

Закрытое Акционерное Общество
«Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»

На правах рукописи

Кагиева Екатерина Дмитриевна

**Новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы
улучшающие продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis***

03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Каташкина Жанна Иосифовна

Москва 2019

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
1.1. Актуальность проблемы.....	5
1.2. Цели и задачи работы.....	6
1.3. Научная новизна и практическая значимость работы	7
1.4. Положения выносимые на защиту	7
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
2.1. Пути биосинтеза предшественников изопреноидов	9
2.1.1.1. Ацетоацетил-СоА тиолаза	11
2.1.1.2. Гидрокси-3-метилглутарил-СоА синтаза.....	14
2.1.1.3. Гидрокси-3-метилглутарил-СоА редуктаза	18
2.1.1.4. Мевалонаткиназа	22
2.1.1.5. Фосфомевалонаткиназа.	27
2.1.1.6. Мевалонатдифосфатдекарбоксилаза.	32
2.1.1.7. Изопентенилфосфатизомераза	38
2.1.2. Метилэритритолфосфатный путь – основной путь биосинтеза изопреноидов у бактерий.....	43
2.2. Использование гетерологичного мевалонатного пути для продукции изопреноидов в <i>E. coli</i>	45
2.3. <i>Pantoea ananatis</i> как бактерия с высоким биотехнологическим потенциалом	48
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
3.1. Бактериальные штаммы и плазмиды	49
3.2. Среда и условия культивирования штаммов	52
3.3. Генно-инженерные методики.....	52
3.3.1. Проведение полимеразной цепной реакции.....	53
3.3.2. Трансформация клеток <i>P. ananatis</i> плазмидной ДНК с помощью процедуры электропорации.....	53
3.3.3. Проведение интеграции хромосомы в штамм <i>P. ananatis</i>	54
3.3.4. λ Red-зависимая интеграция двухцепочечных фрагментов ДНК в хромосому	54
3.3.5. Излечение клеток от плазмиды-помощника RSFRedTER	55
3.3.6. Излечение клеток <i>P. ananatis</i> от термочувствительных плазмид- помощников pMW- λ Int/Xis-cat, pAN123-cat, pAN129-cat.....	55
3.3.7. Интеграция в хромосому <i>P. ananatis</i> с помощью метода «Dual In/Out».....	55
3.3.8. Конструирование точек интеграции в хромосоме <i>P. ananatis</i>	56
3.3.9. Интеграция CRIM плазмид, pAN162- в сайт attB _{φ80} в хромосоме <i>P. ananatis</i>	60

3.3.10. Выщепление плазмидной части.....	60
3.4. Конструирование штаммов и плазмид	61
3.4.1. Конструирование плазмид	61
3.4.1.1. Клонирование генов mvk^{mpd} , mvk^{mcl} и mvk^{sce} , mvk^{mma} на pET векторы.....	61
3.4.1.2. Конструирование плазмиды pАН162- P_{tac}	62
3.4.1.3. Клонирование генов mvk^{mpd} , mvk^{mma} , mvk^{mcl} , mvk^{nmr} и mvk^{sce} на интегративный вектор	62
3.4.2 Конструирование штаммов	64
3.4.2.1. Конструирование штаммов ISP3.2- $mvk(X)$	64
3.4.2.2. Конструирование штамма IR5-3Δ.....	66
3.4.2.3. Конструирование набора штаммов интеграцией смеси плазмид pАН162- P_{phoC} - $mvaES$, pАН162- P_{tac} - mvk и pАН162- P_{tac} - $KDyI$ в IR5-3Δ-S.	67
3.5. Ферментация штаммов.....	68
3.5.1. Ферментация штаммов ISP3- $mvk(X)$ содержащих многокопийную плазмиду с изопренсинтазой.....	68
3.5.2. Ферментация штаммов производных IR5-3Δ в виалах для газовой хроматографии, содержащих многокопийную плазмиду с изопренсинтазой	69
3.5.3. Измерение концентрации изопрена	69
3.6 Экспрессия и очистка рекомбинантных белков	70
3.6.1. Экспрессия и предварительный анализ активности мевалонаткиназ	70
3.6.2. Экспрессия и очистка рекомбинантных мевалонаткиназ из <i>M. concilii</i> , <i>M. paludicola</i> , <i>M. mazei</i> , <i>N. maritimus</i> и <i>S. cerevisiae</i>	71
3.6.3. Приготовление РМК	71
3.6.4. Определение кинетических параметров ферментов и ингибирование DMAPP, GPP, FPP и DPM.	72
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	74
4.1. Новые мевалонаткиназы и их характеристика	74
4.1.1. Выбор генов, предположительно кодирующих устойчивые к ретро-ингибированию мевалонаткиназы.....	74
4.1.2. Клонирование генов мевалонаткиназ из <i>M. concilii</i> , <i>M. paludicola</i> , <i>M. mazei</i> , <i>N. maritimus</i> и <i>S. cerevisiae</i> их экспрессия в <i>E. coli</i> и очистка соответствующих рекомбинантных белков.	77
4.1.3. Определение кинетических параметров MVK^{Mma} , MVK^{Mpd} , MVK^{Mma} , MVK^{Nmr} и MVK^{Sce}	79
4.1.4. Превращение мевалоната в фосфо- и дифосфомевалонат in vitro в присутствии очищенной мевалонаткиназы и фосфомевалонаткиназы из <i>S. cerevisiae</i>	83
4.1.5. Проверка ингибирования различных мевалонаткиназ интермедиатами мевалонатного пути, GPP и FPP.....	85
4.1.6. Анализ генетического окружения генов mvk	86

4.1.7. Анализ структурных особенностей устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ	88
4.1.8. Сопоставление продукции изопрена изогенными штаммами с разными мевалонаткиназами	90
4.2. Обеспечение баланса биосинтетических активностей в штамме, продуцирующем DMAPP, при введении дополнительных копий генов мевалонатного пути.	93
4.2.1. Конструирование базового штамма для одновременной интеграции нескольких экспрессионных кассет	95
4.2.1.1. Необходимость модификации метода Dual In/Out.....	96
4.2.1.2. Использование модифицированного метода Dual In/Out для конструирования штамма IR5-3Δ.....	98
4.2.1.4. Предварительное определение лимитирующей активности MVA пути в модельном штамме	101
4.2.1.5. Получение набора штаммов, содержащих дополнительные копии генов MVA пути, за один раунд интеграции	102
4.2.2. Отбор клонов с оптимальным сочетанием числа копий генов MVA пути с увеличенной продукцией изопрена	104
ВЫВОДЫ	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	107
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	109
БЛАГОДАРНОСТИ	134
ПРИЛОЖЕНИЕ	135

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность проблемы

Мевалонаткиназа (MVК) – один из ключевых ферментов мевалонатного (MVA) пути (Lynen, 1967). Интерес к изучению MVA пути и его регуляции возник в связи с тем, что его продукты (IPP и DMAPP) служат предшественниками биосинтеза холестерина (Durr et al., 1960). Из этих же предшественников образуется более 50 тыс. натуральных веществ (изопреноидов), среди которых пигменты, сигнальные и защитные молекулы, гормоны, витамины, антиоксиданты.

