

Плеханова Наталья Сергеевна

**«ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ N_ε-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ НА
РЕГУЛЯЦИЮ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОТОКОВ В *ESCHERICHIA COLI*
ШТАММАХ-ПРОДУЦЕНТАХ АМИНОКИСЛОТ»**

Специальность: 1.5.6. – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

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

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель:

Федоров Алексей Николаевич,

доктор биологических наук, «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Официальные оппоненты:

Манухов Илья Владимирович

доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»

Муронец Владимир Израилевич

доктор биологических наук, заведующий отделом биохимии животной клетки НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет»

Защита диссертации состоится 25 декабря 2024 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.2.) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН: www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii_plehanova-n-s.html

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

Хижняк Татьяна Владимировна

доктор биологических наук

Актуальность работы

Производство аминокислот микробиологическим методом, в отличие от химического синтеза, является одним из столпов промышленной биотехнологии, а получение штаммов для этого производства всегда было на переднем крае биоинженерных технологий. Технологии, разработанные с целью получения продуцентов аминокислот, использовались и будут использоваться в дальнейшем как для получения продуцентов других полезных соединений, так и в исследовательской практике (Wendisch, 2020).

Получение аминокислот с помощью ферментации с высоким выходом удалось достичь только благодаря специально полученным штаммам, первоначально отобранными методами мутагенеза и селекции, а в последствии, методами генно-инженерных подходов (Юзбашев и др., 2013).

Ацетилирование аминокислотных остатков лизина в белках играет важную роль во многих биологических процессах. Данный процесс обнаружен практически у всех организмов, и, несмотря на распространенность этой модификации, только с развитием высокотехнологичных методов становится понятной сложная связь между ацетилированием белков и клеточным метаболизмом у бактерий (Wang et al., 2010).

Детальное изучение самой распространенной посттрансляционной модификации у бактерий – ацетилирования – позволит разработать новые подходы “тонкой настройки” метаболизма, путем влияния на уже синтезированные белки и перераспределение метаболических потоков.

Цель и задачи исследования

Цель работы:

Изучение влияния процессов N_ϵ -ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи** исследования:

1. Оценить влияние ферментативного ацетилирования на метаболизм штаммов *E. coli*, а также на продукцию аминокислоты треонина штаммом-продуцентом *E. coli*
2. Оценить влияние деацетилирования на метаболизм штаммов *E. coli*, а также на продукцию аминокислоты треонина штаммом-продуцентом *E. coli*
3. Изучить влияние ферментативного ацетилирования (ацетилтрансферазы *E.coli* PatZ) на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, а также влияние на этот процесс неспецифичной к механизму ацетилирования деацетилазы CobB.
4. Изучить влияние неферментативного ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и роль в этом процессе ацетилфосфатсинтазы *E.coli* AskA.

5. Определить влияние Nε-ацетилирования различных аминокислотных остатков лизина глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на активность фермента в штаммах *E. coli* MG1655 и BL21(DE3).

Научная новизна и значимость работы

Расширены представления о механизмах ацетилирования и деацетилирования аминокислотных остатков лизина в белках *E. coli*. Показано, что профиль ацетилирования одного из ключевых ферментов гликолиза — ГАФД — зависит от штамма, в котором данный белок был синтезирован. Обнаружено, что делеция генов, участвующих в метаболизме ацетата и ацетилировании ε-аминогруппы лизина белков влияет как на метаболизм штаммов-продуцентов, так и на продуктивность целевых аминокислот. Описан комплексный подход к изменению метаболизма *E. coli* штамма-продуцента L-треонина при его росте на различных углеродных субстратах, в результате чего получено значительное увеличение продукции L-треонина.

Практическая значимость

Повышение способности *E. coli* ассимилировать ацетат, достигнутое нами с помощью адаптивной лабораторной эволюции, позволило снизить негативное влияние ацетата на рост клеток и продукцию L-треонина. Усиление процесса деацетилирования на поздних стадиях ферментации позволило добиться существенного повышения продуктивности штаммов на различных источниках углерода. Полученный штамм *E. coli* способен использовать разные источники углерода, не теряя своей эффективности, поскольку себестоимость целевого продукта, получаемого с помощью микробного синтеза, в большой степени определяется стоимостью источника углерода. Создание штаммов-продуцентов, способных к усвоению различных источников углерода, позволит производить целевой продукт, независимо от постоянного изменения цен на углеродные субстраты и невзирая на их локальную доступность.

Положения, выносимые на защиту

1. Усиление уровня ферментативного ацетилирования в начальной фазе ферментации позволяет добиться повышения продукции L-треонина в штамме-продуценте *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода.

2. Усиление процесса деацетилирования в поздней стадии ферментационного процесса, особенно в штаммах с повышенной устойчивостью к ацетату, позволяет добиться повышения продукции L-треонина в штамме-продуценте *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода.

3. Процесс ферментативного ацетилирования повышает активность ключевого фермента центрального метаболизма ГАФД *E. coli in vivo* и *in vitro*.

4. Уровень активности ГАФД определяется как метаболическими параметрами самого штамма, так и функционированием процессов ацетилирования в клетках.

5. Делеция генов, участвующих в процессах ацетилирования (*patZ*, *cobB*, *ackA*) оказывает влияние как на метаболизм штамма *E. coli* MG1655, так и на продуктивность штаммов-продуцентов аминокислот.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на следующих конференциях, форумах, конкурсах и конгрессах: XI Международная научно-практическая конференция "Биотехнология: наука и практика", 2023 г., п. Новомихайловский; XIII Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», 2023, Беларусь Минск; Международная научная конференция молодых ученых «Наука и инновации» 2023, Ташкент, Узбекистан.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ. Опубликованы 4 экспериментальные статьи и 1 обзорная статья в научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в иностранном научном журнале, входящих в реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science, Scopus, а также тезисы конференций.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. Автор выражает благодарность своему научному руководителю Федорову Алексею Николаевичу. А также коллегам, чья неоценимая помощь и поддержка позволили выполнить эту работу к.б.н. Альтман И.Б., д.б.н. Хижняк Т.В., д.х.н. Ощепкову М.С., д.б.н. Птицыну Л.Р., д.б.н. Лившицу В.А. Также хочу поблагодарить всех сотрудников лаборатории Молекулярной биотехнологии и ЦКП Промышленные биотехнологии ФИЦ Биотехнологии РАН. Особую благодарность выражаю моим соавторам за их советы и плодотворное обсуждение результатов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В первой главе представлена общая характеристика ацетилирования белков у бактерий как способ регуляции метаболизма клетки. Рассмотрены механизмы процессов ацетилирования и деацетилирования, а также участвующие в них ферменты. Также описаны некоторые подходы к созданию высокопродуктивных штаммов-продуцентов аминокислот и, в частности, методы снижения уровня продукции ацетата.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объекты исследования – штаммы *Escherichia coli* MG1655, BL21(DE3); штаммы продуценты аминокислот L-треонина и L-пролина; глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа.

Методы исследования. Генетические манипуляции, рестрикцию, лигирование, электрофорез ДНК в геле 0,8% агарозы и электротрансформацию клеток *E. coli*, осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами (Miller, 1972; Sambrook and Russel, 2001) и рекомендациями компаний – производителей. Выделение плазмидной ДНК проводили, используя Qiaprep spin kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Геномная ДНК выделялась набором «Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA). Определение нуклеотидной последовательности проводили в лаборатории «Евроген» (Россия) на коммерческой основе. Количество синтезированных L-треонина и L-пролина в среде определяли методом капиллярного электрофореза Agilent CE 7100 (США).

Активность ГАФД измеряли спектрофотометрически в клеточных экстрактах с добавлением НАД⁺(Serva) (2 мМ). Очистку ГАФД для определения кинетических параметров проводили фракционным осаждением сульфатом аммония (NH₄)₂SO₄. Для дальнейшей работы использовали фракцию белка, осажденную при 75–85% насыщения сульфатом аммония (фракция III).

