижней температурной границе роста *C. glutamicum* (25 – 37 °C) (Leszczewicz, Walczak, 2019). Термолабильность Qa-4 может быть способом регуляции потока DHS между биосинтетическим и катаболическим путем в ответ на изменение условий среды. Известно, что уровень мРНК генов центрального метаболизма зависит от температуры (Ohnishi et al., 2003). Возможно, температурный оптимум QsuB обусловлен предпочтительностью DHS, как субстрата для катаболического пути при низких температурах, для получения метаболитов ТСА в условиях, когда их синтез сокращён.

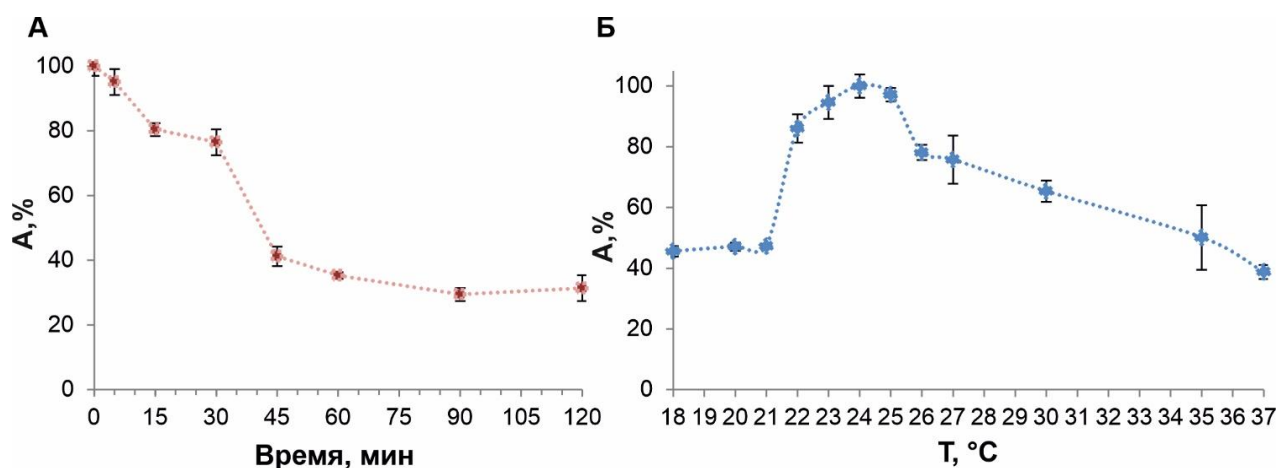


Рисунок 3.17 – Специфическая активность QsuB при 46 °C (А) и в зависимости от температуры (Б)

А. Определение термостабильности QsuB. Инкубацию проводили в присутствии ЭДТА без добавления  $Co^{2+}$  (добавлен непосредственно перед измерением активности) при физиологическом pH 7,5. Б. Определение температурного оптимума QsuB.

Таблица 3.4 – Термостойчивость различных DSD

Фермент	Qa-4		AsbF			QsuB	
T °C	47		46	37		46	
ЭДТА	+	-	не указано	-		+	
Кофактор	25 mM MgCl <sub>2</sub>		-	7,5 mM MgCl <sub>2</sub>	10 мкМ MnCl <sub>2</sub>	-	
t <sup>1/2</sup> , мин	< 5	100	~ 10	~ 15	~ 20	~ 90	~ 40
Источник	Strøman, Reinert, Giles, 1978		Fox et al., 2008	Harrington et al., 2017		Данная работа	

### 3.6.6 Продукция 3,4-DHBA в *E. coli* с помощью AsbF, Qa-4 и QsuB

Для сравнения активностей дегидрошикиматдегидратаз *in vivo* использовали тот же подход, что и для сравнения QsuB и N-QsuB. Гены *asbF* и *qa-4* были интегрированы в хромосому MG1655Δ*aroE*. Изогенные штаммы MG1655Δ*aroE* P<sub>lacUV5-*asbF*</sub>, MG1655Δ*aroE* P<sub>lacUV5-*qsuB*</sub> и MG1655Δ*aroE* P<sub>lacUV5-*qa-4*</sub> культивировали в пробирочной ферментации (Таблица 3.5). Для полной индукции



генов дегидрошикиматдегидратаз добавляли ИПТГ. Штамм MG1655 $\Delta$ aroE  $P_{lacUV5}$ -*asbF* продуцировал 0,2 г/л 3,4-DHBA только в присутствии ИПТГ. Штаммы MG1655 $\Delta$ aroE  $P_{lacUV5}$ -*qsuB* и MG1655 $\Delta$ aroE  $P_{lacUV5}$ -*qa-4* накапливали ~ 1 и 2 г/л 3,4-DHBA без индукции и ~ 2,7 г/л при добавлении ИПТГ. Все штаммы также накапливали DHS в количествах, обратно пропорциональных синтезируемой 3,4-DHBA.

Таблица 3.5 –Продукция 3,4-DHBA из глюкозы (40 г/л) в пробирках

Штамм	ОП <sub>540</sub>	DHS, г/л	3,4-DHBA, г/л	Глю (44ч), г/л	1 мМ ИПТГ
MG1655 $\Delta$ aroE					
-	31 ± 1	3,3 ± 0,1	<0,1	10,0 ± 0,3	+
-	31 ± 1	3,4 ± 0,2	<0,1	9,5 ± 0,2	-
$P_{lacUV5}$ - <i>asbF</i> <sub>φ80attB</sub>	31 ± 1	2,3 ± 0,1	0,20 ± 0,01	9,5 ± 0,1	+
	30 ± 1	2,3 ± 0,1	<0,1	9,9 ± 0,3	-
$P_{lacUV5}$ - <i>qsuB</i> <sub>φ80attB</sub>	30 ± 1	0,2 ± 0,1	2,7 ± 0,2	11,0 ± 1,5	+
	30 ± 1	2,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	10,2 ± 0,2	-
$P_{lacUV5}$ - <i>qa-4</i> <sub>φ80attB</sub>	29 ± 1	0,2 ± 0,1	2,7 ± 0,1	12,0 ± 0,8	+
	29 ± 1	0,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	11,0 ± 0,4	-

Низкая продукция 3,4-DHBA для штамма MG1655 $\Delta$ aroE  $P_{lacUV5}$ -*asbF*, была обусловлена ингибированием фермента продуктом реакции. Уровень трансляции RBS $_{lacUV5}$ -*asbF* был в 6 и 5 раз выше, чем RBS $_{lacUV5}$ -*qa-4* и RBS $_{lacUV5}$ -*qsuB*, соответственно. Штаммы, экспрессирующие QsuB и Qa-4, демонстрировали одинаковую продукцию 3,4-DHBA при добавлении ИПТГ и практически не накапливали DHS в этих условиях. Это означало, что более высокие каталитические свойства Qa-4 могли не проявиться в штамме MG1655 $\Delta$ aroE из-за недостаточного синтеза предшественника DHS. Штамм MG1655 $\Delta$ aroE, использованный в этом исследовании, не содержал каких-либо модификаций, усиливающих ароматический путь.

### 3.6.7 Продукция 3,4-DHBA в *C. glutamicum* с помощью AsbF, Qa-4 и QsuB

Для сравнения активности дегидрошикиматдегидратаз в *C. glutamicum* был сконструирован модельный продуцент K118 с инактивированной деградацией 3,4-DHBA ( $\Delta$ *psaHG*) и делецией основной шикиматдегидрогеназы *aroE3* (Kubota et al., 2013) ( $\Delta$ *aroE*). K118 содержал нативный ген *qsuB* в хромосоме. Гены DSD были клонированы в векторе pVK9-*lacI* под контролем ИПТГ-индуцибельного промотора  $P_{trc-id2}$ . При этом RBS для каждой DSD, был подобран таким образом, чтобы обеспечивать одинаковую эффективность трансляции. Ферментацию проводили до полного потребления глюкозы (Таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Продукция 3,4-DHBA в *C. glutamicum* K118 (Глю – 50 г/л) в пробирках