Начало функциональным исследованиям MVК животных было положено в связи с исследованием генетических заболеваний человека, вызываемых недостаточностью фермента (Tanaka et al., 1990; Schafer et al., 1992). Ретроингибирование мевалонаткиназ играет важную роль в строгом контроле биосинтеза необходимых клетке изопреноидов. Различие профиля ингибирования MVК человека и некоторых патогенных микроорганизмов и паразитов используется при создании лекарств.

Всё большее внимание привлекает разработка процессов микробной ферментации представляющих коммерческий интерес изопреноидов. Большинство бактерий используют альтернативный, метилэритритолфосфатный (MEP), путь биосинтеза изопреноидов. До сих пор не удалось создать эффективный штамм-продуцент изопреноидов на базе этого пути, по-видимому, из-за особенностей его регуляции. Успехи синтетической биологии привели в последние годы к созданию высокоэффективных бактериальных продуцентов изопрена и ряда изопреноидов на базе гетерологичного MVA пути. Для создания таких штаммов необходимо было найти устойчивую к ретроингибированию MVК.

К моменту начала нашего исследования такой фермент был выделен из археи *Methanosarcina mazei* и охарактеризован (Primak et al., 2011). Преимущества устойчивой к ретроингибированию MVК из *M. mazei* были продемон-

стрированы в штамме-продуcente изопрена на базе *Escherichia coli* (Whited et al., 2010). Это революционное открытие явилось важным шагом на пути создания промышленных штаммов-продуцентов изопреноидов. Обнаружение других неингибируемых MVK, помимо несомненной практической ценности, позволило бы выявить общие особенности структур таких ферментов и, возможно, помогло бы прогнозировать свойства других MVK и их распространённость в разных таксономических группах.

При несбалансированной экспрессии генов любого биосинтетического пути происходит накопление интермедиатов, которые будут оказывать влияние на продукцию. В частности известно, что фосфорилированные производные MVA пути токсичны для клетки. Поэтому актуальна дальнейшая разработка и совершенствование методов интеграции нескольких генов, позволяющих быстро и эффективно добиваться оптимизации уровня их экспрессии.

1.2. Цели и задачи работы

Целью данной работы являлся поиск не подверженных ретроингибированию мевалонаткиназ, определение их кинетических параметров *in vitro* и конструирование на их основе штаммов-продуцентов *Pantoea ananatis* с увеличенным накоплением изопрена.

В ходе работы решались следующие задачи:

1. Выбор генов мевалонаткиназ, предположительно не подверженных ретро-ингибированию.
2. Клонирование и экспрессия генов выбранных мевалонаткиназ и очистка, определение кинетических параметров и проверка ингибирования интермедиатами мевалонатного пути соответствующих белков.
3. Введение гетерологичных генов мевалонатного пути в хромосому *P. ananatis*. Конструирование линии изогенных штаммов, содержащих гены кандидатных мевалонаткиназ, способных продуцировать изопрен. Сравнение продукции изогенных штаммов с различными мевалонаткиназами.

4. Дальнейшее увеличение продукции штамма с лучшей мевалонаткиназой за счёт сбалансированного усиления экспрессии генов мевалонатного пути.

1.3. Научная новизна и практическая значимость работы

1. Были обнаружены новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы из *M. concilii* и *M. paludicola*, обладающие лучшими кинетическими параметрами, чем ранее известная мевалонаткиназа из *M. mazei*.
2. Было продемонстрировано преимущество мевалонаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola* для продукции изопрена.
3. Была разработана новая стратегия, позволяющая отбирать оптимальное соотношение числа дополнительных копий генов биосинтетического пути за один раунд интеграции смеси интегративных плазмид в штамм-продуцент.

1.4. Положения выносимые на защиту

1. Были отобраны устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы из архей *M. concilii* и *M. paludicola* на основании эвристического анализа гомологов единственно известной на момент исследования устойчивой к ретроингибированию мевалонаткиназы из *Methanosarcina mazei*, потенциально способные обеспечить высокий уровень продукции изопрена в отсутствие строгой регуляции работы мевалонатного пути его фосфорилированными интермедиатами. На основании анализа генетической организации оперонов, включающих гены мевалонаткиназ, сделано заключение, что все устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы присутствуют в геноме в составе оперона генов мевалонатного пути, но не индивидуального гена, что предполагает наличие различных механизмов регуляции мевалонатного пути в зависимости от взаимного расположения его генов. В результате выравнивания аминокислотных последовательностей мевалонаткиназ, имеющих разный профиль ингибирования, были выявлены особенности структур, отве-

чающих за спектр ингибиторов, а так же выдвинуто предположение, какой участок последовательности определяет уникальные свойства мевалонаткиназы из *M. concilii*.

2. Обнаруженные в данной работе новые мевалонаткиназы из *M. concilii* и *M. paludicola*, по сравнению с ранее описанным ферментом из *M. mazei*, имеют примерно в пять раз большее сродство к мевалонату и АТР, мевалонаткиназа из *M. paludicola* имеет в два раза большую, а мевалонаткиназа из *M. concilii* почти в четыре раза большую каталитическую эффективность, что позволяет использовать эти ферменты для синтеза изопрена в промышленных масштабах.
3. Уникальный фермент, а именно мевалонаткиназа из *M. concilii*, впервые был обнаружен в активной форме в виде тетрамера, в отличие от характерной для данного семейства GHMP киназ в форме димера. Активность мевалонаткиназы из *M. concilii* возрастает на 20% под действием одного из ретро-ингибиторов DMAPP.
4. Преимущества новых устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola* были продемонстрированы в штамме-продуcente изопрена на базе *P. ananatis*.
5. Новый метод сбалансированного усиления экспрессии генов целевого биосинтетического пути за счёт их одновременной интеграции в виде смеси интегративных плазмид в подготовленные локусы бактериальной хромосомы с последующей селекцией лучших вариантов по продукции целевого соединения позволил увеличить накопление изопрена штаммом-продуцентом на 30%.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Пути биосинтеза предшественников изопреноидов

Изопреноиды – обширная группа природных соединений с регулярным строением углеродного скелета, содержащего изопентановые звенья (насы-

щенные и ненасыщенные) $\begin{array}{c} \text{C} \\ | \\ \text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C} \end{array}$, связанные в строго определенном порядке. Среди них встречаются пигменты и гормоны, они участвуют в дыхательной цепи, являясь жизненно необходимыми практически для всех организмов (Sauret-Güeto et al., 2003). Исключение составляют некоторые виды внутриклеточных паразитов *Rickettsia* и *Mycoplasma*, использующих, по-видимому, полученные от клеток хозяина изопреноиды либо их предшественники (Lombard , Moreira, 2010; Boucher , Doolittle , 2011).