Построение 3D-структур белков с аминокислотными заменами. В качестве основы для моделирования была взята трехмерная структура ГАФД 1S7C. Сервером I-TASSER были предсказаны мономерные субъединицы белков с аминокислотными заменами. Выравнивание, уточнение и визуализация трехмерных структур осуществлялись с помощью PyMOL v.2.5.0.

Оценка накопления L-аминокислот в культуральной среде.

Первоначально штаммы-продуценты L-аминокислот выращивали в течение 18–24 ч при температуре 37°C на чашках с LB-агаром, содержащим антибиотик хлорамфеникол для продуцента пролина и стрептомицин для продуцента треонина. Для получения посевной культуры штаммы выращивали в пробирках размером 20×200 мм, содержащих 2 мл LB с добавлением указанных выше антибиотиков, на ротационной шейкере (250 об/мин) при 37°C в течение 18 ч. Далее в ферментационную среду вносили 0,2 мл ночной культуры (10%). Ферментацию проводили в пробирках с 2 мл ферментационной среды. После культивирования количество аминокислот в среде определяли методом капиллярного электрофореза. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра THERMO FISHER SCIENTIFIC Genesys 150.

L-пролин. Ферментацию штаммов-продуцентов L-пролина проводили в течение 72 ч при 32°C с перемешиванием при 240 об/мин. Состав ферментационной среды (г/л): глюкоза – 60, (NH₄)₂SO₄ – 25, KH₂PO₄ – 2, MgSO₄·7H₂O – 1,0, L-изолейцин – 0,05; Тиамин–HCl – 0,0001, CaCO₃ – 25, pH 7,2.

L-треонин. Ферментацию штаммов-продуцентов L-треонина проводили в течение 72 ч при 32°C с перемешиванием при 240 об/мин. Состав ферментационной среды (г/л): глюкоза – 80,0; (NH₄)₂SO₄ – 22,0; NaCl – 0,8; KH₂PO₄ – 2,0; MgSO₄·7H₂O – 0,8; FeSO₄·7H₂O – 0,02; MnSO₄·5H₂O – 0,02; Тиамин–HCl – 0,0002; Дрожжевой экстракт – 1,0; CaCO₃ – 30,0; pH 7,0.

Продуктивность штаммов определялась как отношение продукции аминокислоты (г/л) к оптической плотности (ОП₆₀₀).

Математическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы «Microsoft Excel». Массив экспериментальных данных получен в трех-пятикратной повторности; результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке. При статистической обработке данных использовался непараметрический t критерий Стьюдента. Представлены статистически достоверные различия при $p < 0,05$.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Влияние процесса ферментативного ацетилирования на продукцию L-треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli*

Для лучшего понимания роли ацетилирования белков в клетках *E. coli*, было проанализировано влияние этих процессов на продуктивность *E. coli* штаммов-продуцентов аминокислот. В этом случае изменения метаболизма в клетках могут быть оценены по изменению уровня продукции целевой аминокислоты.

Для увеличения уровня экспрессии гена, кодирующего ацетилтрансферазу PatZ, в штамм-продуцент L-треонина была введена плаزمид, в которой целевой ген находился под регуляцией промотора фага T5 и под репрессией *lacI^q*. Для индукции синтеза фермента ацетилтрансферазы в начале ферментации к культивируемым штаммам в ферментационную среду были добавлены лактоза и галактоза до конечных концентраций 10 мМ. В отличие от ИПТГ (Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид), лактоза и галактоза способны утилизироваться клетками. Поэтому индуцированный ими синтез ацетилтрансферазы прекращался после полной утилизации добавленных индукторов и фермент PatZ функционировал в начальной и логарифмической фазе роста клеток. В качестве контроля и лактоза, и галактоза были добавлены в ферментационную среду контрольного штамма.

Таблица 1. Результаты ферментаций штаммов-продуцентов треонина на средах с различными источниками углерода.

Штаммы	ОП ₆₀₀	Треонин, г/л	Продуктивность, г/л/ОП ₆₀₀
Среда с глюкозой			
THR	5,3 ± 0,2	13,6 ± 0,6	2,6
THR-patZ	5,7 ± 0,1	15,8 ± 0,9	2,8
Среда с ксилозой			
THR	7,0 ± 0,1	12,7 ± 0,2	1,8
THR-patZ	6,7 ± 0,2	16,3 ± 0,2	2,4
Среда с сахарозой			
THR	2,8 ± 0,2	5,3 ± 0,7	1,9
THR-patZ	3,0 ± 0,2	7,3 ± 0,4	2,4

Представлены усредненные результаты 2 независимых экспериментов.

В качестве источников углерода нами были выбраны несколько сахаров: глюкоза (гексоза), которая метаболизируется преимущественно по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, ксилоза (пентоза), которая метаболизируется по неокислительному пентозофосфатному пути, и сахароза (дисахарид), которая на первых этапах расщепляется на глюкозу и фруктозу.

Предпочтительным источником углерода для *E. coli*, как и для многих других бактерий, является глюкоза, обеспечивающая более высокую скорость роста по сравнению с другими сахарами.

Накопление треонина в культуральной среде у штаммов-продуцентов оценивали в результате пробирочной ферментации на средах с различными источниками углерода в течение 72 ч методом капиллярного электрофореза. Анализ и сравнение уровня продукции L-треонина и оптической плотности всех штаммов на ферментационных средах с различными источниками углерода представлены в таблице 1.

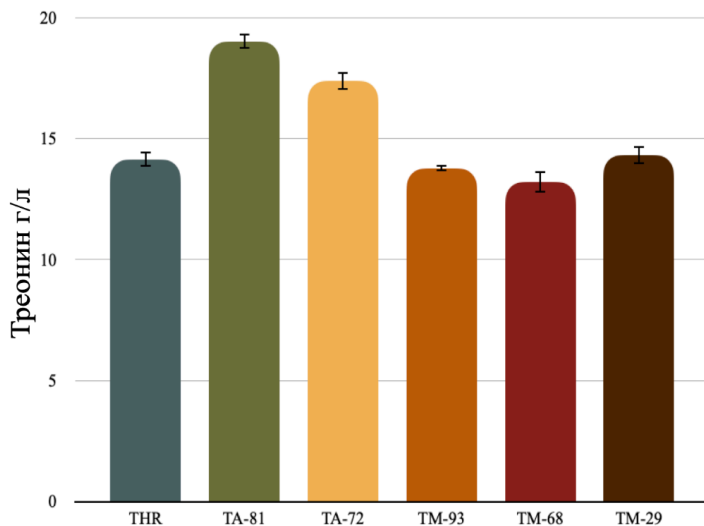
Из полученных результатов можно сделать вывод, что усиление ферментативного ацетилирования на начальном этапе ферментации положительно влияет на выход треонина: при одинаковой оптической плотности (в пределах погрешности измерения) обоих штаммов, в штамме с усиленной экспрессией гена *patZ*, кодирующим ацетилтрансферазу, наблюдается увеличение синтеза целевой аминокислоты. В результате ферментации на среде с глюкозой продуктивность штамма увеличивается на 8% по сравнению с продуктивностью исходного штамма, а при использовании в качестве источника углерода ксилозы и сахарозы - на 33% и 26%, соответственно.

Влияние процесса деацетилирования на продукцию L-треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli*

Ацетат часто является побочным продуктом при культивировании клеток штаммов-продуцентов. Такие методы селекции, как лабораторная адаптивная эволюция (ЛАЭ), или мутагенез позволяют получить штаммы с устойчивостью к высоким концентрациям ацетата, а точнее, способные использовать накопленный ацетат в качестве дополнительного источника углерода.

С помощью ЛАЭ и УФ-мутагенеза нами были получены штаммы, способные расти при высоких концентрациях (0,76%) ацетата в качестве единственного источника углерода. Из представленных результатов (Рис. 1) можно сделать вывод, что метод ЛАЭ является наиболее подходящим для получения ацетат-устойчивых штаммов без потери их продуктивности.