№	Плаزمида	ОП <sub>540</sub>	DHS, г/л	3,4-DHBA, г/л	Время культивирования, ч (Глю – 0 г/л)	1 мМ ИПТГ
1	pVK9	85±1	0,6±0,1	0,7±0,1	24	
2	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>asbF</i>	84±1	0,6±0,1	0,7±0,1	24	
3	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>qa-4</i>	81±1	0,5±0,1	0,6±0,1	24	–
4	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>qsuB</i>	90±1	<0,1	2,7±0,1	24	
5	pVK9	85±1	0,5±0,1	0,7±0,1	24	
6	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>asbF</i>	84±2	0,2±0,1	1,5±0,3	24	
7	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>qa-4</i>	83±3	0,2±0,1	1,2±0,1	24	+
8	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>qsuB</i>	62±2	<0,1	2,2±0,2	29	
9	pVK9/pVS7	84±6	0,5±0,1	0,6±0,1	24	
10	pVK9/pVS7- <i>aroG4</i>	87±1	0,8±0,1	0,7±0,1	24	
11	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>asbF</i> /pVS7- <i>aroG4</i>	83±2	0,3±0,1	1,3±0,1	24	+
12	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>qa-4</i> /pVS7- <i>aroG4</i>	86±1	0,3±0,1	1,4±0,2	24	
13	pVK9- <i>lacI</i> - $P_{trc-id2}$ - <i>qsuB</i> /pVS7- <i>aroG4</i>	82 ±6	<0,1	2,7±0,1	27	



Штамм K118, содержащий вектор pVK9, накапливал ~ 0,6 г/л DHS и ~ 0,7 г/л 3,4-DHBA в течение 24 часов. Без индукции AsbF и Qa-4 не проявляли свою активность, т.к. продукция 3,4-DHBA в соответствующих штаммах (Таблица 3.6, строки 2, 3) не увеличивалась. Плазмидный штамм с QsuV продуцировал около 3 г/л без добавления ИПТГ (там же, строка 4). После добавления ИПТГ в случае AsbF и Qa-4 накопление 3,4-DHBA возрастало до 1,2 – 1,5 г/л, а в случае с QsuV – снижалось до 2 г/л. Уменьшение титра 3,4-DHBA после добавления ИПТГ было обусловлено медленным накоплением биомассы.

AsbF и Qa-4 были введены в *C. glutamicum* без оптимизации кодонов для этой бактерии. Согласно таблицам частоты встречаемости кодонов (Nakamura, Gojobori, Ikemura, 2000), наиболее существенная разница наблюдается в кодоне лейцина (UUA), который является редким для *C. glutamicum*. В результате анализа последовательностей *asbF*, *qa-4* и *qsuB* было обнаружено, что среди всех кодонов лейцина триплет UUA встречается в *qa-4* и *asbF* в ~ 68 и 14 % случаев, соответственно, а в *qsuB* всего лишь в 3 %. Поэтому сравнение Qa-4 с QsuV по продукции 3,4-DHBA в клетках *C. glutamicum* было недостоверным ввиду неоптимальной экспрессии Qa-4.

Штамм с QsuV, очевидно, имел высокую активность DSD даже без добавления ИПТГ, видимо, за счет «подтекания» промотора перед геном *qsuB* на плазмиде. После добавления ИПТГ активность QsuV возрастала, что, видимо, приводило к ещё большему дефициту DHS и, как следствие, к дефициту менахинона. Как и в случае других аэробных грамположительных бактерий, единственный хинон, присутствующий в *C. glutamicum*, — это менахинон (Collins, Goodfellow, Minnikin, 1979; Collins et al., 1977; Hederstedt, 1993). Дегидрогеназы *C. glutamicum*, которые переносят электроны в дыхательную цепь, используют его в качестве основного акцептора (Eggeling, Bott, 2005). Менахинон синтезируется из СНА. В модельном продуценте присутствовали две минорные шикиматдегидрогеназы QsuD (Cgl0424,  $K_m > 2$  мМ (Kubota et al., 2013)) и AroE2 (Cgl1132), которые обеспечивали базальный уровень СНА для синтеза менахинона без добавления ИПТГ. Введение в исследуемые штаммы плазмиды

pVS7-*aroG4* с геном ДАНП-синтазы *E. coli* AroG4, устойчивой к ингибированию фенилаланином (Kikuchi, Tsujimoto, Kurahashi, 1997), увеличивало количество DHS в контрольном штамме примерно на 40 % (Таблица 3.6, строка 10). Рост клеток в штамме с плазмидой pVK9-*lacI*-P<sub>trc-id2</sub>-*qsuB* восстанавливался, но не полностью, судя по увеличенному времени культивирования до полного потребления глюкозы (Таблица 3.6, строка 13). Примесь DHS отсутствовала, а накопление 3,4-DHBA было таким же, как у исходного штамма без добавления ИПТГ. Очевидно, что штамм №13 имел потенциал к накоплению 3,4-DHBA после дополнительного увеличения синтеза DHS.

В присутствии плазмиды pVS7-*aroG4* штаммы, экспрессирующие AsbF и Qa-4, продуцировали примерно такое же количество 3,4-DHBA, как и без этой плазмиды (Таблица 3.6, строки 11, 12). Примесь DHS немного увеличилась, что свидетельствовало о недостаточной активности обоих ферментов. Если в случае с Qa-4 недостаточная активность была вызвана неоптимизированной экспрессией, то в случае с AsbF причиной могло быть ингибирование фермента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выбор фермента, совмещённый с выбором микроорганизма-хозяина для получения целевого соединения микробиологическим способом, является необходимой стадией при конструировании продуцента.

В работе изучалась связь каталитических свойств фермента и его способности к получению продукта реакции в клетках бактерий на примере дегидрошикиматдегидратаз, вновь охарактеризованной QsuB из *C. glutamicum* и отличающихся от неё по структуре AsbF из *B. thuringiensis* и Qa-4 из *N. crassa*.

На основании определённых биохимических характеристик мы пришли к выводу, что природная функция фермента, участие в катаболизме хината/шикимата или биосинтезе сидерофора, определяет его свойства. Для ферментов катаболизма низкое сродство к субстрату 3-дегидрошикимату обеспечивает его доступность для синтеза ароматических аминокислот и других ароматических соединений, которые образуются из хоризмата. Биосинтетический AsbF имел сродство к субстрату сравнимое и даже более низкое, чем шикиматдегидрогеназы ( $K_m \sim 100 - 200 \text{ мкМ}$ ). Этот фермент ингибировался 3,4-DHBA ( $IC_{50} \sim 0,08 \text{ мМ}$ ), чтобы не допустить переизбытка этого продукта и обеспечить синтез ароматических соединений.

Высокая специфическая активность Qa-4 и QsuB, наряду с менее выраженным ингибированием конечным продуктом, были решающими для достижения более высоких титров 3,4-DHBA в сконструированных модельных продуцентах на основе *E. coli* и *C. glutamicum*. В целом, можно порекомендовать катаболические DSD для получения 3,4-DHBA микробиологическим способом, а биосинтетический AsbF для конструирования путей получения других продуктов, производных 3,4-DHBA.

Что касается выбора бактерии-хозяина для производства 3,4-DHBA, то *C. glutamicum* обладает рядом преимуществ перед *E. coli*.

Полисахариды клеточной стенки *E. coli* могут быть причиной аллергии у человека и животных. *C. glutamicum* обладает статусом GRAS (Generally

Recognized as Safe), то есть считается безопасной для орального использования человеком и животными. Во-вторых, эта бактерия обладает, как правило, более высокой устойчивостью к различным соединениям, чем *E. coli*. Это может быть обусловлено различиями в метаболизме, как нами было показано на примере устойчивости к саркозину (Doroshenko et al., 2023). В наших опытах штамм *C. glutamicum* накапливал больше биомассы и обеспечивал продукцию 3,4-ДНВА за более короткое время, что делает его более перспективным для дальнейшей оптимизации.

## ВЫВОДЫ

1. QsuB из *C. glutamicum* относится к двудоменным ферментам. Домен N-QsuB ответственен за дегидрошикиматдегидратазную активность ( $k_{cat}$   $23,4 \pm 0,4$  с<sup>-1</sup>). С-концевой домен необходим для олигомеризации и максимальной активности фермента ( $k_{cat}$   $60,8 \pm 0,9$  с<sup>-1</sup>).

2. Определены биохимические характеристики QsuB: зависимость от металла-кофактора, с предпочтением к  $Co^{2+}$ ;  $K_m$   $960 \pm 80$  мкМ;  $k_{eff}$   $(60 \pm 12) \times 10^{-3}$  /мкМ/с;  $T_{оптим}$  23 – 25 °С;  $pH_{оптим}$  8,0 – 8,4; смешанный тип ингибирования продуктом реакции.