Изопентенилпирофосфат (IPP) и диметилаллилпирофосфат (DMAPP) являются универсальными предшественниками для всех изопреноидов, которые в природе синтезируются двумя путями: мевалонатным (MVA) и метилэритритолфосфатным (MEP) (Katsuki, Bloch, 2000; Lynen, 1967; Rohmer et al., 1996; Kuzuyama, Seto, 2012). Первый путь – характерен для архей, оомикетов, животных и грибов; он протекает в цитозоле клеток высших растений и многих водорослей (Kuzuyama, 2002), а также паразитов из рода *Trypanosoma* и *Leishmania* (Coppens, Courtoy, 1996). Последовательность реакций MVA-пути представлена на Рисунке 1.

Ферменты, катализирующие реакции MVA пути изучаются более 50-и лет. Изучение их пространственных структур и использование метода сайт-специфического мутагенеза позволило установить аминокислотные остатки, ответственные за каталитические свойства для различных изоформ, выделенных из бактерий, дрожжей и высших организмов (Miziorko, 2011). Большая часть настоящего обзора о структурно-функциональных свойствах ферментов MVA пути основана на этой, безусловно, выдающейся работе проф. Miziorko с использованием представленных в ней графических данных о

структуре ферментов и их комплексов, экспериментально полученных в многочисленных исследованиях в том числе и самого автора (Miziorko, 2011).

В последние годы были определены «недостающие» ферменты мевалонатного пути (Smit, Mushegian, 2000) для археи *Thermoplasma acidophilum* (Euryarchaeota) мевалонат-3-киназа и 3-фосфомевалонат-5-киназа, которые конвертируют мевалонат в IPP по иной схеме (Vinokur et al., 2014(2)). Более того, фосфомевалонатдекарбоксилаза была обнаружена у бактерии (*Chloroflexi*) и археи (*Halobacteria*) (Dellas et al., 2013; Vannice et al., 2014).

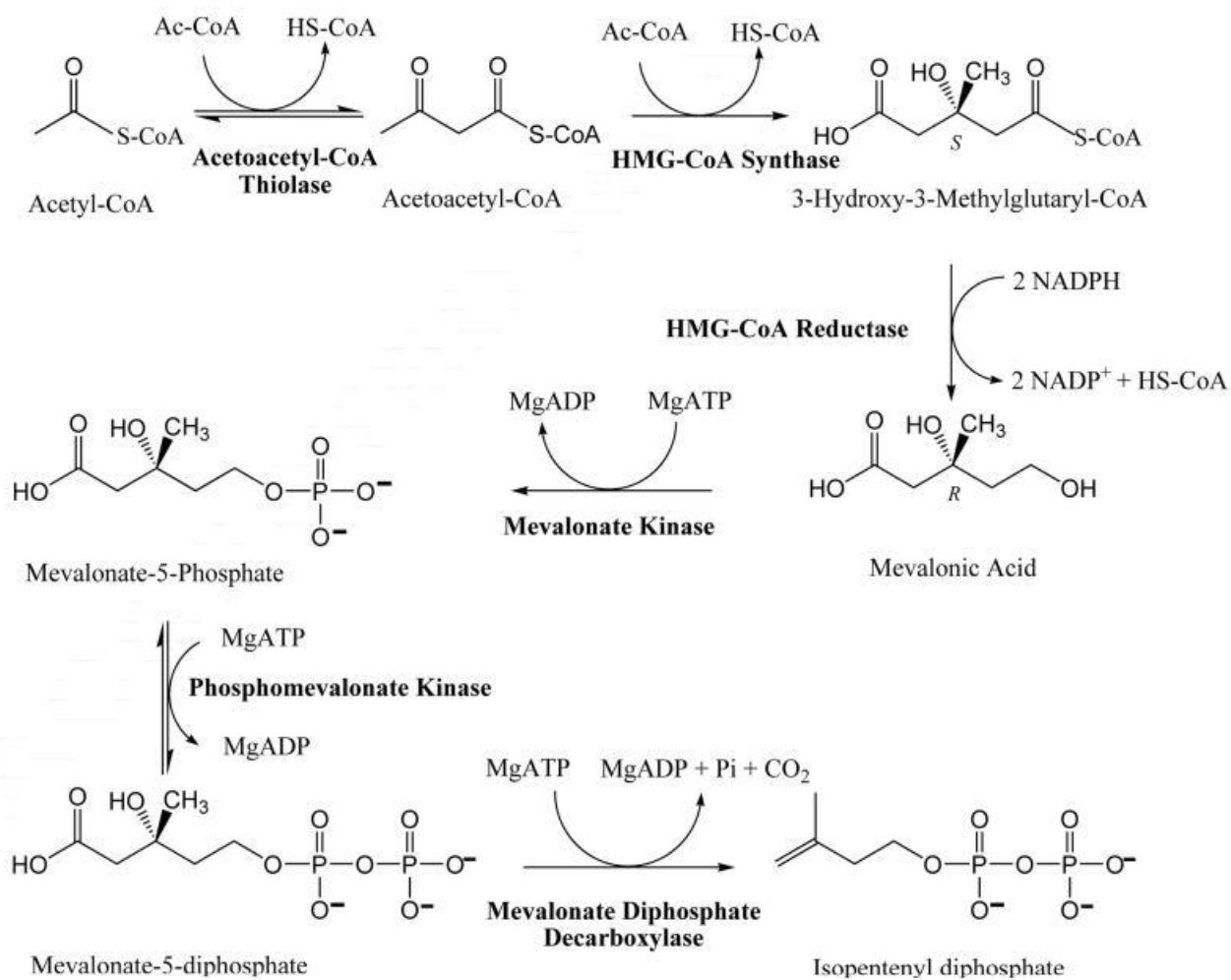


Рисунок 1. Биосинтез изопентенилдифосфата через мевалонатный путь. Изображение взято из (Miziorko et al., 2010).

В бактериях *Listeria monocytogenes* (Firmicutes) и *Streptomyces* (Actinobacteria) обнаружены ферменты генов обоих путей, полученные, по-видимому, горизонтальным переносом при скрещиваниях (Lombard, Moreira, 2011; Boucher, Doolittle, 2000).