Далее, в штаммы THR и TA-81 была введена плаزمида pCOB, несущая ген *cobB*, кодирующий единственную идентифицированную в *E. coli* деацетилазу. Ген *cobB* находился под регуляцией индуцибельного промотора фага T5. Накопление треонина в культуральной среде клонов оценивали в ходе пробирочной ферментации на средах с различными источниками углерода в течение 72 ч.



Штаммы:

THR - штамм-продуцент треонина

ТА - штаммы, полученные в результате лабораторной адаптивной эволюции

ТМ - штаммы, полученные в результате УФ-мутагенеза

Ингибирующая концентрация ацетата в среде **0,76%**

Штаммы способны расти при концентрации ацетата **1%**

Первичный анализ продукции аминокислот проводили на ферментационных средах содержащих глюкозу в качестве основного источника углерода и ацетат в качестве дополнительного источника углерода в соотношении 3:1 соответственно.

Рисунок 1. Оценка продукции аминокислот в полученных штаммах на среде с ацетатом в качестве дополнительного источника углерода.

В качестве углеродных субстратов были выбраны несколько сахаров: глюкоза (гексоза), ксилоза (пентоза) и сахароза (дисахарид). Также в качестве альтернативного источника углерода использовали этанол, который способен напрямую преобразоваться в ацетил-КоА.

Увеличение уровня экспрессии гена *cobB* приводит к удалению доступных для фермента ацетильных групп с аминокислотных остатков лизина в белках. На сегодняшний день мало данных, показывающих, на активность каких ферментов и как именно влияет ацетилирование аминокислотных остатков лизина в *E. coli*. В результате деацетилирования свободные молекулы ацетата могут быть возвращены в клеточный метаболизм.

Как показано в таблице 2, штаммы, адаптированные к высоким концентрациям ацетата, демонстрируют более высокий уровень продукции треонина по сравнению с исходным штаммом при проведении ферментационного процесса на всех углеродных субстратах: на ферментационной среде с глюкозой +15% для исходного штамма-продуцента треонина и +29% для ТА-81; на среде с сахарозой - +14% и +15% соответственно. В случае роста на ксилозе положительный эффект от усиления деацетилазы наблюдался только для штамма ТА-81 (+26%).

Известно, что при росте на ксилозе клетки *E. coli* накапливают больше ацетата, что, в свою очередь, может приводить к неферментативному ацетилированию и, возможно, к ингибированию ряда ферментов.

Таблица 2. Результаты ферментаций штаммов-продуцентов треонина на средах с различными источниками углерода.

Штамм	ОП ₆₀₀	Треонин, г/л	Продуктивность, г/л/ОП ₆₀₀
Ферментационная среда с глюкозой			
THR	7,0 ± 0,2	13,7 ± 0,2	2,0
THR-CobB	6,3 ± 0,1	14,4 ± 0,1	2,3
TA-81	6,5 ± 0,1	15,7 ± 0,5	2,4
TA-81-CobB	6,0 ± 0,1	18,8 ± 0,5	3,1
Ферментационная среда с ксилозой			
THR	6,9 ± 0,1	11,7 ± 0,5	1,7
THR-CobB	7,0 ± 0,1	12,0 ± 0,5	1,7
TA-81	6,9 ± 0,1	13,3 ± 0,2	1,9
TA-81-CobB	6,1 ± 0,1	15,0 ± 0,2	2,4
Ферментационная среда с сахарозой			
THR	1,9 ± 0,1	5,4 ± 0,1	2,8
THR-CobB	2,1 ± 0,1	6,7 ± 0,3	3,2
TA-81	2,2 ± 0,1	5,8 ± 0,3	2,7
TA-81-CobB	2,2 ± 0,2	7,0 ± 0,1	3,1
Ферментационная среда с этанолом			
THR	1,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,3
THR-CobB	1,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,4
TA-81	1,8 ± 0,1	0,5 ± 0,4	0,3
TA-81-CobB	1,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,5

Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Таким образом, нами показано, что усиление процесса деацетилирования позволяет добиться повышения продукции треонина в штамме-продуценте *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода.

Оценка скорости роста штаммов *Escherichia coli* с делетированными генами *cobB*, *patZ* и *ackA*

Еще один способ оценки влияния ферментов, участвующих в процессах ацетилирования – делеция кодирующих их генов. Удаление генов (gene knockout) представляет собой эффективный и надежный метод для изучения метаболизма и широко используется в исследованиях *E. coli*.

В первую очередь, нами были проанализированы зависимости роста оптической плотности клеток от времени культивирования для штамма дикого типа MG1655 и штаммов MG1655 с инактивированными генами *cobB*, *patZ* и *ackA* (рис.2).

Выбранные гены кодируют ферменты, которые вносят непосредственный вклад в процессы ацетилирования: ген *patZ*; ген *cobB*; ген *ackA* (кодирует фермент ацетат киназу (ацетилфосфатсинтазу) – основной фермент биосинтеза ацетилфосфата, который способен ацетилировать аминокислотные остатки лизина в белках по неферментативному механизму).

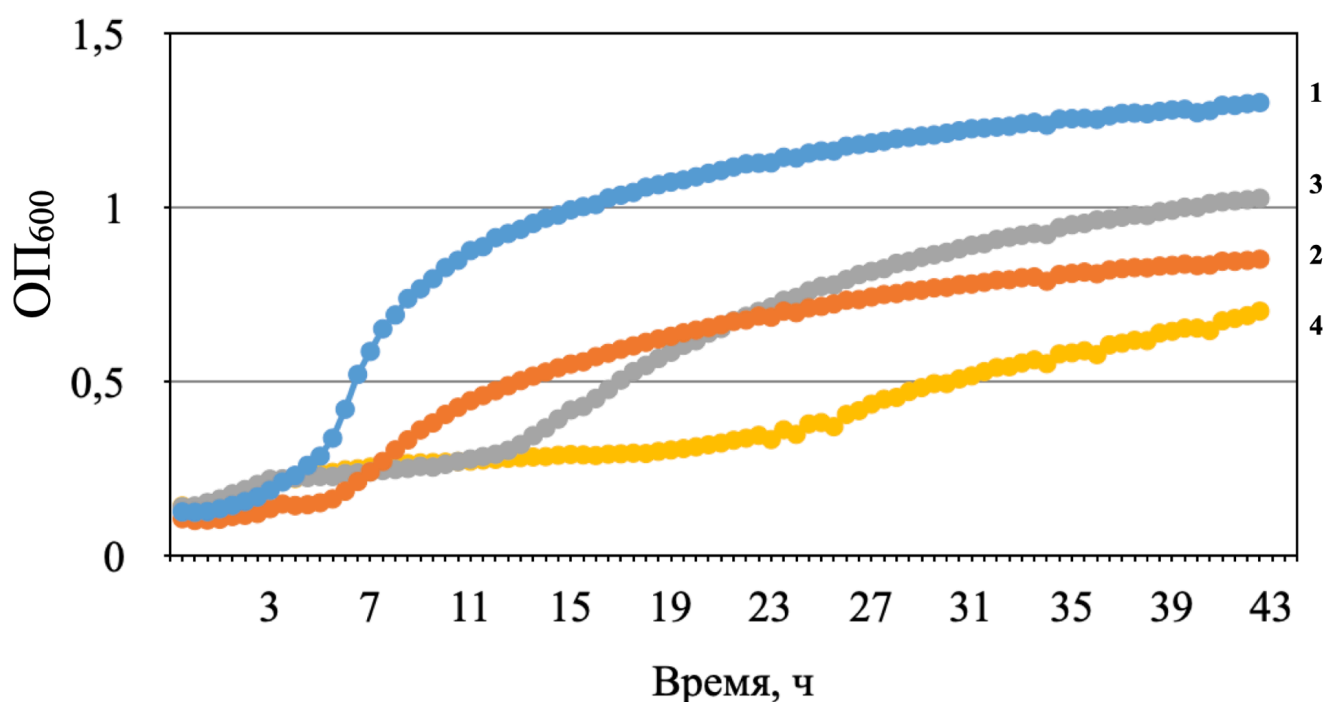


Рисунок 2. Рост штаммов *E. coli* на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода. MG1655 исходный (1); MG1655 Δ*cobB* (2); MG1655 Δ*patZ* (3); MG1655 Δ*ackA* (4)

Как видно из рис. 2, все делеционные варианты штамма MG1655 характеризовались увеличенной по времени лаг-фазой и пониженной скоростью роста по сравнению со штаммом дикого типа.