3. Проведено сравнение *in vitro* QsuB с однодоменными ферментами: Qa-4 из *N. crassa* и AsbF из *B. thuringiensis*. Ферменты катаболизма хината/шикимата QsuB и Qa-4 имели на порядок более высокие  $k_{cat}$  и  $K_m$  и были менее подвержены ингибированию 3,4-ДНВА ( $IC_{50}$   $0,35 \pm 0,03$ ;  $0,64 \pm 0,02$  мМ), чем биосинтетический AsbF ( $IC_{50}$   $0,08 \pm 0,02$  мМ).

4. С использованием QsuB, Qa-4 и AsbF продемонстрировано получение продукции 3,4-ДНВА в штаммах *E. coli* (~ 3; 3 и 0,2 г/л) и *C. glutamicum* (~ 3; 1,5 и 1,5 г/л).

5. Модельный продуцент на основе *C. glutamicum* накапливал больше биомассы и обеспечивал продукцию 3,4-ДНВА за более короткое время, чем *E. coli*, что свидетельствует о перспективности *C. glutamicum* в качестве платформы для получения 3,4-ДНВА.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

$\Delta G$  – изменение энергии Гиббса

$\epsilon$  – коэффициент экстинкции

3,4-DHBA – 3,4-дигидроксibenзойная, или протокатеховая кислота

4ADCL – 4-амино-4-дезоксихоризматлиаза

4-HBA – 4-гидроксibenзойная кислота

A – специфическая активность

a.o. – аминокислотный остаток

АТФ – аденозинтрифосфат

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Глю – глюкоза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

КоА – кофермент А

мРНК – матричная РНК

ОП – оптическая плотность

опт. – оптимальный

п. н. – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

темп. – температура

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан

УФ – ультрафиолет

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ААА – ароматические аминокислоты

АСАР – редуктаза ароматических карбоновых кислот

ADCS – аминокислотдезоксихоризматсинтаза

Ar, Ar<sup>R</sup> – ампициллин, маркер устойчивости к ампициллину

Apr, Apr<sup>R</sup> – апрамицин, маркер устойчивости к апрамицину  
 BHI – Brain Heart Infusion/сердечно-мозговой экстракт  
 СНА – хоризмовая кислота  
 $\beta$ -СМА –  $\beta$ -карбокситрис,трис-муконовая кислота  
 ссМА – трис,трис-муконовая кислота  
 CL – катехол  
 CLDO – катехол-1,2-диоксигеназа  
 Cm, Cm<sup>R</sup> – хлорамфеникол, маркер устойчивости к хлорамфениколу  
 COMT – катехол-О-метилтрансфераза;  
 СРЕС – “клонирование с помощью кругового полимеразного удлинения”  
 ДАНР – 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат  
 DHS – 3-дегидрошикимовая кислота  
 DHQ – 3-дегидрохинная кислота  
 DSD – дегидрошикиматдегидратаза  
 Е4Р – эритрозо-4-фосфат  
 EPSP – 5-енол-пирувил-шикимат-3-фосфат  
 fbr – feedback-resistant/устойчивый к ингибированию по типу обратной связи  
 G6P – глюкозо-6-фосфат  
 Gm, Gm<sup>R</sup> – гентамицин, маркер устойчивости к гентамицину  
 GRAS – Generally Recognized as Safe/в целом признано безопасным  
 His-tag – гексагистидиновая метка  
 HPPD – 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназа  
 IC<sub>50</sub> – константа полумаксимального ингибирования  
 ИСНА – изохоризмовая кислота  
 ICS – изохоризматсинтаза  
 IPL – изохоризматпируватлиаза  
 $k_{cat}$  – каталитическая константа  
 $K_{eff}$  – константа эффективности  
 $K_i$  – константа ингибирования фермента  
 $K'_i$  – константа ингибирования фермент-субстратного комплекса

$K_m$  – константа Михаэлиса-Ментен

$K_m$ ,  $K_m^R$  – канамицин, маркер устойчивости к канамицину

LB – Lysogeny Broth

L-Trp – L-триптофан

L-Tyr – L-тирозин

L-Phe – L- фенилаланин

LTTR – регулятор транскрипции типа LysR

MFS – Major Facilitator Superfamily/основное суперсемейство переносчиков

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

NRPS - нерибосомальная пептидная синтетаза

pABA – пара-аминобензойная кислота

PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле

PCAD – 3,4-DHBA-декарбоксилаза

PCADO – 3,4-DHBA-3,4-диоксигеназа

PDB – Protein Data Bank

PEP – фосфоенолпируват

PTS – фосфотрансферазная система

PYR – пируват

RBS – сайт связывания рибосомы

S3P – шикимат-3-фосфат

SA – 2-гидроксибензойная, или салициловая кислота

SD – стандартное отклонение

SDS – додецилсульфат натрия

SEC – эксклюзионная хроматография

SHK – шикимовая кислота

SOB – Super Optimal Broth

SOC – Super Optimal broth with Catabolite repression

sp. – вид

Spe,  $Spe^R$  – спектиномицин, маркер устойчивости к спектиномицину

spp. – виды



$t^{1/2}$  – время, за которое фермент теряет половину активности

TCA – цикл трикарбоновых кислот

Tet, Tet<sup>R</sup> – тетрациклин, маркер устойчивости к тетрациклину

TIM – триозофосфатизомераза

TIR – Translation Initiation Region/область инициации трансляции

QA – хинная кислота

Van – ванилин

VanA – ванилиновая кислота

$v$  – скорость реакции

$V_0$  – объем пустой колонки

$V_e$  – объем элюции

$V_{max}$  – максимальная скорость реакции

VOC – Vicinal Oxygen Chelate/хелаторы вицинального кислорода

XYL – ксилоза

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дорошенко В.Г., Лившиц В.А., Айрих Л.Г., Шмагина И.С., Саврасова Е.А., Овсиенко М.В., Машко С.В. Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для продукции фенилаланина и родственных соединений // Биотехнология. – 2014. – Т. 30. – № 4. – С. 8-27.
2. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме // Молекулярная Биология. – 2005. – Т.39. – № 5. – С. 823-831.
3. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Гусятинер М.М., Зиятдинов М.Х., Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., Дорошенко В.Г., Машко С.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* // Патент РФ 2229513 (27.05.2004). – 9 с.
4. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д.; пер. с англ. под ред. Баева А.А., Скрябина К.Г. – М.: Мир, 1984, 480 с.
5. Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Бирюкова И.В., Машко С.В. Введение симметричного *Olac-ideal* в область между «-35» и «-10» гибридного промотора *P<sub>trc</sub>/Olac* значительно увеличивает эффективность его репрессии белком *LacI* // Биотехнология. – 2006. – №. 3. – С. 6-16.
6. Abergel R.J., Wilson M.K., Arceneaux J.E., Hoette T.M., Strong R.K., Byers B.R., Raymond K.N. Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Т. 103. – №. 49. – С. 18499-18503.
7. Abergel R.J., Zawadzka A.M., Raymond K.N. Petrobactin-mediated iron transport in pathogenic bacteria: coordination chemistry of an unusual 3,4-catecholate/citrate siderophore // Journal of the American Chemical Society. –2008. – Т. 130. – №. 7. – С. 2124-2125.

8. Achterholt S., Priefert H., Steinbüchel A. Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2000. – T. 54. – C. 799-807.
9. Averesch N.J.H., Krömer J.O. Tailoring strain construction strategies for muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* // *Metabolic engineering communications*. – 2014. – T. 1. – C. 19-28.
10. Averesch N.J.H., Krömer J.O. Metabolic engineering of the shikimate pathway for production of aromatics and derived compounds-present and future strain construction strategies // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2018. – T. 6. – №. 32.
11. Averesch N.J.H., Winter G., Krömer J.O. Production of p-aminobenzoic acid from different carbon-sources in engineered *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbial Cell Factories*. – 2016. – T. 15. – №. 89.
12. Barghini P., Di Gioia D., Fava F., Ruzzi M. Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions // *Microbial Cell Factories*. – 2007. – №. 13.
13. Barker J.L., Frost J.W. Microbial synthesis of p-hydroxybenzoic acid from glucose // *Biotechnology and bioengineering*. – 2001. – T. 76. – №. 4. – C. 376-390.
14. Becker J., Rohles C.M., Wittmann C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products // *Metabolic engineering*. – 2018. – T. 50. – C. 122-141.
15. Benner S.A., Sismour A.M. Synthetic biology // *Nature reviews. Genetics*. – 2005. – T. 6. – №. 7. – C. 533-543.
16. Bentley R., Haslam E. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches // *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. – 1990. – T. 25. – №. 4. – C. 307-384.
17. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank. // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – T. 28. – №. 1. – C. 235-242.