2.1.1. Ферменты мевалонатного пути

2.1.1.1. Ацетоацетил-СоА тиолаза

Реакция, катализируемая тиолазой, широко распространена в метаболизме, ферменты обнаружены для разнообразных прокариот и эукариот. Считается, что именно тиолаза является ключевым ферментом, который регулирует процесс синтеза антиоксидантов при абиотическом стрессе, в результате которого блокируется ТСА цикл и изменяется соотношение ацетил-СоА/СоА (Fox et al., 2013; Soto et al., 2011).

Молекула ацетил-СоА надстраивается либо укорачивается на два углерода за счет ацетильного фрагмента. Тиолитическое расщепление, катализируемое с помощью 3-кетацил-СоА-тиолаз (ЕС 2.3.1.16), наиболее знакомо как ключевой шаг в пути бета-окислении жирных кислот. В контексте мевалонатного пути будет рассмотрена реакция конденсации с образованием ацетоацетил-СоА из двух молекул ацетил-СоА под действием ацетоацетил-СоА тиолазы, ЕС 2.3.1.9 .

2 acetyl–CoA $\rightleftharpoons$ acetoacetyl–CoA + CoASH

Механизм реакции включает стадию переноса, т.е. образование субстратом ацетил-СоА ковалентного комплекса с ферментом (ацетил-S-фермент) и высвобождение CoASH. Последующая стадия конденсации включает депротонирование C2 второго атома углерода субстрата ацетил-СоА и атаки полученного карбаниона на C1 атом промежуточного фермент-субстратного комплекса (ацетил-S-фермент) с получением продукта ацетоацетил-СоА и освобождением свободного фермента.

Схожий механизм реакции можно наблюдать при биосинтезе жирных кислот в бактериях на начальной стадии конденсации. Была описана гомологичная реакция конденсации ацетил-СоА и малонил-СоА с образованием ацетоацетил-СоА, катализируемая ферментом NphT7 из *Streptomyces* (Okamura et al., 2010), который располагается в составе кластера генов мевалонатного пути. Существуют ли другие примеры такого варианта биосинтеза

ацетоацетил-CoA, как более типичного, представляет интерес для дальнейших исследований.

Самые ранние работы по мутагенезу, которые выявили остаток цистеина, специфически катализирующий формирование промежуточного комплекса с ферментом (ацетил-S-фермент), относятся к деградационной кетоацил-CoA-тиолазе (Gehring et al., 1970). Вскоре после этого была очищена и охарактеризована ацетоацетил-CoA тиолаза из печени птицы (Clinkenbeard et al., 1973). В большей части более поздних исследований по мутагенезу биосинтетической тиолазы, использовалась рекомбинантная форма белка из *Zoogloea ramigera*, продуцента полигидроксibuтирата. Cys-89 вовлекается в образование интермидиата реакции ацетил-S-фермент (Thompson et al., 1989). Как показано на Рисунке 2 Cys-378 образует активный нуклеофильный сайт (B:), который взаимодействует со второй молекулой субстрата ацетил-CoA в реакции конденсации (Palmer et al., 1991).

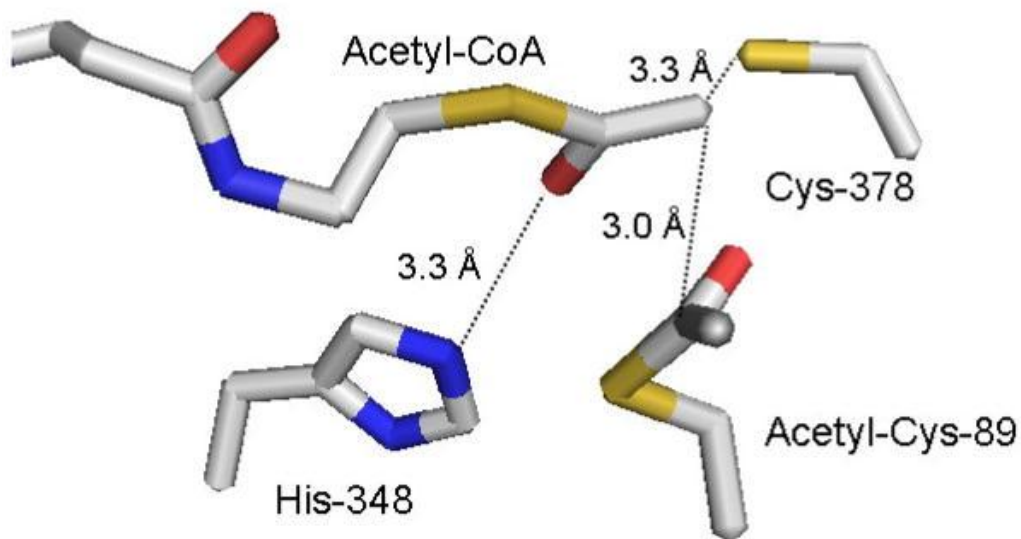


Рисунок 2. Триада аминокислотных остатков активного сайта для ацетоацетил-CoA тиолазы из *Z. ramigera* на основе структурных координат 1DM3 (Modis, Wierenga, 2000). Показана структура промежуточного соединения ацетил-фермент, образованного с Cys-89, которое конденсируется с ацетил-CoA. His-348 взаимодействует с C1-карбонилем связанного ацетил-CoA, чтобы обеспечить перенос заряда, который стабилизирует карбанион C2, образованный после депротонирования общим основанием His-378. Карбанион находится в непосредственной близости от C1 промежуточного соединения ацетил-фермент что способствует эффективной конденсации с образованием ацетоацетил-CoA и регенерацией свободного фермента. Изображение взято из (Miziorko et al., 2010).

Был опубликован ряд статей посвященных рассмотрению структуры белка из *Z. ramigera*. В частности, была получена структура промежуточного продукта реакции фермента со связанной молекулой ацетил-СоА (Modis, Wierenga, 2000).

Такой подход привел к структурам, для которых подтвердилось, что Cys-89 является сайтом для образования промежуточного комплекса реакции, а также Cys-378 работает как основание, и депротонирует второй субстрат ацетил-СоА перед конденсацией (Рисунок 2). Cys-378 находится в пределах 3,3 Å от С2 ацетил-СоА и служит в качестве общего основного катализатора. С2 ацетил- СоА расположены очень близко (3,0 Å) с С1 ацетил-фермента, как это требуется для эффективной реакции конденсации.

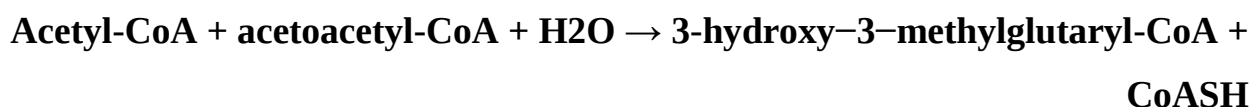
Положительно заряженный консервативный His-348 может взаимодействовать с карбонилем тиоэфира ацетил-СоА, чтобы стабилизировать карбанион, который получается после отрыва протона. Такая стабилизация основными аминокислотными остатками производного карбонила ацил-СоА-тиоэфира с отрицательным зарядом, который образуется во время реакции, является постоянной темой при описании работы различных ферментов, реакции конденсации/расщепления по Кляйзену (Anstrom et al., 2003; Fu et al., 2010; Campobasso et al., 2004 ; Theisen et al., 2004; Koon et al., 2004).