Аналогичные делеции были введены в штаммы-продуценты пролина (PRO; получен из коллекции ВКПМ В-8012) и треонина (THR; получен из коллекции ВКПМ В-2307).

Изменения в скорости роста делеционных производных этих штаммов, были аналогичны наблюдаемым для делеционных вариантов MG1655 (рис. 3а и 4а).

Основным параметром при оценке эффективности продуцентов аминокислот является накопление целевого продукта в культуральной жидкости.

Как видно из рис. 3 и 4, штаммы-продуценты пролина и треонина с инактивированным геном *cobB* демонстрировали замедленный рост, но вместе с тем повышенную продуктивность. Можно предположить, что это связано с нарушением процесса деацетилирования.

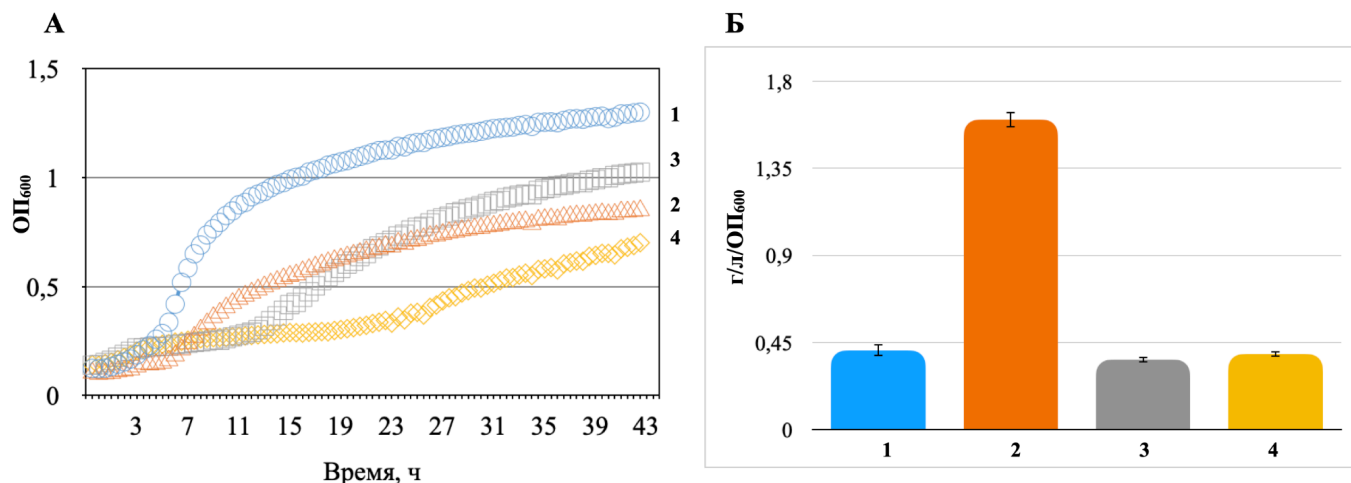


Рисунок 3. Рост и продуктивность штаммов-продуцентов L-пролина на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода. А – Рост штаммов: PRO, исходный (1), PRO $\Delta cobB$, (2), PRO $\Delta patZ$, (3) и PRO $\Delta ackA$, (4). Б – Продуктивность штаммов (обозначения те же). Стандартные отклонения от средних значений указаны в виде планок погрешностей.

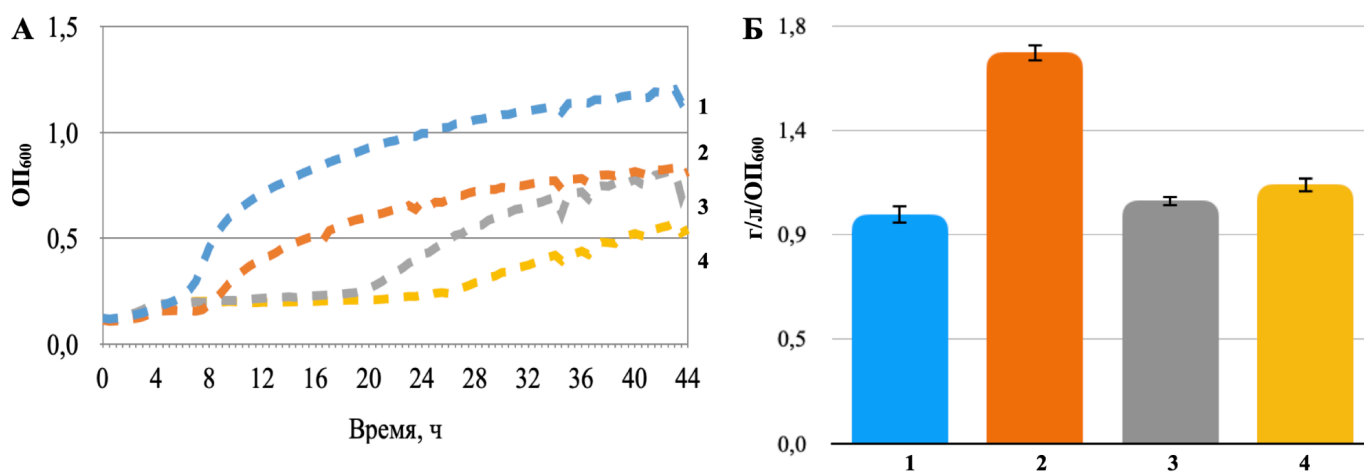


Рисунок 4. Рост и продуктивность штаммов-продуцентов L-треонина на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода. А – Рост штаммов: THR, исходный (1), THR $\Delta cobB$, (2), THR $\Delta patZ$, (3) и THR $\Delta ackA$, (4). Б – Продуктивность штаммов (обозначения те же). Стандартные отклонения от средних значений указаны в виде планок погрешностей.

Из литературных данных известно, что в эукариотах ацетилирование аминокислотных остатков лизина ГАФД, одного из ключевых ферментов гликолиза, по-разному влияет на его активность в зависимости от типа и состояния клеток. Можно полагать, что система ацетилтрования/деацетилирования микроорганизмов также может влиять на активность ГАФД. Однако роль ацетилирования лизиновых остатков ГАФД в клетках *E. coli* до сих пор детально не изучена.

Конструирование реципиентных штаммов (с делецией гена *gapA* в хромосоме) для наработки мутантных форм белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

В ряде работ было показано, что клетки *E. coli*, несущие делецию гена *gapA*, не способны к росту ни на богатой, ни на минимальной среде с глюкозой в качестве источника углерода.