18. Cankar K., Henke N.A., Wendisch V.F. Functional food additives/ingredients production by engineered *Corynebacterium glutamicum* // *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. – 2023. – T. 3. – C. 110-121.
19. Case M.E., Giles N.H. Gene order in the qa gene cluster of *Neurospora crassa* // *Molecular & general genetics : MGG*. – 1976. – T. 147. – №. 1. – C. 83-89.
20. Cendrowski S., MacArthur W., Hanna P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence // *Molecular microbiology*. – 2004. – T. 51. – №. 2. – C. 407-417.
21. Chaleff R.S. The inducible quinate-shikimate catabolic pathway in *Neurospora crassa*: genetic organization // *Journal of general microbiology*. – 1974. – T. 81. – №. 2. – C. 337-355.
22. Cho J.S., Kim G.B., Eun H., Moon C.W., Lee S.Y. Designing Microbial Cell Factories for the Production of Chemicals // *Journal of the American Chemical Society Au*. – 2022. – T. 2. – №. 8. – C. 1781-1799.
23. Collins M.D., Goodfellow M., Minnikin D.E. Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria // *Journal of general microbiology*. – 1979. – T. 110. – №. 1. – C. 127-136.
24. Collins M.D., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin D.E. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria// *Journal of general microbiology*. – 1977. – T. 100. – №. 2. – C. 221-230.
25. Dal S., Steiner I., Gerischer U. Multiple operons connected with catabolism of aromatic compounds in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are under carbon catabolite repression // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – T. 4. – №. 4. – C. 389-404.
26. Daré R.G., Oliveira M.M., Truiti M.C.T., Nakamura C.V., Ximenes V.F., Lautenschlager S.O.S. Abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters, ethyl and heptyl protocatechuates, to counteract UVB-induced oxidative injuries and photoaging in fibroblasts L929 cell line // *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. – 2020. – T. 203. – №. 111771.

27. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – T. 97. – №. 12. – C. 6640-6645.
28. Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist // *Nucleic acids research*. – 2008. – T. 36. – №. Web Server issue. – C. W465-W469.
29. Di Gioia D., Luziatelli F., Negroni A., Ficca A.G., Fava F., Ruzzi M. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid // *Journal of biotechnology*. – 2011. – T. 156. – №. 4. – C. 309-316.
30. Doroshenko V.G., Slesareva A.E., Shmonova E.A., Kivero A.D. Sarcosine sensitivity in *Escherichia coli* is mediated by activation of the glycine cleavage system // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2023. – T. 87. – №. 8. – C. 916-924.
31. Draths K.M., Frost J.W. Environmentally Compatible Synthesis of Catechol from D-Glucose // *Journal of the American Chemical Society*. – 1995. – T. 117. – №. 9. – C. 2395-2400.
32. Duncan K., Edwards R.M., Coggins J.R. The pentafunctional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains // *The Biochemical journal*. – 1987. – T. 246. – №. 2. – C. 375-386.
33. Duncan K., Edwards R.M., Coggins J.R. The *Saccharomyces cerevisiae* ARO1 gene. An example of the co-ordinate regulation of five enzymes on a single biosynthetic pathway // *FEBS Letters*. – 1988. – T. 241. – №. 1-2. – C. 83-88.
34. Elsemore D.A., Ornston L.N. Unusual ancestry of dehydratases associated with quinate catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus* // *Journal of bacteriology*. – 1995. – T. 177. – №. 20. – C. 5971-5978.
35. Eudes A., Sathitsuksanoh N., Baidoo E.E., George A., Liang Y., Yang F., Singh S., Keasling J.D., Simmons B.A., Loqué D. Expression of a bacterial 3-dehydroshikimate dehydratase reduces lignin content and improves biomass saccharification efficiency // *Plant biotechnology journal*. – 2015. – T. 13. – №. 9. – C. 1241-1250.

36. Gallage N.J., Møller B.L. Vanillin – bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the Vanilla Orchid // *Molecular plant*. – 2015. – T. 8. – №. 1. – C. 40-57.
37. Garner B.L., Arceneaux J.E., Byers B.R. Temperature control of a 3,4-dihydroxybenzoate (protocatechuate)-based siderophore in *Bacillus anthracis*. // *Current microbiology*. – 2004. – T. 49. – №. 2. – C. 89-94.
38. Giles N.H., Case M.E., Baum J., Geever R., Huiet L., Patel V., Tyler B. Gene organization and regulation in the qa (quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa* // *Microbiological reviews*. – 1985. – T. 49. – №. 3. – C. 338-358.
39. Gorshkova N.V., Lobanova J.S., Tokmakova I.L., Smirnov, S.V., Akhverdyan V.Z., Krylov A.A., Mashko S.V. Mu-driven transposition of recombinant mini-Mu unit DNA in the *Corynebacterium glutamicum* chromosome // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2018. – T. 102. – №. 6. – C. 2867-2884.
40. Grant S., Roberts C.F., Lamb H., Stout M., Hawkins A.R. Genetic regulation of the quinic acid utilization (QUT) gene cluster in *Aspergillus nidulans* // *Journal of general microbiology*. – 1988. – T. 134. – №. 2. – C. 347-358.
41. Gross S.R. The enzymatic conversion of 5-dehydroshikimic acid to protocatechuic acid // *The Journal of biological chemistry*. – 1958. – T. 233. – №. 5. – C. 1146-1151.
42. Fanous A., Hecker M., Gorg A., Parlar H., Jacob F. *Corynebacterium glutamicum* as an indicator for environmental cobalt and silver stress—a proteome analysis // *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*. – 2010. – T. 45. – №. 7. – C. 666-675.
43. Follmann M., Ochrombel I., Krämer R., Trötschel C., Poetsch A., Rückert C., Hüser A., Persicke M., Seiferling D., Kalinowski J., Marin K. Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis // *BMC genomics*. – 2009. – T. 10. – №. 621.

44. Fox D.T., Hotta K., Kim C.Y., Koppisch A.T. The missing link in petrobactin biosynthesis: *asbF* encodes a (-)-3- dehydroshikimate dehydratase // *Biochemistry*. – 2008. – Т. 47. – №. 47. – С. 12251-12253.
45. Fuchs G., Boll M., Heider J. Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four // *Nature reviews. Microbiology*. – 2011. – Т. 9. – №. 11. – С. 803-816.
46. Furman B.L. Salicylic acid [Электронный ресурс] // *Reference Module in Biomedical Sciences*. – 2018. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383977584?via%3Dihub> (дата обращения: 23.01.2023).
47. Furuya T., Miura M., Kuroiwa M., Kino K. High-yield production of vanillin from ferulic acid by a coenzyme-independent decarboxylase/oxygenase two-stage process // *New biotechnology*. – 2015. – Т. 32. – №. 3. – С. 335-339.
48. Johnson C.W., Salvachua D., Khanna P., Smith H., Peterson D.J., Beckham G.T. Enhancing muconic acid production from glucose and lignin-derived aromatic compounds via increased protocatechuate decarboxylase activity // *Metabolic engineering communications*. – 2016. – Т. 3. – С. 111–119.
49. *Handbook of Corynebacterium glutamicum* / под ред. Eggeling L., Bott M. – 1st ed. – USA: CRC Press, 2005, 616 с.
50. Hansen E.H., Møller B.L., Kock G.R., Büchner C.M., Kristensen C., Jensen O.R., Okkels F.T., Olsen C.E., Motawia M.S., Hansen J. De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) // *Applied and environmental microbiology*. – 2009. – Т. 75. – №. 9. – С. 2765-2774.
51. Harrington L.B., Jha R.K., Kern T.L., Schmidt E.N., Canales G.M., Finney K.B., Koppisch A.T., Strauss C.E., Fox D.T. Rapid Thermostabilization of *Bacillus thuringiensis* Serovar Konkukian 97–27 Dehydroshikimate Dehydratase through a Structure-Based Enzyme Design and Whole Cell Activity Assay // *ACS synthetic biology*. – 2017. – Т. 6. – №. 1. – С. 120-129.