Триада Cys-His-Cys аминокислотных остатков активного сайта тиолазы напоминает схожие мотивы, которые обнаруживаются для семейства "ферментов конденсации", и могут быть сопоставлены с триадой Cys-His-Asn, описанной для "ферментов конденсации" бактериального второго типа биосинтеза жирных кислот (White et al., 2005). Другой вариацией такой триады является фермент, катализирующий следующую реакцию мевалонатного пути, 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА синтаза.

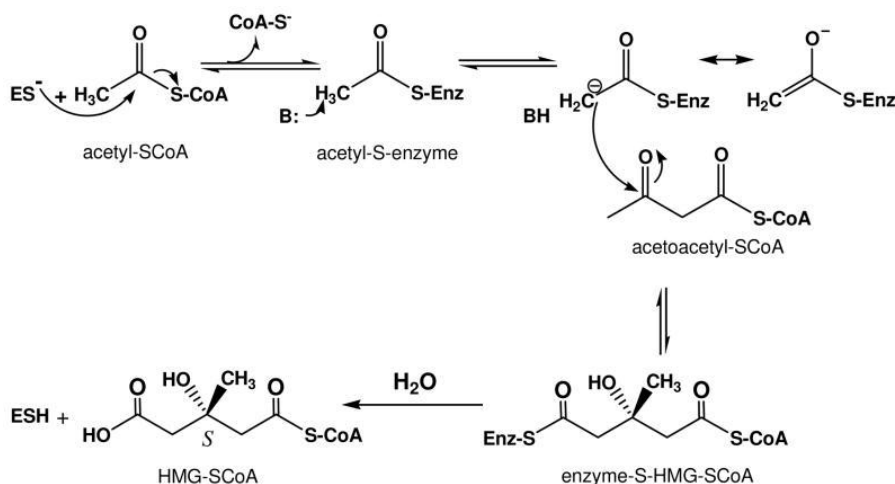
2.1.1.2. Гидрокси-3-метилглутарил-СoA синтаза

Биосинтез 3-гидрокси-3-метилглутарил-СoA (HMG-СoA) путем конденсации ацетил-СoA с ацетоацетил-СoA впервые был продемонстрирован с использованием препарата белка, выделенного из дрожжей (Ferguson, Rudney, 1955). Изоформа, находящаяся в митохондриях действует в кетогенном пути биосинтеза ацетоацетата (Reed et al., 1975), в то время как изоформа из цитозоля принимает участие в биосинтезе изопреноидов через мевалонатный путь (Clinkenbeard et al., 1975). Некоторые бактерии используют мевалонатный путь, например продукт гена *mvaS* из *Enterococcus faecalis* имеет активность HMG-СoA синтазы (Sutherlin et al., 2002).

HMG-СoA синтаза (EC 2.3.3.10) катализирует необратимую реакцию, хотя была продемонстрирована возможность поддерживать медленный катализ расщепления HMG-СoA (Theisen et al., 2004):



В работах с дрожжевым ферментом также описано образование ковалентного промежуточного продукта реакции (Middleton et al., 1974). Для фермента из печени птицы было идентифицировано образование промежуточного комплекса фермент-S-HMG-CoA (Miziorko et al., 1975; Miziorko et al., 1977).



Реакция конденсации протекает с инверсией стереохимии с образованием S-изомера HMG-CoA (Cornforth et al., 1974). Чтобы идентифицировать Cys-129 (нумерация ферментов из цитозоля) в качестве остатка, участвующего в образовании промежуточных продуктов реакции, пользовались методы секвенирования белков и пептидов (Miziorko et al., 1985(2)), мечеными ингибиторами (Miziorko et al., 1985(1)), а также доступными рекомбинантными формами птичьего, человеческого и бактериального ферментов (Misra et al., 1993; Rokosz et al., 1994; Steussy et al., 2005; Campobasso et al., 2004). При замене Cys-129 на серин активность HMG-CoA синтазы не детектировалась в отличие от ацетоацетил-CoA тиолазы (Misra et al., 1993). При ингибировании цитозольного фермента человека гимеглюсином также задействован цистеин активного сайта, образующий ковалентный аддукт фермент-ингибитор (Rokosz et al., 1994). Гимеглюсин является мощным ингибитором стероидогенеза в печени (Greenspan et al., 1987). Методы мутагенеза в энзимологии были использованы для подтверждения вовлечения гистидина (His-264) в связывание субстрата ацетоацетил-CoA (Misra et al., 1996), а также остатка глутамата (Glu-95) в общий кислотно-щелочной катализ (Chun et al., 2000). Замещение Glu-95 аланином или глутамином приводит к нарушению енолизации аналога ацетил-CoA, ацетилдителио-CoA (Wang et al., 2004).

Первые данные о трехмерных структурах HMG-CoA-синтаз были получены с использованием рекомбинантных бактериальных (MvaS) ферментов (Campobasso et al., 2004; Theisen et al., 2004; Steussy et al., 2005). Была опубликована структура комплекса растительного фермента с ингибитором бета-лактоном (Rojer et al., 2004). Лишь сравнительно недавно были опубликованы структуры цитозольных и митохондриальных изоформ фермента (Shafqat et al., 2010). Для структур прокариотического и эукариотического ферментов наблюдается согласование в отношении расположения каталитических остатков и их функциональной роли.

Для кристаллического нековалентного комплекса фермента из *Staphylococcus aureus* с ацетоацетил-СoA наблюдается тиолазоподобная структура с близким расположением остатков цистеина, гистидина и глутамата в активном центре (Campobasso et al., 2004). При работе с ферментом из *E. faecalis* (Steussy et al., 2005) был обнаружен ковалентный аддукт, полученный из субстрата между ацетоацетильной частью и цистеином в активном центре; о такой разновидности никогда не сообщалось для животного фермента. В последующей работе (Steussy et al., 2006) была опубликована структура белка, содержащая замену глицина на консервативный аланин, который предшествует цистеину в активном центре; было предложено возможное объяснение заметного увеличения каталитической активности, зарегистрированной для этого мутанта на основе полученных структурных данных. Совместная работа лабораторий Harrison и Mizioroko по определению кристаллической структуры комплекса фермента из *S. aureus* и продукта HMG-СoA привела к неожиданным результатам (Theisen et al., 2004). Была получена не только структура комплекса фермент-продукт, но и комплекса взаимодействия промежуточного продукта реакции ацетил-фермент с субстратом ацетоацетил-СoA. Эксперименты с раствором в условиях кристаллизации показали, что фермент-зависимое отщепление ^{14}C -HMG-СoA происходит медленно и что HMG-СoA активируется с образованием промежуточного продукта реакции E-S-HMG-СoA. Эта активация протекает через четвертичный атом углерода. Обратимость этой стадии активации подтверждается включением в выделенный заново HMG-СoA двух атомов ^{18}O связанных с атомом C5, при проведении реакции в H_2O^{18} (Theisen et al., 2004). Особого внимания заслуживает структура комплекса ацетил-S-фермент с ацетоацетил-СoA. Эти результаты ясно подтвердили (Рисунок 3) не только важное назначение цистеина в активном центре, но также функцию глутамата в качестве главного основного катализатора, расположенного в непосредственной близости (от 3,0 Å) с C2 атомом комплекса ацетил-S-фермент. Кроме того, наблюдались