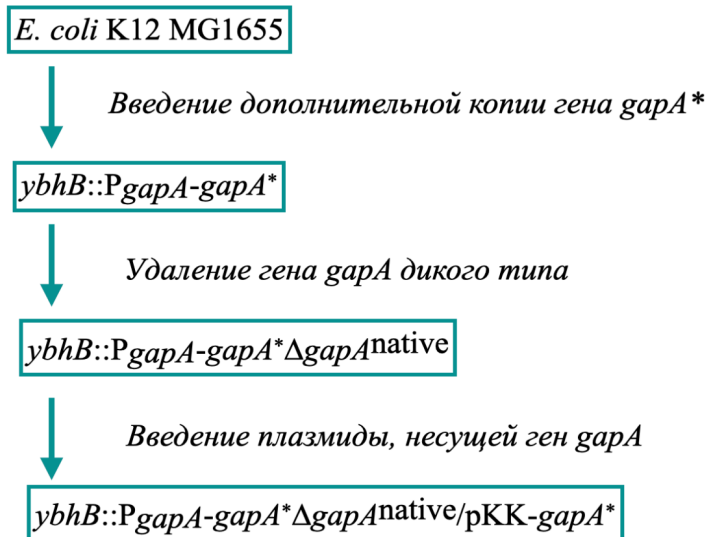
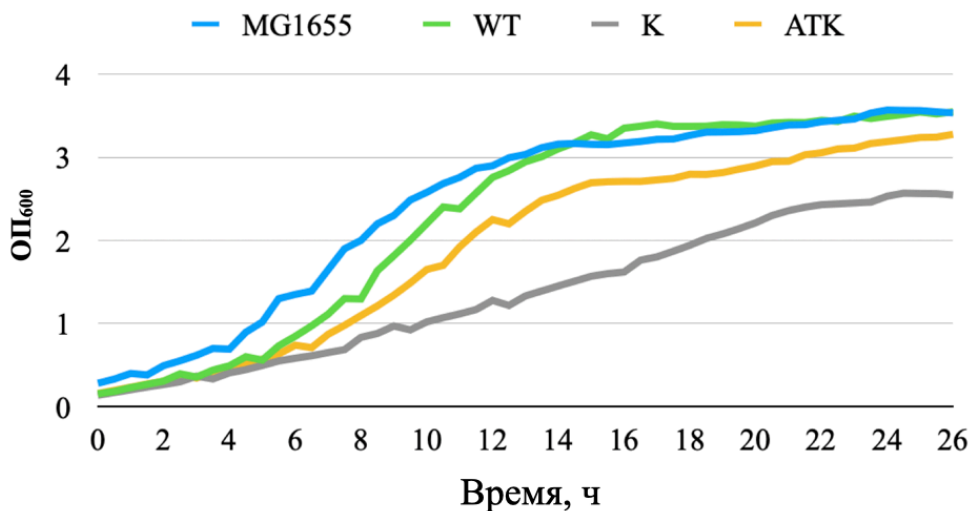


Рисунок 5. Схема конструирования реципиентных штаммов (с делецией гена *gapA* в хромосоме) для наработки мутантных форм белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы



WT: *ybhB::PgapA-gapA*^{WT} Δ*gapA*^{native}/pKK-*gapA*^{WT}
 K: *ybhB::PgapA-gapA*^{D34K} Δ*gapA*^{native}/pKK-*gapA*^{D34K}
 ATK: *ybhB::PgapA-gapA*^{D34AG188TP189K} Δ*gapA*^{native}/pKK-*gapA*^{D34AG188TP189K}

Рисунок 6. Рост штаммов на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода. Начальная оптическая плотность ОП₆₀₀ составляла 0,1. Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов.

Исходя из этого, конструирование целевого штамма осуществлялось в два этапа. На первом этапе в *ybhB*-локус MG1655 были введены с сохранением нативной регуляторной области гены *gapA*^{WT}, *gapA*^{D34K} и *gapA*^{D34AG188TP189K} в качестве второй копии

Схема конструирования штаммов представлена на рисунке 5. Выбранный ген *ybhB* не является значимым для *E. coli*, то есть с делецией этого гена штаммы способны расти как на богатой среде LB, так и на минимальной – M9. Удаление гена *ybhB* не приводило к изменению скорости роста клеток (данные не приведены).

Для инактивации природной копии гена *gapA* в 3-х полученных штаммах MG1655 $\Delta ybhB::gapA^{WT}$, MG1655 $\Delta ybhB::gapA^{D34K}$ и MG1655 $\Delta ybhB::gapA^{D34AG188TP189K}$ в *gapA* локус хромосом была интегрирована кассета $\Delta gapA^{native}::kan$ с помощью системы Red-зависимой рекомбинации, и затем были отобраны канамицин-устойчивые клоны. Полученные штаммы MG1655 $\Delta ybhB::gapA^{WT}\Delta gapA^{native}::kan$, MG1655 $\Delta ybhB::gapA^{D34K}\Delta gapA^{native}::kan$ и $\Delta ybhB::gapA^{D34AG188TP189K}\Delta gapA^{native}::kan$ росли как на богатой среде LB, так и на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного углеродного субстрата. Однако, как видно из рисунка 6, экспрессия мутантных генов *gapA* в локусе *ybhB* не способна полностью супрессировать делецию нативного гена *gapA*.

Влияние ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Escherichia coli* in vitro.

Для проведения реакций ацетилирования и деацетилирования *in vitro*, ферменты ацетилтрансфераза PatZ и деацетилаза CobV, содержащие His-Тaq последовательности, были очищены с помощью метало-афинной хелатной хроматографии (МАХ).

В реакционную смесь, содержащую ГАФД, добавляли фермент PatZ, после реакции PatZ удаляли, используя МАХ, Удаление белка PatZ из раствора контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Для проведения деацетилирования модифицированного ГАФД в реакционную смесь добавляли фермент CobV и после реакции проводили описанные выше процедуры.

Результаты измерений энзиматической активности полученных вариантов белка ГАФД приведены в таблицах 3 и 4.

In vitro обработка фермента ГАФД ацетилтрансферазой PatZ приводила к двукратному увеличению его активности. При деацетилировании активность белка снижалась до уровня, близкого к исходному.

Наибольший интерес представляет изменение активности белков ГАФД^{D34AG188TP189K} и ГАФД^{D34K}, имеющих потенциальный дополнительный сайт ацетилирования. Как видно из данных таблиц 3 и 4, ацетилирование ГАФД^{D34K} приводило, в отличие от белка дикого типа, к уменьшению удельной активности НАД⁺-зависимой реакции, а деацетилирование увеличивало активность белка до величины, незначительно превышающей исходное значение.

Для НАДФ⁺-зависимой реакции наблюдался обратный эффект: 2-кратное увеличение активности ацетилированного белка и падение активности до исходной в

результате деацетилирования. Иная картина имела место в случае белка ГАФД^{D34AG188TP189K}.

Таблица 3. НАД⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*.

Белок	НАД ⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	520,7 ± 0,75	912,4 ± 0,57	637,1 ± 0,66
ГАФД ^{D34K}	20 ± 0,65	13,7 ± 0,54	26,4 ± 1,2
ГАФД ^{D34AG188TP189K}	139 ± 0,80	224 ± 0,40	121 ± 0,60

Схема эксперимента

Нативная форма белка

↓ ацетилтрансфераза *PatZ*

Ацетилированная форма белка

↓ деацетилаза *CobB*

Деацетилированная форма белка

Таблица 4. НАДФ⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*.

Белок	НАДФ ⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	<0.01	<0.01	<0.01
ГАФД ^{D34K}	9 ± 0,45	18,2 ± 0,40	8,3 ± 0,25
ГАФД ^{D34AG188TP189K}	58,9 ± 0,36	56 ± 0,32	87,5 ± 0,44

Штаммы MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*

Ацетилирование повышало НАД⁺, но не изменяло НАДФ⁺-зависимую активность белка.

Возможно, данные эффекты связаны с доступностью лизиновых остатков ГАФД в результате введения мутаций. В целом, эксперимент показал, что деацетилирование ацетилированных форм белка приводит к возвращению уровня активности к уровню, близкому к исходному.