52. Hawkins A.R., Francisco Da Silva A.J., Roberts C.F. Cloning and characterization of the three enzyme structural genes QUTB, QUTC and QUTE from the quinic acid utilization gene cluster in *Aspergillus nidulans*. // *Current genetics*. – 1985. – T. 9. – №. 4. – C. 305-311.
53. Hawkins A.R., Lamb H.K., Moore J.D., Charles I.G., Roberts C.F. The pre-chorismate (shikimate) and quinate pathways in filamentous fungi: theoretical and practical aspects // *Journal of general microbiology*. – 1993. – T. 139. – №. 12. – C. 2891-2899.
54. Hederstedt L. The Krebs citric acid cycle // *Bacillus subtilis and Other Gram-positive bacteria*; под ред. Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. – 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C. – C. 181-197
55. Herrmann K.M., Weaver L.M. The shikimate pathway // *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. – 1999. – T. 50. – C. 473-503.
56. Hickford S.J., Kupper F.C., Zhang G., Carrano C.J., Blunt J.W., Butler A. Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* // *Journal of natural products*. – 2004. – T. 67. – №. 11. – C. 1897-1899.
57. Hotta K., Kim C.Y., Fox D.T., Koppisch A.T. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains // *Microbiology (Reading)*. – 2010. – T. 156. – №. 7. – C. 1918-1925.
58. Huccetogullari D., Luo Z.W., Lee S.Y. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds // *Microbial Cell Factories*. – 2019. – T. 18. – №. 41.
59. Ikeda M. Lysine Fermentation: History and Genome Breeding // *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. – 2017. – T. 159. – C. 73-102.
60. Ikeda M., Takeno S. Amino acid production by *Corynebacterium glutamicum* // *Corynebacterium glutamicum*; под ред. Yukawa H., Inui M. – Berlin Heidelberg: Springer, 2013. – C. 107-147.



61. Ikeda M., Takeno S. Recent advances in amino acid production // *Corynebacterium glutamicum*. Microbiology Monographs.; под ред. Toyoda K., Inui M. – T. 23. – Berlin Heidelberg: Springer, 2020. – С. 175-226.
62. Jiang M., Zhang H. Engineering the shikimate pathway for biosynthesis of molecules with pharmaceutical activities in *Escherichia coli* // *Current opinion in biotechnology*. – 2016. – T. 42. – С. 1-6.
63. Jimenez J.I., Minambres B., Garcia J.L., Diaz E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440 // *Environmental microbiology*. – 2002. – T. 4. – №. 12. – С. 824-841.
64. Kakkar S., Bais S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential // *ISRN Pharmacology*. – 2014. – T. 2014. – С. 1-9.
65. Kallscheuer N., Marienhagen J. *Corynebacterium glutamicum* as platform for the production of hydroxybenzoic acids // *Microbial Cell Factories*. – 2018. – T. 17. – №. 70.
66. Kaur B., Chakraborty D. Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2013. – T. 169. – №. 4. – С. 1353-1372.
67. Keasling J., Garcia Martin H., Lee T.S., Mukhopadhyay A., Singer S.W., Sundstrom E. Microbial production of advanced biofuels // *Nature reviews. Microbiology*. – 2021. – T. 19. – №. 11. – С. 701-715.
68. Keseler I.M., Gama-Castro S., Mackie A., Billington R., Bonavides-Martínez C., Caspi R., Kothari A., Krummenacker M., Midford P.E., Muñiz-Rascado L., Ong W.K., Paley S., Santos-Zavaleta A., Subhraveti P., Tierrafría V.H., Wolfe A.J., Collado-Vides J., Paulsen I.T., Karp P.D. The EcoCyc Database in 2021 // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – T. 12. – №. 711077.
69. Khan A.K., Rashid R., Fatima N., Mahmood S., Mir S., Khan S., Jabeen N., Murtaza G. Pharmacological activities of protocatechuic acid // *Acta poloniae pharmaceutica*. – 2015. – T. 72. – №. 4. – С. 643-650.
70. Kikuchi Y., Tsujimoto K., Kurahashi O. Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of

*Escherichia coli* // Applied and environmental microbiology. – 1997. – T. 63. – №. 2. – C. 761-762.

71. Kitade Y., Hashimoto R., Suda M., Hiraga K., Inui M. Production of 4-hydroxybenzoic acid by an aerobic growth-arrested bioprocess using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* // Applied and environmental microbiology. – 2018. – T. 84. – №. 6. – C. e02587– e02617.

72. Kitade Y., Hiraga K. Aromatic compound catabolism in *Corynebacterium glutamicum* // *Corynebacterium glutamicum*; под ред. Toyoda K., Inui M. – Berlin Heidelberg: Springer, 2020. – C. 323-337.

73. Kogure T., Inui M. Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction of value-added aromatic chemicals and natural products // Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – T. 102. – №. 20. – C. 8685-8705.

74. Kogure T., Suda M., Hiraga K., Inui, M. Protocatechuate overproduction by *Corynebacterium glutamicum* via simultaneous engineering of native and heterologous biosynthetic pathways // Metabolic engineering. – 2021. – T. 65. – C. 232-242.

75. Koma D., Yamanaka H., Moriyoshi K., Sakai K., Masuda T., Sato Y., Toida K., Ohmoto T. Production of p-aminobenzoic acid by metabolically engineered *Escherichia coli* // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2014. – T. 78. – №. 2. – C. 350-357.

76. Koppisch A.T., Hotta K., Fox D.T., Ruggiero C.E., Kim C.Y., Sanchez T., Iyer S., Browder C.C., Unkefer P.J., Unkefer C.J. Biosynthesis of the 3,4-dihydroxybenzoate moieties of petrobactin by *Bacillus anthracis* // The Journal of organic chemistry. – 2008. – T. 73. – №. 15. – C. 5759-5765.

77. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // Journal of molecular biology. – 2007. – T. 372. – №. 3. – C. 774–797.

78. Krömer J.O., Nunez-Bernal D., Aversch N.J.H., Hampe J., Varela J., Varela C. Production of aromatics in *Saccharomyces cerevisiae* – a feasibility study // Journal of biotechnology. – 2013. – T. 163. – №. 2. – C. 184-193.

79. Krzysztoforska K., Piechal A., Blecharz-Klin K., Pyrzanowska J., Joniec-Maciejak I., Mirowska-Guzel D., Widy-Tyszkiewicz E. Administration of protocatechuic acid affects memory and restores hippocampal and cortical serotonin turnover in rat model of oral D-galactose-induced memory impairment // *Behavioural brain research*. – 2019. – T. 368. – №. 111896.
80. Kubota T., Tanaka Y., Hiraga K., Inui M., Yukawa H. Characterization of shikimate dehydrogenase homologues of *Corynebacterium glutamicum* // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2013. – T. 97. – №. 18. – C. 8139-8149.
81. Kubota T., Tanaka Y., Takemoto N., Watanabe A., Hiraga K., Inui M., Yukawa H. Chorismate-dependent transcriptional regulation of quinate/shikimate utilization genes by LysR-type transcriptional regulator QsuR in *Corynebacterium glutamicum*: carbon flow control at metabolic branch point // *Molecular microbiology*. – 2014. – T. 92. – №. 2. – C. 356-368
82. Kubota T., Watanabe A., Suda M., Kogure T., Hiraga K., Inui M. Production of p-aminobenzoate by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum* and non-biological formation of an N-glucosyl byproduct // *Metabolic engineering*. – 2016. – T. 38. – C. 322-330.
83. Kunjapur A.M., Hyun J.C., Prather K.L.J. Deregulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the *E. coli* de novo vanillin biosynthesis pathway // *Microbial cell factories*. – 2016. – T. 15. – №. 61.
84. Labib M., Görtz J., Brüsseler C., Kallscheuer N., Gätgens J., Jupke A., Marienhagen J., Noack S. Metabolic and process engineering for microbial production of protocatechuate with *Corynebacterium glutamicum* // *Biotechnology and bioengineering*. – 2021. – T. 118. – №. 11. – C. 4414-4427.
85. Lee E.G., Yoon S.H., Das A., Lee S.H., Li C., Kim J.Y., Choi M.S., Oh D.K., Kim S.W. Directing vanillin production from ferulic acid by increased acetyl-CoA consumption in recombinant *Escherichia coli* // *Biotechnology and bioengineering*. – 2009. – T. 102. – №. 1. – C. 200-208.