тесные взаимодействия (3,1 Å) активного гистидина с атомами кислорода связанного с C1 и C3 атомами ацетоацетил-CoA. Атом C3 ацетоацетил-CoA находится в 3,3Å от атома C2 комплекса ацетил-фермент, так что после депротонирования глутаматом будет происходить эффективная конденсация с образованием комплекса фермент-S-HMG-CoA. При гидролизе в растворе высвобождается продукт и генерируется свободный фермент-SH.

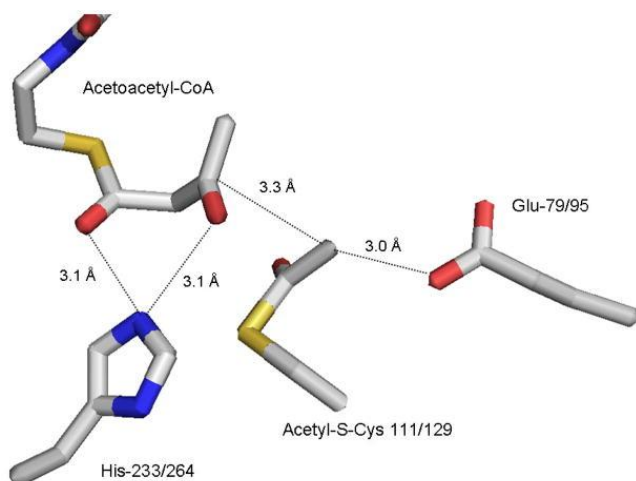
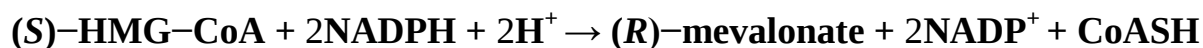


Рисунок 3. Триада остатков активного сайта для HMG-CoA-синтазы (mvaS) из *S. aureus* на основе структурных координат 1XPL (Theisen et al., 2004). Показана структура промежуточного соединения ацетил-фермента, образованного с Cys-111/129 (нумерация для бактериального/животного белка). Второй субстрат фермента, ацетоацетил-CoA связан с His-233/264, взаимодействующим с атомами кислорода C1 и C3, обеспечивая перераспределение заряда для облегчения атаки карбаниона на C3, образованного при переносе протона C2 ацетил-фермента общим основанием Glu-79/95. Изображение взято из (Miziorko et al., 2010).

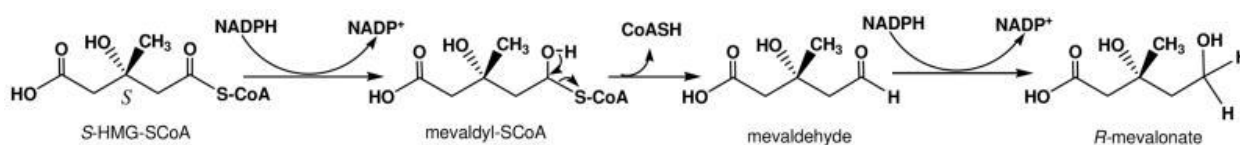
Структурные данные были интерпретированы в контексте каталитической триады Cys-His-Glu, которая контрастирует с триадами, предложенными для тиолазы (Cys-His-Cys) и других ферментов конденсации. Сравнение триады тиолазы с триадой HMG-CoA-синтазы показывает отличие в положениях остатков оснований в соответствии с различными химическими стадиями в этих реакциях и конкретными ролями специфических остатков, которые способствуют депротонированию ацетил-CoA тиолазой по сравнению с депротонированием ацетил-S-фермента HMG-CoA-синтазой.

2.1.1.3. Гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуктаза

Первые исследования вклада HMG-CoA-редуктазы в продукцию мевалоната были опубликованы для фермента, выделенного из дрожжей (Durr et al., 1960), в ходе которых делалось важное допущение о том, что включение ацетата в состав изопреноидов и стеролов происходит через мевалонат. Этот фермент (ЕС 1.1.1.34) также обнаружен у эукариот, археобактерий и некоторых эубактерий.



Превращение тиоэстера HMG-CoA в спирт представляет собой две стадии. Реакция, таким образом, протекает через последовательные стадии восстановления. На начальном этапе получается связанный мевальдил-CoA, после распада которого высвобождается CoASH и образуется мевальдегид; в ходе второго восстановительного этапа образуется мевалонат.



Эукариотические белки (класс I HMG-CoA-редуктазы) связаны с эндоплазматическим ретикулумом и взаимодействуют через мембраны, перекрывающимися спиралями в N-концевом домене (Liscum et al., 1985). Отсюда следует, что каталитический домен оказывается определенным образом, закрепленным в мембране. Эти ферменты класса I сильно ингибируются препаратами классов статинов, которые эффективно модулируют синтез стерола и, как следствие, интенсивно исследуются (Chen et al., 2017). Предложен принципиально новый подход к поиску ингибиторов, основанный не на строении активного центра, а образовании активного димера (Gesto et al., 2014).

Для бактериальных HMG-CoA-редуктаз (класс II) не обнаружено гомологичной последовательности N-концевого домена для ассоциации с мембраной, причем, некоторые из них (иногда в форме рекомбинантного белка)

были выделены в виде растворимых белков. Фермент *Pseudomonas mevalonii* (Gill et al., 1985) обладает деградирующей функцией, позволяющей этому микроорганизму расти на мевалонате в качестве источника углерода. Напротив, фермент *Staphylococcus aureus* (Wilding et al., 2000) обладает биосинтетической функцией и кодируется геном в кластере генов мевалонатного пути.