Влияние Nε-ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Escherichia coli in vivo*

Поскольку процесс *in vivo* ацетилирования белков в клетках может давать другие результаты по сравнению с условиями *in vitro*, нами была предложена схема анализа активности ГАФД в клетках при изменении уровней ацетилирования *in vivo*. Для этого была сконструирована плазида, несущая ген ацетилтрансферазы *E. coli patZ*. Выбранный вектор позволяет производить совместную экспрессию с плазмидами рКК-*gapA*. Кодированный ацетилтрансферазу ген находится под регуляцией промотора T5, который узнается пролимеразами *E. coli*, а копияность данной плазмиды аналогична копияности плазмид, несущих гены *gapA*. Одновременно в штаммы MG1655 *ΔybhB::gapA^{WT}*, MG1655 *ΔybhB::gapA^{D34K}* и MG1655 *ΔybhB::gapA^{D34AG188TP189K}*

вводились плазмиды, несущие описанные ранее соответствующие мутантные гены ГАФД.

Результаты эксперимента показали, что в ходе реакции ацетилирования активность ГАФД и ГАФД^{D34AG188TP189K} увеличилась на 118% и 64% соответственно. Однако активность ГАФД^{D34K} снизилась на 64%. Ацетилированные препараты белков были деацетилированы в *in vitro* реакции. Активность ГАФД и ГАФД^{D34AG188TP189K} снизилась на 58% и 78% соответственно по сравнению с их ацетилированными формами.

Таблица 5. НАД⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*.

Белок	НАД ⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	372,8 ± 3,80	813,0 ± 1,10	468,0 ± 2,00
ГАФД ^{D34K}	24,4 ± 1,46	15,5 ± 0,25	38,7 ± 0,65
ГАФД ^{D34AG188TP189K}	164 ± 3,00	218,0 ± 0,30	139,3 ± 1,30

Схема эксперимента

Ко-экспрессия генов ГАФД и ацетилтрансферазы *PatZ*



Ацетилированная форма белка



деацетилаза *CobB*

Деацетилированная форма белка

Штаммы MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*

Таблица 6. НАДФ⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA*.

Белок	НАДФ ⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	<0.01	<0.01	<0.01
ГАФД ^{D34K}	10,9 ± 0,35	17,0 ± 0,15	10,0 ± 0,30
ГАФД ^{D34AG188TP189K}	66,0 ± 0,36	45,7 ± 2,00	53,9 ± 1,00

Полученные результаты показывают, что как в *in vitro*, так и в *in vivo* условиях ацетилированные остатки лизина могут быть деацетилированы *CobB* с сохранением активности ГАФД близкой к исходной, за исключением активности ГАФД^{D34K} которая увеличилась на 58% по сравнению с исходным уровнем.

Для идентификации ацетилированных аминокислотных остатков лизина ГАФД полученных в *in vitro* и *in vivo* экспериментах был проведен масс-спектрометрический анализ для идентификации пептидов, содержащих ацетилированные/неацетилированные остатки лизина.

В белке ГАФД дикого типа было идентифицировано 6 сайтов ацетилирования (таблица 7). В случае мутантных форм ГАФД было обнаружено еще два сайта ацетилирования, в позиции 24 в белке ГАФД^{D34K} и в позиции 184 в случае белка ГАФД^{D34AG188TP189K}. На рисунке 7 серым цветом выделены ацетилированные аминокислотные остатки лизина на поверхности белка ГАФД.

Таблица 7. Идентифицированные аминокислотные остатки лизина в исследуемых формах белка ГАФД в результате ацетилирования *in vitro* и *in vivo*

ГАФД	Ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД										
ГАФД (WT)	N-	4		70	71	108	115	116	124		-C
ГАФД (D34K)		4	24	70	71	108	115	116	124		
ГАФД (D34AG188TP189K)		4		70	71	108	115	116	124	184	

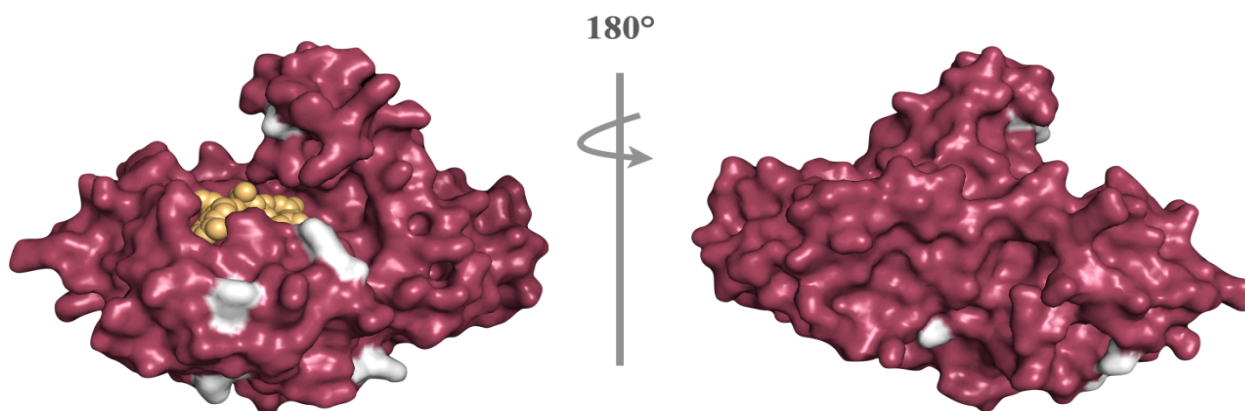


Рисунок 7. Распределение ацетилированных аминокислотных остатков лизина по белковой поверхности ГАФД (PDB 1S7C).

Для лучшего понимания происходящих процессов были проведены процедура молекулярного докинга и анализ образованных комплексов белок-кофактор. На первом этапе были построены 3D модели белков с аминокислотными заменами ГАФД^{D34AG188TP189K} и ГАФД^{D34K} с помощью сервера I-TASSER. С помощью методов молекулярного моделирования в определенных позициях аминокислотные остатки лизина были заменены на ацетил-лизин, а полученные структуры были оптимизированы с помощью силового поля Charmm 36M.

Данные молекулярного докинга отлично коррелировали с результатами измерений активности белков. Построенные в программе DockingServer комплексы фермент-кофактор позволили объяснить изменения в значениях активности ферментов ГАФД^{D34AG188TP189K} и ГАФД^{D34K}. В случае белка ГАФД^{D34K} стабилизация образуемых связей с кофакторами обеспечена аминокислотными остатками лизина в позициях 124 и 192 для кофактора НАДФ⁺, и только аминокислотным остатком лизина в позиции 124, для кофактора НАД⁺.

Логотип консенсусной последовательности, показывающий аминокислотный состав в положениях от -10 до +10 относительно чувствительных к ацелированию остатков лизина, был создан с использованием онлайн сервиса WebLogo (рис. 8). Для его построения были использованы аминокислотные последовательности 100 белков *E. coli* из опубликованного протеомного анализа ацелированных белков.

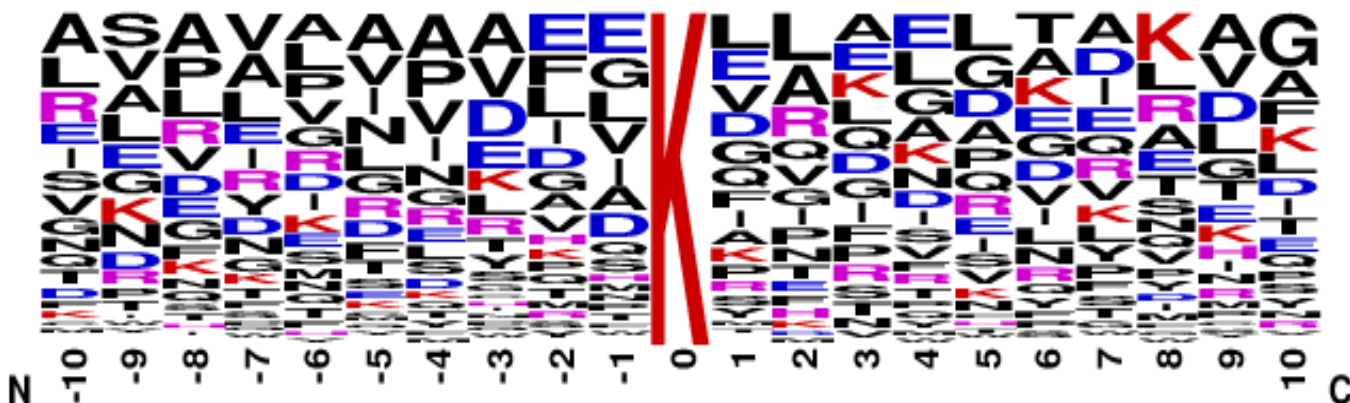


Рисунок 8. Вероятностное распределение аминокислотных остатков в белках *E. coli* в непосредственной близости ацелированных аминокислотных остатков лизина.