86. Lee J.H., Wendisch V.F. Biotechnological production of aromatic compounds of the extended shikimate pathway from renewable biomass // *Journal of biotechnology*. – 2017. – T. 257. – C. 211-221.
87. Lee J.Y., Janes B.K., Passalacqua K.D., Pflieger B.F., Bergman N.H., Liu H., Håkansson K., Somu R.V., Aldrich C.C., Cendrowski S., Hanna P.C., Sherman D.H. Biosynthetic analysis of the petrobactin siderophore pathway from *Bacillus anthracis* // *Journal of bacteriology*. – 2007. – T. 189. – №. 5. – C. 1698-1710.
88. Leszczewicz M., Walczak P. Selection of Thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* Strains for Organic Acid Biosynthesis // *Food technology and biotechnology*. – 2019. – T. 57. – №. 2. – C. 249-259.
89. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – T. 49. – №. W1. – C. W293–W296.
90. Li K., Frost J.W. Synthesis of vanillin from glucose // *Journal of the American Chemical Society*. – 1998. – T. 120. – №. 40. – C. 10545-10546.
91. Li W., Xie D., Frost J.W. Benzene-free synthesis of catechol: interfacing microbial and chemical catalysis // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – T. 127. – №. 9. – C. 2874-2882.
92. Lin Y., Sun X., Yuan Q., Yan Y. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli* // *Metabolic engineering*. – 2014. – T. 23. – C. 62-69.
93. Liu X., Niu H., Li Q., Gu P. Metabolic engineering for the production of l-phenylalanine in *Escherichia coli* // *3 Biotech*. – 2019. – T. 9. – №. 85.
94. Lobanova J.S., Gorshkova N.V., Krylov A.A., Stoyanova N.V., Mashko S.V. Genome engineering of the *Corynebacterium glutamicum* chromosome by the Extended Dual-In/Out strategy // *Journal of microbiological methods*. – 2022. – T. 200. – №. 106555.
95. Maddocks S.E., Oyston P.C. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins // *Microbiology*. – 2008. – T. 154. – №. 12. – C. 3609-3623.

96. Masella R., Santangelo C., D'Archivio M., LiVolti G., Giovannini C., Galvano F. Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms // *Current medicinal chemistry*. – 2012. – T. 19. – №. 18. – C. 2901-2917.
97. Merkens H., Beckers G., Wirtz A., Burkovski A. Vanillate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* // *Current microbiology*. – 2005. – T. 51. – №. 1. – C. 59-65.
98. Minaeva N.I., Gak E.R., Zimenkov D.V., Skorokhodova A.Y., Biryukova I.V., Mashko S.V. Dual-In/Out strategy for genes integration into bacterial chromosome: a novel approach to step-by-step construction of plasmid-less marker-less recombinant *E. coli* strains with predesigned genome structure // *BMC Biotechnology*. – 2008. – T. 8. – №. 63.
99. Mishra A.K., Baek K.H. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism: A Divergent Pathway for Plants and Bacteria // *Biomolecules*. – 2021. – T. 11. – №. 705.
100. Moran G. R. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and hydroxymandelate synthase: exemplars of the alpha-keto acid dependent oxygenases // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2014. – №. 544. – C. 58-68.
101. Muller R., Wagener A., Schmidt K., Leistner E. Microbial production of specifically ring-<sup>13</sup>C-labelled 4-hydroxybenzoic acid // *Applied microbiology and biotechnology*. – 1995. – T. 43. – C. 985-988.
102. Nakamura Y., Gojobori T., Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000 // *Nucleic acids research*. – 2000. – T. 28. – №. 1. – C. 292.
103. Nakamura J.S., Hirano S., Ito H. L-glutamic acid producing microorganism and a method for producing L-glutamic acid. U.S.: patent US20060141588A1. – 2006.
104. Nishio Y., Yamamoto Y., Yamada K., Yokota K. Method for Producing Target Substance by Fermentation. Patent WO 2013/069634 A1. – 2013.
105. Niu W., Draths K.M., Frost J.W. Benzene-free synthesis of adipic acid // *Biotechnology progress*. – 2002. – T. 18. – №. 2. – C. 201-211.

106. Noda S., Shirai T., Oyama S., Kondo A. Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives // *Metabolic engineering*. – 2016. – T. 33. – C. 119-129.
107. Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment // *Journal of molecular biology*. – 2000. – T. 302. – №. 1. – C. 205-217.
108. Okai N., Miyoshi T., Takeshima Y., Kuwahara H., Ogino C., Kondo A. Production of protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing chorismate-pyruvate lyase from *Escherichia coli* // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2016. – T. 100. – №. 1. – C. 135-145.
109. Olins P.O., Rangwala S.H. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli* // *The Journal of biological chemistry*. – 1989. – T. 264. – №. 29. – C. 16973-16976.
110. Ohnishi J., Hayashi M., Mitsuhashi S., Ikeda M. Efficient 40 degrees C fermentation of L-lysine by a new *Corynebacterium glutamicum* mutant developed by genome breeding // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2003. – T. 62. – №. 1. – C. 69-75.
111. Örn O.E., Sacchetto S., van Niel E.W.J., Hatti-Kaul R. Enhanced Protocatechuic Acid Production From Glucose Using *Pseudomonas putida* 3-Dehydroshikimate Dehydratase Expressed in a Phenylalanine-Overproducing Mutant of *Escherichia coli* // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2021. – T. 9. – №. 695704.
112. Ornston L.N. The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. IV. Regulation // *The Journal of biological chemistry*. – 1966. – T. 241. – №. 16. – C. 3800-3810.
113. Overhage J., Priefert H., Steinbüchel A. Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199 // *Applied and environmental microbiology*. – 1999. – T. 65. – №. 11. – C. 4837-4847.
114. Oves-Costales D., Kadi N., Fogg M.J., Song L., Wilson K.S., Challis G.L. Enzymatic logic of anthrax stealth siderophore biosynthesis: AsbA catalyzes ATP-

- dependent condensation of citric acid and spermidine // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – T. 129. – №. 27. – C. 8416-8417.
115. Oves-Costales D., Kadi N., Fogg M.J., Song L., Wilson K.S., Challis G.L. Petrobactin biosynthesis: AsbB catalyzes condensation of spermidine with N8-citrylspermidine and its N1-(3,4-dihydroxybenzoyl) derivative // *Chemical communications (Cambridge, England)*. – 2008. – №. 34. – C. 4034-4036.
116. Peek J., Roman J., Moran G., Christendat D. Structurally diverse dehydroshikimate dehydratase variants participate in microbial quinate catabolism // *Molecular microbiology*. – 2017. – T. 103. – №. 1. – C. 39-54.
117. Pflieger B.F., Lee J.Y., Somu R.V., Aldrich C.C., Hanna P.C., Sherman D.H. Characterization and analysis of early enzymes for petrobactin biosynthesis in *Bacillus anthracis* // *Biochemistry*. – 2007. – T. 46. – №. 13. – C. 4147-4157.
118. Pflieger B.F., Kim Y., Nusca T.D., Maltseva N., Lee J.Y., Rath C.M., Scaglione J.B., Janes B.K., Anderson E.C., Bergman N.H., Hanna P.C., Joachimiak A., Sherman D.H. Structural and functional analysis of AsbF: Origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – T. 105. – №. 44. – C. 17133-17138.
119. Plaggenborg R., Overhage J., Steinbüchel A., Priefert H. Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440 // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2003. – T. 61. – №. 5–6. – C. 528-535.
120. Plaggenborg R., Steinbüchel A., Priefert H. The coenzyme A-dependent, non- $\beta$ -oxidation pathway and not direct deacetylation is the major route for ferulic acid degradation in *Delftia acidovorans* // *FEMS microbiology letters*. – 2001. – T. 205. – №. 1. – C. 9-16.
121. Polen T., Kramer M., Bongaerts J., Wubbolts M., Wendisch V.F. The global gene expression response of *Escherichia coli* to L-phenylalanine // *Journal of biotechnology*. – 2005. – T. 115. – №. 3. – C. 221-237.
122. Prezioso S.M., Xue K., Leung N., Gray-Owen S.D., Christendat D. Shikimate induced transcriptional activation of Protocatechuate biosynthesis genes by QuiR, a

LysR-type transcriptional regulator, in *Listeria monocytogenes* // *Journal of molecular biology*. – 2018. – T. 430. – №. 9. – C. 1265-1283.

123. Pugh S., McKenna R., Osman M., Thompson B., Nielsen D.R. Rational engineering of a novel pathway for producing the aromatic compounds p-hydroxybenzoate, protocatechuate, and catechol in *Escherichia coli* // *Process Biochemistry*. – 2014. – T. 49. – C. 1843-1850.

124. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways // *PLoS ONE*. – 2009. – T. 4. – №. e6441.

125. Rodriguez A., Martinez J.A., Flores N., Escalante A., Gosset G., Bolivar F. Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds // *Microbial cell factories*. – 2014. – T. 13. – №. 126.

126. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction // *Nature protocols*. – 2010. – T. 5. – №. 4. – C. 725-738.

127. Sambrook J. *Molecular Cloning: Laboratory Manual* / Joseph Sambrook, David W. Russell. – 3rd edn. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

128. Schell M.A. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators // *Annual review of microbiology*. – 1993. – T. 47. – C. 597-626.

129. Seo S.W., Yang J.S., Kim I., Yang J., Min B.E., Kim S., Jung G.Y. Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency // *Metabolic engineering*. – 2013. – T. 15. – C. 67-74.

130. Shen X., Liu S. Key enzymes of the protocatechuate branch of the beta-ketoadipate pathway for aromatic degradation in *Corynebacterium glutamicum* // *Science in China. Series C, Life sciences*. – 2005. – T. 48. – №. 3. – C. 241-249.

131. Shen X.H., Zhou N.Y., Liu S.J. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium? // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2012. – T. 95. – №. 1. – C. 77-89.

132. Sheremetieva M.E., Anufriev K.E., Khlebodarova T.M., Kolchanov N.A., Yanenko A.S. Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to create



- a producer of L-valine // *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*. – 2022. – T. 26. – №. 8. – C. 743-757.
133. Shinagawa E., Adachi O., Ano Y., Yakushi T., Matsushita K. Purification and characterization of membrane-bound 3-dehydroshikimate dehydratase from *Gluconobacter oxydans* IFO 3244, a new enzyme catalyzing extracellular protocatechuate formation // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2010. – T. 74. – №. 5. – C. 1084-1088.
134. Shmonova E.A., Voloshina O.V., Ovsienko M.V., Smirnov S.V., Nolde D.E., Doroshenko V.G. Characterization of the *Corynebacterium glutamicum* dehydroshikimate dehydratase QsuB and its potential for microbial production of protocatechuic acid // *PloS One*. – 2020. – T. 15. – №8. – e0231560.
135. Shmonova E.A., Savrasova E.A., Fedorova E.N., Doroshenko V.G. Comparative Analysis of Catabolic and Anabolic Dehydroshikimate Dehydratases for 3,4-DHBA Production in *Escherichia coli* // *Microorganisms*. – 2022. – T. 10. – № 7. – 1357.
136. Siebert M., Severin K., Heide L. Formation of 4-hydroxybenzoate in *Escherichia coli*: characterization of the *ubiC* gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase // *Microbiology*. – 1994. – T. 140. – №. 4. – C. 897-904.
137. Siehler S.Y., Dal S., Fischer R., Patz P., Gerischer U. Multiplelevel regulation of genes for protocatechuate degradation in *Acinetobacter baylyi* includes cross-regulation // *Applied and environmental microbiology*. – 2007. – T. 73. – №. 1. – C. 232-242.
138. Simon N., Coulanges V., Andre P., Vidon D.J. Utilization of exogenous siderophores and natural catechols by *Listeria monocytogenes* // *Applied and environmental microbiology*. – 1995. – T. 61. – №. 4. – C. 1643-1645.
139. Sinha A.K., Sharma U.K., Sharma N.A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents // *International journal of food sciences and nutrition*. – 2008. – T. 59. – №. 4. – C. 299-326.
140. Smirnov S.V., Kodera T., Samsonova N.N., Kotlyarova V.A., Rushkevich N.Y., Kivero A.D., Sokolov P.M., Hibi M., Ogawa J., Shimizu S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2010. – T. 88. – №. 3. – C. 719-726.

141. Song J., He Y., Luo C., Feng B., Ran F., Xu H., Ci Z., Xu R., Han L., Zhang D. New progress in the pharmacology of protocatechuic acid: A compound ingested in daily foods and herbs frequently and heavily // *Pharmacological research*. – 2020. – T. 161. – №. 105109.
142. Sonoki T., Takahashi K., Sugita H., Hatamura M., Azuma Y., Sato T., Suzuki S., Kamimura N., Masai E. Glucose-free cis, cis-muconic acid production via new metabolic designs corresponding to the heterogeneity of lignin // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2018. – T. 6. – C. 1256-64.
143. Stephanopoulos G.N. *Metabolic Engineering* / Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J. – USA: Academic Press, 1998.
144. Stephens C.M., Bauerle R. Analysis of the Metal Requirement of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7- phosphate Synthase from *Escherichia coli* // *The Journal of biological chemistry*. – 1991. – T. 266. – №. 31. – C. 20810-20817.
145. Strøman P., Reinert W.R., Giles N.H. Purification and characterization of 3-dehydroshikimate dehydratase, an enzyme in the inducible quinic acid catabolic pathway of *Neurospora crassa* // *The Journal of biological chemistry*. – 1978. – T. 253. – №. 13. – C. 4593-4598.
146. Sun X., Lin Y., Yuan Q., Yan Y. Biological production of muconic acid via a prokaryotic 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase // *ChemSusChem*. – 2014. – T. 7. – №. 9. – C. 2478-2481.
147. Sutherland J.B., Crawford D.L., Pometto A.L. Metabolism of cinnamic, p-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii* // *Canadian journal of microbiology*. – 1983. – T. 29. – №. 10. – C. 1253-1257.
148. Tateoka T., Yasuda I. 3-Dehydroshikimate dehydratase in mung bean cultured cells // *Plant cell reports*. – 1995. – T. 15. – №. 3–4. – C. 212-217.
149. Teramoto H., Inui M., Yukawa H. Regulation of expression of genes involved in quinate and shikimate utilization in *Corynebacterium glutamicum* // *Applied and environmental microbiology*. – 2009. – T. 75. – №. 11. – C. 3461-3468.


150. Thompson B., Machas M., Nielsen D.R. Engineering and comparison of non-natural pathways for microbial phenol production // *Biotechnology and bioengineering*. – 2016. – T. 113. – №. 8. – C. 1745-1754.
151. van Duuren J.B., Brehmer B., Mars A.E., Eggink G., Dos Santos V.A., Sanders J.P. A limited LCA of bio-adipic acid: manufacturing the nylon-6,6 precursor adipic acid using the benzoic acid degradation pathway from different feedstocks // *Biotechnology and bioengineering*. – 2011. – T. 108. – №. 6. – C. 1298-1306.
152. van Duuren J.B., Wijte D., Karge B., Martins dos Santos V.A.P., Yang Y., Mars A.E., Eggink, G. pH-stat fed-batch process to enhance the production of cis, cis-muconate from benzoate by *Pseudomonas putida* KT2440-JD1 // *Biotechnology progress*. – 2012. – T. 28. – №. 1. – C. 85-92.
153. Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M.A., Clamp M., Barton G.J. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench // *Bioinformatics*. – 2009. – T. 25. – №. 9. – C. 1189-1191.
154. Weber C., Bruckner C., Weinreb S., Lehr C., Essl C., Boles E. Biosynthesis of cis,cis-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae* // *Applied and environmental microbiology*. – 2012. – T. 78. – №. 23. – C. 8421-8430.
155. Wegkamp A., van Oorschot W., de Vos W.M., Smid E.J. Characterization of the role of p-aminobenzoic acid biosynthesis in folate production by *Lactococcus lactis* // *Applied and environmental microbiology*. – 2007. – T. 73. – №. 8. – C. 2673-2681.
156. Wei K., Long L., Lin Q., Ding S. Functional characterization of a new 3-dehydroshikimate dehydratase from *Eupenicillium parvum* and its potential for protocatechuic acid production // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2022. – T. 86. – №. 8. – C. 1024-1030.
157. Wendisch V.F. Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development // *Current opinion in biotechnology*. – 2014. – T. 30. – C. 51-58.
158. Williams T.C., Aversch N.J.H., Winter G., Plan M.R., Vickers C.E., Nielsen L.K., Krömer J.O. Quorum-sensing linked RNA interference for dynamic metabolic