Растворимый фермент из *P. mevalonii* является полезной моделью для мутагенеза и функциональных исследований. Исследования в лаборатории Rodwell были направлены на идентификацию функционально важных остатков активного сайта (Darnay et al., 1992; Frimpong et al., 1994) и использовали не только мутагенез, а также промежуточный продукт реакции мевальдегид для изучения отдельных стадий реакции, катализируемых диким типом и мутантными формами этого фермента. Уже тогда, еще до появления информации о трехмерной структуре, были получены данные относительно остатков гистидина, аспартата и глутамата, находящихся в активном центре.

Были изучены структуры различных ковалентно связанных комплексов фермента из *P. mevalonii*, а также идентифицирован активный сайт, содержащий лизин (Frimpong et al., 1995; Lawrence et al., 1995). За этими результатами последовала публикация в лаборатории Дайзенхофера структур растворимого каталитического домена человеческого фермента, также лигированного с субстратами или продуктом (Istvan et al., 2000). Несмотря на низкую общую гомологию последовательностей (<20%) и структуры белка для ферментов класса I и класса II, существует значительное сходство между этими ферментами при позиционировании остатков активного сайта, важных для каталитической функции. Остатки двух разных субъединиц образуют активный сайт. В ходе функциональных исследований по мутагенезу определили, что аспартат расположен в активном центре и участвует в сети водородных связей с лизином и глутаматом (Рисунок 4). Хотя и лизин, и глутамат находятся в непосредственной близости от карбонила тиоэфира HMG-CoA, который восстанавливается с образованием мевалоната, существуют различные

предположения, касающиеся их точной роли в карбонильной поляризации субстрата и / или переноса протонов, которые сопровождают восстановление субстрата NADPH.

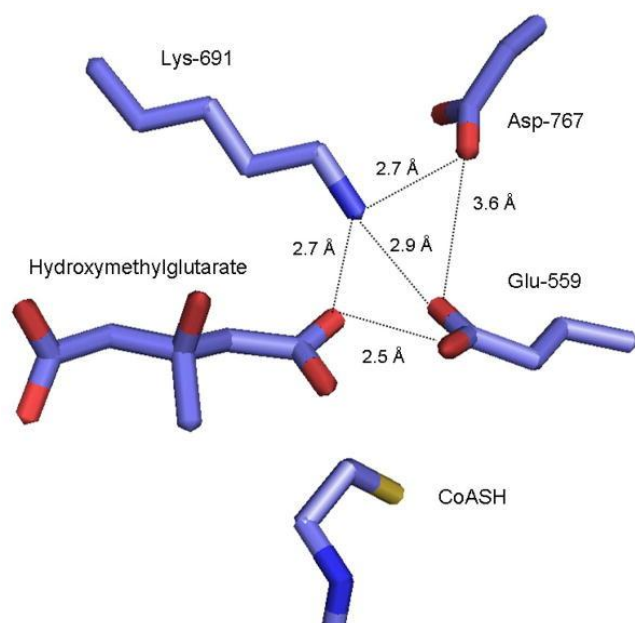


Рисунок 4. Активные остатки сайта в растворимом каталитическом домене HMG-CoA редуктазы человека на основе структурных координат 1DQA (Istvan et al., 2000). Структура включает лигандированный гидроксиметилглутарат и указывает положение трех остатков (Asp-767, Lys-691 и Glu-559), отвечающих за активность фермента. Как лизин, так и глутамат будут находиться в непосредственной близости от тиоэфирного карбонила HMG-CoA, который подвергается двум восстановительным стадиям, что приводит к образованию C5спирта мевалоната. Изображение взято из (Miziorko et al., 2010).

Как говорилось ранее, эффективность ингибирования различными соединениями семейства статинов заметно зависит (изменяется от наномолярных до миллимолярных значений аффинности ингибитора) от того, относится ли фермент к классу I или классу II. Ингибиторы состоят из гидроксиметилглутарил (HMG) -подобного фрагмента, связанного с обширным гидрофобным каркасом (например, декалиновым кольцом в случае мевастатина и симвастатина). Комплексы каталитического домена ферментов человека с различными статинами были кристаллизованы, и их рентгеновские структуры были опубликованы (Istvan et al., 2001). Структурные результаты указывают на связывание части HMG в кармане активного центра, где расположены каталитические остатки глутамата и лизина. Напротив, сайт субстрата NADPH не занят при связывании ингибитора. Структурные исследования,

указывающие на то, что доступ к субстрату HMG-CoA блокируется связыванием ингибитора, что согласуется с наблюдением конкурентного ингибирования по отношению к HMG-CoA (Endo et al., 1976). Также было зарегистрировано множество дополнительных полярных взаимодействий с частью HMG. Гидрофобная часть ингибиторов связана в неглубокой гидрофобной бороздке для белка человека. Предполагается, что большое количество вандер-ваальсовых контактов между неполярными аминокислотами в этой бороздке и разнообразными гидрофобными заместителями, которые являются общей чертой различных статинов, представляет доминирующий вклад в высокое сродство связывания. Сообщалось также о структуре ловастатина, связанного с ферментом класса II из *P. mevalonii* (Tabernero et al., 2003). По аналогии с ферментами класса I, в структуре показаны взаимодействия с остатками (например, Lys, Glu), которые были идентифицированы в каталитическом центре, а также с другими полярными остатками в этом кармане с несколькими водородными связями, опосредованными молекулами воды. Гидрофобный декалиновый кольцевой компонент ингибитора блокирует закрытие С-концевого участка белка, который включает остаток гистидина, вовлеченный в катализ. Таким образом, связывание ингибитора блокирует активный сайт и делает невозможной правильную ориентацию аминокислот активного сайта. Предполагается, что большое различие между взаимодействиями ферментов класса I и класса II со статинами включает в себя карман, частично образуемый альфа-спиралью фермента *P. mevalonii*, который содержит консервативный “THNK motif”. Структурные данные (Endo et al., 1976) могут ускорить разработку потенциальных ингибиторов HMG-CoA редуктазы, которые могут различать ферменты класса I и класса II. Кроме того, подход, предполагающий увеличение аффинности ингибиторов (Istvan et al., 2001), включает дериватизацию исходного ингибирующего соединения с включением химических заместителей, эффективных во взаимодействии с сайтом связывания NADPH.

2.1.1.4. Мевалонаткиназа

Мевалонаткиназа впервые была выделена из дрожжей (Tchen, 1958), и установлены ее свойства. Фермент (МК; MVK; АТР:mevalonate 5-phosphotransferase; ЕС 2.7.1.36) катализирует перенос γ -фосфатной группы от АТР к С5 кислороду гидроксила мевалоновой кислоты, с образованием мевалонат-5-фосфата и высвобождением АДФ.