Равномерность распределения аминокислотных остатков лизина в пептидах была оценена с помощью критерия согласия Колмогорова. Данная метрика используется для сравнения эмпирической функции распределения остатков лизина в белковой последовательности с теоретической функцией равномерного распределения. Нулевая гипотеза состоит в том, что аминокислотные остатки лизина распределены равномерно по всей белковой последовательности. Альтернативная гипотеза состоит в том, что аминокислотные остатки лизина не распределены равномерно по белковой последовательности. Критерий Колмогорова вычисляет максимальное отклонение между двумя функциями распределения относительно стандартного распределения и преобразует его в *p*-value – вероятность получения отклонения при верности нулевой гипотезы. В данном случае было получено значение *p*-value, равное $1 \cdot 10^{-6}$, что свидетельствует об очень низкой вероятности равномерного распределения остатков лизина. Поэтому была принята альтернативная гипотеза с уровнем значимости 95%, заключающаяся в том, что ацелированные остатки лизина не распределены равномерно в пептидах, а имеется определенная закономерность в их окружении другими аминокислотными остатками. Для вычисления критерия Колмогорова была использована библиотека *scipy*, которая предоставляет различные статистические функции для Python.

Из полученной диаграммы вероятности аминокислотного окружения ацелированного остатка лизина видно, что в наибольшей вероятностью в соседнем положении от ацелированного остатка лизина находится аминокислотный остаток глутаминовой кислоты, который, вероятнее всего, служит основным катализатором для иницирования реакции ацелирования, а через 4 аминокислоты с высокой степенью

вероятности находится еще один аминокислотный остаток лизина, что и наблюдается как в случае белка ГАФД^{D34AG188TP189K}, так и в случае белка ГАФД^{D34K}.

Влияние неферментативного N_ε-ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Escherichia coli*

Неферментативное ацетилирование – это самопроизвольно протекающая химическая реакция, в результате которой расходуются энергетически значимые субстраты. Основными ацетилирующими белки химическими агентами, донорами ацетильных групп, являются ацетил-КоА и ацетилфосфат. Исследователи использовали количественную масс-спектрометрию для оценки изменений степени ацетилирования лизина в *Saccharomyces cerevisiae*. Было показано, что замедление роста в сочетании с высоким «уровнем» метаболизма приводило к накоплению в клетках ацетил-КоА, посредством которого происходило ацетилирование аминокислотных остатков лизина по неферментативному механизму. Ацетилфосфат, осуществляющий неферментативную реакцию ацетилирования лизина, синтезируется ацетилфосфат синтазой (Ask), которая, использует ацетат и АТФ в качестве субстратов.

Для усиления неферментативного ацетилирования в живой клетке была проведена коэкспрессия генов, кодирующих ГАФД и Ask на эквивалентных по копияности плаزمидях. Синтез белка ГАФД для проведения реакций неферментативного ацетилирования проводился штамме с делецией гена, кодирующего ацетилтрансферазу PatZ (MG1655 Δ patZ).

Таблица 8. НАД⁺-зависимая активность ГАФД при неферментативном ацетилировании *in vitro*. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Белок	НАД ⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	550 ± 1,6	117 ± 0,7	300 ± 1,0

Таблица 9. НАД⁺-зависимая активность ГАФД при неферментативном ацетилировании *in vivo*. Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Белок	НАД ⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль*мин ⁻¹ *мг ⁻¹		
	Нативная форма белка	Ацетилированная форма белка	Деацетилированная форма белка
ГАФД	485 ± 2,0	110 ± 0,6	297 ± 0,9

Для идентификации остатков лизина способных подвергаться неферментативному ацелированию *in vitro* была проведена реакция, в которой к препарату ГАФД добавляли очищенный препарат Аск, ацетат и АТФ

Неферментативное ацелирование многократно снижало активность ГАФД, причем таким образом, что реакция деацелирования не восстанавливало его до прежнего уровня как в условиях *in vitro* (таблица 8), так и *in vivo* (таблица 9).

Таблица 10. Идентифицированные аминокислотные остатки лизина в исследуемых формах белка ГАФД в результате неферментативного ацелирования *in vitro* и *in vivo*

ГАФД	Неферментативно ацелированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД								
<i>In vitro</i>	N-	124	184	213	217	225	257	269	-C
<i>In vivo</i>		124	184	213	217	225	257	269	

Достаточно большой спектр остатков лизина (6 а.к.) способных ацелироваться неферментативно (таблица 10), может объясняться маленьким размером ацелифосфата и его способностью ацелировать труднодоступные для ферментов аминокислотные остатки лизинов.

Сравнение ферментативного ацелирования в штаммах *Escherichia coli* линий К-12 и В

В разных бактериальных штаммах процессы ацелирования протекают по-разному. Не являются исключением и штаммы *E. coli*, которых на сегодняшний день существует огромное множество. Штаммы линий К-12 и В являются одними из наиболее часто используемых бактерий-хозяев для получения рекомбинантных белков в промышленных масштабах и для создания штаммов-продуцентов биологически активных веществ. Штаммы разных линий характеризуются рядом особенностей их метаболизма, в частности, различным набором побочных продуктов, таких как ацетат.

Нами было проведено сравнение ферментативной активности ГАФД в штаммах MG1655 и BL21(DE3). Результаты измерений активности ГАФД, кодируемой хромосомной копией гена *gapA*, представлены на рисунке 9.

Как следует из рисунка 9А, показатели удельной активности ГАФД у этих штаммов значительно различаются. При полной идентичности аминокислотных последовательностей белков в обоих штаммах (рис. 9Б), удельная активность белкового препарата ГАФД в штамме MG1655 линии К-12 на 35% превышает удельную активность того же белка в штамме линии В.



Рисунок 9. Сравнение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в штаммах MG1655 и BL21(DE3). А – НАД⁺-зависимая активность ГАФД исходных штаммов MG1655 и BL21(DE3); представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах; Б – сравнительное выравнивание аминокислотных последовательностей ферментов ГАФД штаммов MG1655 и BL21

Сравнение активностей ГАФД в штаммах MG1655 и BL21 в условиях *in vivo* ацетилирования представлены на рисунке 10. В штаммах была осуществлена ко-экспрессия генов *gapA* и *patZ*, клонированных на соответствующие плазмиды.

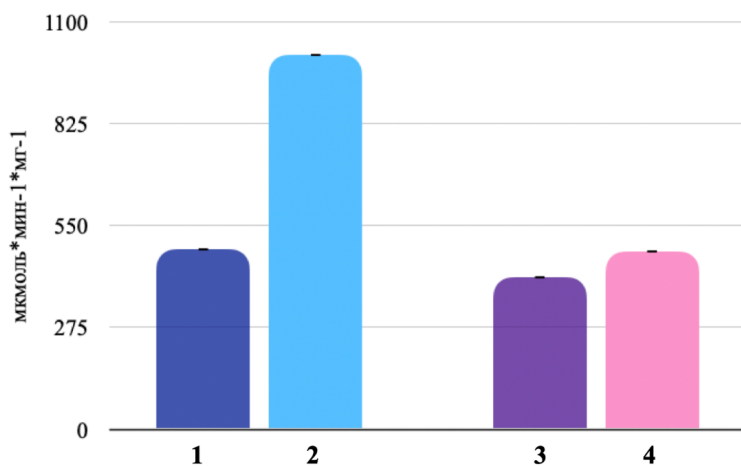


Рисунок 10. Влияние плазмид pKK-*gapA*^{WT} и pNSP1-*patZ* на активность НАД⁺-зависимой ГАФД штаммов MG1655 и BL21(DE3).