- pathway control in *Saccharomyces cerevisiae* // *Metabolic engineering*. – 2015. – T. 29. – C. 124-134.
159. Williams K.M., Martin W.E., Smith J., Williams B.S., Garner B.L. Production of protocatechuic acid in *Bacillus thuringiensis* ATCC33679 // *International journal of molecular sciences*. – 2012. – T. 13. – №. 3. – C. 3765-3772.
160. Wilson M.K., Abergel R.J., Raymond K.N., Arceneaux J.E., Byers B.R. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2006. – T. 348. – №. 1. – C. 320-325.
161. Wheeler K.A., Lamb H.K., Hawkins A.R. Control of metabolic flux through the quinate pathway in *Aspergillus nidulans* // *The Biochemical journal*. – 1996. – T. 315. – №. 1. – C. 195-205.
162. Whipp M.J., Camakaris H., Pittard A.J. Cloning and analysis of the *shiA* gene, which encodes the shikimate transport system of *Escherichia coli* K-12 // *Gene*. – 1998. – T. 209. – №. 1-2. – C. 185-192.
163. Wojtas-Wasilewska M., Luterek J., Leonowicz A., Dawidowicz A. Dearomatization of lignin derivatives by fungal protocatechuate 3,4-dioxygenase immobilized on porosity glass // *Biotechnology and bioengineering*. – 1988. – T. 32. – №. 4. – C. 507-511.
164. Xue K., Prezioso S.M., Christendat D. QuiC2 represents a functionally distinct class of dehydroshikimate dehydratases identified in *Listeria* species including *Listeria monocytogenes* // *Environmental microbiology*. – 2020. – T. 22. – №. 7. – C. 2680-2692.
165. Yoshino M., Murakami K. A graphical method for determining inhibition constants // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. – 2009. – T. 24. – №. 6. – C. 1288-1290.
166. Zhang H., Pereira B., Li Z., Stephanopoulos G. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – T. 112. – №. 27. – C. 8266-8271.

167. Zhang R.G., Dementieva I., Duke N., Collart F., Quait-Randall E., Alkire R., Dieckman L., Maltsev N., Korolev O., Joachimiak A. Crystal structure of *Bacillus subtilis* IolI shows endonuclease IV fold with altered Zn binding // *Proteins*. – 2002. – T. 48. – №. 2. – С. 423-426.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение А – Изучение димеров QsuB



Protein Data Bank

in Europe

Bringing Structure to Biology

Feedback Share

Services | Research | Training | About us

**PDB**

**PDBePISA**

[pdbe.org/pisa](http://pdbe.org/pisa)

**EMDataBank**

Unified Data Resource for 3DEM

## PISA Interface.

Session Map (id=484-HC-82)

Start Interfaces Interface Search

Monomers

Assemblies

interface # 1 in qsub\_dim.pdb

interface #1/1 XML &lt;&lt; &lt; &gt; &gt;&gt;

## Interface Summary XML

	Structure 1		Structure 2	
Selection range	A		B	
class	Protein		Protein	
symmetry operation	x,y,z		..	
symmetry ID	1_555		0_555	
<b>Number of atoms</b>				
interface	282	5.7%	280	5.7%
surface	2867	58.3%	2884	58.7%
total	4917	100.0%	4917	100.0%
<b>Number of residues</b>				
interface	78	12.6%	78	12.6%
surface	584	94.5%	581	94.0%
total	618	100.0%	618	100.0%
<b>Solvent-accessible area, Å</b>				
interface	2528.9	9.4%	2542.3	9.4%
total	26980.1	100.0%	26972.5	100.0%
<b>Solvation energy, kcal/mol</b>				
isolated structure	-503.0	100.0%	-502.8	100.0%
gain on complex formation	-15.8	3.1%	-16.0	3.2%
average gain	-11.3	2.2%	-11.2	2.2%
P-value	0.144		0.124	

## Hydrogen bonds XML

##	-Structure 1	Dist. [Å]	-Structure 2
1	A:GLN 376[ NE2 ]	3.22	B:VAL 38[ O ]
2	A:ARG 252[ NH2 ]	2.02	B:ARG 246[ O ]
3	A:GLN 440[ NE2 ]	2.40	B:ARG 246[ O ]
4	A:LYS 247[ HZ3 ]	2.05	B:GLU 249[ OE2 ]
5	A:ARG 246[ H ]	1.90	B:ASP 396[ OD1 ]
6	A:PRO 466[ N ]	3.78	B:ASN 618[ OD1 ]
7	A:VAL 38[ O ]	3.12	B:GLN 376[ NE2 ]
8	A:ARG 246[ O ]	2.21	B:ARG 252[ NH2 ]
9	A:ARG 246[ O ]	2.31	B:GLN 440[ NE2 ]
10	A:GLU 249[ OE2 ]	1.83	B:LYS 247[ HZ3 ]
11	A:ASP 396[ OD1 ]	1.96	B:ARG 246[ H ]
12	A:ASN 618[ OD1 ]	3.63	B:PRO 466[ N ]


## Salt bridges XML

##	-Structure 1	Dist. [Å]	-Structure 2
1	A:LYS 247[ NZ ]	3.87	B:GLU 249[ OE1 ]
2	A:LYS 247[ NZ ]	2.89	B:GLU 249[ OE2 ]
3	A:GLU 249[ OE1 ]	3.73	B:LYS 247[ NZ ]
4	A:GLU 249[ OE2 ]	2.67	B:LYS 247[ NZ ]


No disulfide bonds found  
No covalent bonds found

##	Structure 1	x	Structure 2	interface	$\Delta G$	$\Delta G$	$N_{HR}$	$N_{SB}$	$N_{DS}$	CSS						
NN «»	Range	$N_{at}$	$N_{res}$	Surface Å <sup>2</sup>	Range	$N_{at}$	$N_{res}$	Surface Å <sup>2</sup>	area, Å <sup>2</sup>	kcal/mol	P-value					
1	A	282	78	26980	∅	B	280	78	26972	2535.6	-31.8	0.134	12	4	0	0.000

## Приложение Б – Изучение димеров N-QsuB

 Protein Data Bank  
 in Europe  
 Bringing Structure to Biology  
 Feedback | Share

**PDBePISA**  
[pdbe.org/pisa](http://pdbe.org/pisa)

Services | Research | Training | About us  
 **EMDataBank**  
 Unified Data Resource for 3DEM

---

**PISA Interface.**

interface # 1 in N-qsub\_dim.pdb

Session Map (id=843-HC-KK3)  
 Start | Interfaces | Interface Search  
 - Monomers -  
 - Assemblies -

---

interface #1/1 XML << < > >>

**Interface Summary** XML

	Structure 1		Structure 2	
Selection range	A		B	
class	Protein		Protein	
symmetry operation	x,y,z		..	
symmetry ID	1_555		0_555	
<b>Number of atoms</b>				
interface	40	1.7%	39	1.6%
surface	1333	56.1%	1322	55.6%
total	2378	100.0%	2378	100.0%
<b>Number of residues</b>				
interface	11	3.7%	10	3.4%
surface	267	89.9%	268	90.2%
total	297	100.0%	297	100.0%
<b>Solvent-accessible area, Å</b>				
interface	297.3	2.2%	299.1	2.2%
total	13737.4	100.0%	13729.1	100.0%
<b>Solvation energy, kcal/mol</b>				
isolated structure	-239.2	100.0%	-239.1	100.0%
gain on complex formation	-0.4	0.2%	-0.6	0.3%
average gain	-1.8	0.8%	-1.8	0.8%
P-value	0.802		0.765	

**Hydrogen bonds** XML

##	-Structure 1	Dist. (Å)	-Structure 2	##	-Structure 1	Dist. (Å)	-Structure 2
1	A:ARG 246[ NH2]	3.73	B:GLU 249[ OE1]	1	A:ARG 246[ NH2]	3.73	B:GLU 249[ OE1]
2	A:GLU 249[ OE1]	3.82	B:ARG 246[ NH2]	2	A:GLU 249[ OE1]	3.82	B:ARG 246[ NH2]

**Salt bridges** XML

No disulfide bonds found  
No covalent bonds found

##	Structure 1	x	Structure 2	interface	ΔG	ΔG	N <sub>HR</sub>	N <sub>SB</sub>	N <sub>DS</sub>	CSS					
NN «»	Range	N <sub>at</sub>	N <sub>res</sub>	Surface Å <sup>2</sup>	Range	N <sub>at</sub>	N <sub>res</sub>	Surface Å <sup>2</sup>	area, Å <sup>2</sup>	kcal/mol	P-value				
1	A	40	11	13737	B	39	10	13729	298.2	-1.0	0.783	2	2	0	0.000