- (1) штамм MG1655/pKK-*gapA*^{WT};
- (2) штамм MG1655/pKK-*gapA*^{WT} + pNSP1-*patZ*;
- (3) штамм BL21(DE3)/pKK-*gapA*^{WT};
- (4) штамм BL21(DE3)/pKK-*gapA*^{WT}+pNSP1-*patZ*.

Представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

Как показано на рисунке 10, активность фермента увеличивались вдвое при совместной экспрессии двух генов в штамме MG1655. В штамме линии В BL21(DE3) удельная активность ГАФД оставалась неизменной, независимо от присутствия ацетилтрансферазы.

Идентификация ацетилированных аминокислотных остатков методом MALDI-TOF показала существенное различие в их спектре (таблица 11). В белке ГАФД штамма MG1655 большинство ацетилированных остатков лизина расположены в N-концевой

части фермента, и, как мы показали выше, образуются по механизму ферментативного ацетилирования. В белке штамма BL21(DE3) спектр ацетилированных остатков лизина намного шире и, наряду с присутствием модифицированных остатков в N-концевой части белка, присутствует большое количество ацетилированных остатков лизина в C-концевой последовательности белка, что может свидетельствовать о неферментативном характере ацетилирования белка в этом участке белковой структуры.

Таблица 11. Ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД, полученные в разных штаммах

Штамм	Ацетилированные аминокислотные остатки лизина белка ГАФД																
MG1655	N-			115	116	124	132	138		213			249	257			-C
BL21		70	71	115	116	124			192	213	217	225		257	261	321	

Различия в процессах ацетилирования в штаммах MG1655 и BL21(DE3) скорее всего связаны с различными внутриклеточными концентрациями ацетилфосфата и ацетата в двух выбранных штаммах. Данную особенность штаммов необходимо учитывать при конструировании штаммов-продуцентов аминокислот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В развивающейся области изучения ацетилирования белков существует еще множество нерешенных вопросов и потенциальных возможностей для использования в фундаментальной и прикладной областях науки. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что ферментативная активность белка — не единственный аспект, на который влияет ацетилирование аминокислотных остатков лизина, и, возможно, нам необходимо уделять больше внимания влиянию ацетилирования на структуру, олигомеризацию, белок-белковое взаимодействие и многое другое.

На сегодняшний день нет исследований, посвященных ацетилированию белков, как инструменту создания бактериальных штаммов-продуцентов. Детальное изучение этой посттрансляционной модификации у бактерий позволит разработать новые подходы «тонкой настройки» метаболизма путем влияния на уже синтезированные белки. В этой работе мы продемонстрировали возможность комплексного подхода для усовершенствования штаммов-продуцентов аминокислот, используя как традиционные методы селекции штаммов и методы генной инженерии, так и возможности процессов ацетилирования.

Предложенный метод, основанный на усилении процессов ацетилирования на различных стадиях ферментационного процесса, имеет ряд преимуществ, основным из

которых является его универсальность. Увеличения продуктивности штамма-продуцента треонина от 14 до 30% можно добиться при использовании различных источников углерода. Это делает возможным создание универсальных по потреблению различных субстратов штаммов-продуцентов, что, в свою очередь, позволит производить целевой продукт независимо от постоянного изменения цен на углеродное сырье и невзирая на их локальную доступность. Также, как уже говорилось выше, обнаруженный способ позволяет воздействовать на уже синтезированные белки, изменяя их энзиматическую активность, как в случае фермента ГАФД. Дополнительные исследования влияния процессов ацетилирования на ключевые ферменты, участвующие в метаболическом пути целевого продукта, позволят создать оптимальные условия реализации этих процессов для повышения продуктивности создаваемых штаммов-продуцентов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что усиление процесса ферментативного ацетилирования в начальной фазе ферментации позволяет добиться повышения продуктивности штамма-продуцента *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода от 8 до 33%.
2. Показано, что усиление деацетилирования на поздней стадии ферментации, в частности, в штаммах с повышенной устойчивостью к ацетату, позволяет добиться повышения продуктивности штамма-продуцента треонина *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода от 14 до 30%.
3. Показано, что ферментативное ацетилирование приводит к двукратному увеличению активности ключевого фермента центрального метаболизма ГАФД *E. coli* как *in vitro*, так и *in vivo*.
4. Установлено, что уровень удельной активности ГАФД *E. coli* регулируется с помощью деацетилазы CobB как в случае ферментативного, так и неферментативного ацетилирования.
5. Уровень активности ГАФД зависит как от характеристик самого штамма, так и от уровня ацетилирования этого фермента.
6. Установлено, что ферменты, участвующие в процессах ацетилирования, не являются жизненно важными для клеток *E. coli*, однако их делеции приводят к снижению скорости роста и накоплению биомассы штаммами, однако в случае штаммов-продуцентов аминокислот не приводят к снижению уровня продукции L-треонина и L-пролина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз.

1. Slivinskaya E.A., **Plekhanova N.S.**, Altman I.B., Yampolskaya T.A. Engineering of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with dual NAD⁺/NADP⁺ cofactor specificity for improving amino acid production // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10. – №. 5. – P. 976.
2. **Plekhanova N.S.**, Altman I.B., Yurkova M.S., Fedorov A.N. The Effects of Nε-Acetylation on The Enzymatic Activity of *Escherichia coli* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2023. – V. 59. – №. 6. – P. 778-785.
3. **Плеханова Н.С.**, Альтман И.Б., Лившиц В.А., Юркова М.С., Федоров А.Н. Ацетилирование белков у бактерий как способ регуляции метаболизма клетки // *Биотехнология*. – 2023. – Т.39. – № 5. – С. 14-23.
4. **Плеханова Н.С.**, Лившиц В.А., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние ацетилирования и деацетилирования белков на метаболизм штаммов *Escherichia coli* // *Биотехнология*. – 2024. – Т.40. – № 3. – С. 36-46.
5. **Плеханова Н.С.**, Лившиц В.А., Хижняк Т.В., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние процесса деацетилирования на продукцию треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli* // *Биотехнология*. – 2024. – Т.40. – № 4. – С. 1-11.

Тезисы докладов на российских и международных конференциях

6. Сливинская Е.А., **Плеханова Н.С.**, Альтман И.Б., Ямпольская Т.А. Изучение свойств мутантной глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Escherichia coli* с двойной кофакторной специфичностью // 3-й Российский микробиологический конгресс. Псков, Россия.
7. **Плеханова Н.С.**, Соловьева И.Н., Липкин А.В. Разработка подхода к выбору промышленных штаммов *Escherichia coli* К и В для получения ферментов в промышленных масштабах. XI Международная научно-практическая конференция Биотехнология: наука и практика, 2023 г., п. Новомихайловский, Россия.
8. **Плеханова Н.С.**, Шитенкова Е.В., Липкин А.В. Влияние Nε-ацетилирования на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Escherichia coli*. XIII Международная научно-практическая конференция Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты, 2023 г. Минск, Республика Беларусь.
9. Никандров Н.А., **Плеханова Н.С.**, Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние ферментативного Nε-ацетилирования *in vitro* на энзиматическую активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Escherichia coli* Международная научная конференция молодых учёных Наука и инновации, 2023 г. Ташкент, Узбекистан.
10. **Плеханова Н.С.**, Лившиц В.А., Хижняк Т.В., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние процесса деацетилирования на продукцию треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli*. XII международная научно-практическая конференция Биотехнология: наука и практика, 2024 г. п. Новомихайловский, Россия.

Для заметок