На данный момент известны несколько классов MVK, делящихся по характеру ретро-ингибирования. I - ингибируются геранилпирофосфатом и фарнезилпирофосфатом (GPP и FPP, соответственно), но не ингибируются мевалонат-5-дифосфатом (DPM), например, впервые была обнаружена высокая чувствительность к GPP и FPP для MVK свиньи (Beytia et al., 1970). Было показано, что MVK из *Staphylococcus aureus* в значительно меньшей степени подвержена ретро-ингибированию DMAPP по сравнению с человеческой. Хотя, в то же время, оба фермента тесно связываются с тринитрофенил-АТР (флуоресцентный аналог субстрата), что указывает на то, что существуют сходства в структурных особенностях, которые важны для каталитической функции (Voynova et al., 2004).

II - ингибируются DPM, но не ингибируются GPP и FPP, например фермент из *Streptococcus pneumoniae* (Andreassi 2nd et al., 2004). Более того, наличие у MVK из *S. pneumoniae* аллостерического сайта связывания DPM, который, как было показано, отсутствует у MVK человека, делает его многообещающей целью для разработки новых избирательных противомикробных препаратов. Поскольку мевалонат способен попадать из среды в клетки *Streptococcus* (Wilding et al., 2000), можно предполагать, что и его фторпроизводные также пройдут и будут фосфорилированы, что может быть использовано как стратегия получения и скрининга серии потенциальных ингибиторов. При этом концентрация мевалоната и его производных в тканях не достаточна, чтобы обеспечить выживание штамму с инактивированным пу-

тем его биосинтеза (Reardon et al., 1987) в хозяйском организме. Не исключено, что DPM или его аналоги также будут ингибировать фосфомевалонатдекарбоксилазу, что делает стратегию из двух мишеней более эффективной.

III - не ингибируются DPM, GPP и FPP, например, MVK из археи *Methanosarcina mazei* (Primak et al., 2011; Kazieva et al., 2017). Хотя было показано, что образование изопреноидов в археях происходит через мевалонат (Ekiel et al., 1986), для большинства архей до сих пор не обнаружены ферменты нижнего мевалонатного пути. Можно предположить наличие иных способов регуляции биосинтеза изопреноидов. Кроме того, в отличие от всех организмов, в археях изопреноиды составляют значительную часть мембраны (Jain et al., 2014), т.е. их биосинтез относится к первичному метаболизму.

Значительная часть публикаций посвящена изучению MVK животных в связи с исследованием генетических заболеваний человека, вызываемых недостаточностью фермента (Tanaka et al., 1990; Schafer et al., 1992).

Начало функциональным исследованиям было положено до появления информации о кристаллических структурах. А именно, была установлена существенная роль Ala-334 в MVK-активности (Hinson et al., 1997). Функционально важными остатками в активном сайте выявлены также Lys-13, Ser-146 (является вторым из двух tandemных серинов, которые располагаются в пределах глицин богатой АТФ консенсусной последовательности), Glu-193 и Asp-204 (Potter et al., 1997(1,2); Cho et al., 2001), и His-20 для MVK крысы (Chu, Li, 2003) и Arg-196 MVK *Methanococcus jannaschii* (Yang et al., 2002).

3-D структура итоплазматической MVK из *M. jannaschii* (Yang et al., 2001) имеет ожидаемую для фермента семейства GHMP конфигурацию. В кристаллической форме находится мономер вместо димерной формы, которая типична для MVK в растворе. На основе идентифицированных ранее остатков, входящих в активный сайт, и особенностей сайтов связывания субстратов, наблюдаемых для других белков семейства GHMP киназ, была по-

строена модель (за основу взята син-конформация при связывании с АТР) и предложено объяснение механизма химической реакции, катализируемой MVK.

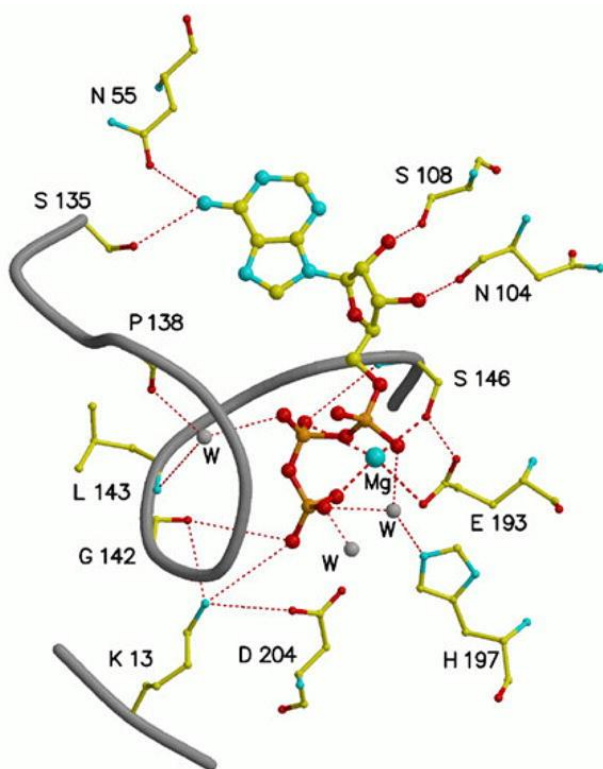


Рисунок 5. Сайт связывания MgATP с MVK крысы, основанный на структурных координатах 1KVK (Fu et al., 2002). АТР связан в анти-конформации. Магний координируется с Glu-193 и Ser-146, а также β - и γ -фосфорильными группами АТР. Каталитический остаток Asp-204 расположен для поддержки переноса γ -АТР-фосфорила на акцепторный субстрат. Консервативный Lys-13 взаимодействует как с Asp-204, так и с γ -фосфорилем субстрата АТР. Прерывистые линии указывают на координацию с магнием; пунктирные линии обозначают водородные связи. Изображение взято из (Miziorko et al., 2010).

Также была получена структура димерной крысиной MVK с лигандом Mg-АТР (Fu et al., 2002) (Рисунок 6). АТР связывается с MVK крысы в анти-конформации. Было подтверждено, что Glu-193 и Ser-146 координируются со связанным катионным лигандом. Lys-13 взаимодействует с γ -фосфорильной группой АТР и образует солевой мостик с Asp-204. Таким образом, Asp-204 находится в предсказанном положении для содействия переноса фосфорила, и расположении мевалоната в вакантном кармане, для чего субстрат создает пространственную ориентацию комплекса, объясняющую функцию Asp-204.

Рисунок 5 иллюстрирует ориентацию остатков активного сайта для MVK крысы, связанной с Mg - АТР.

Сообщается о кристаллической структуре *Leishmania major* MVK, выполненной с высоким разрешением, и впервые дается представление о связывании MVK с субстратом (Sgraja et al., 2007). Рассмотрение и сравнение с ранее опубликованными кинетическими данными о MVK, полученными для разных видов, позволяет описать общие аспекты специфики и механизм реакции MVK (Ferreira et al., 2016).

Совсем недавно была получена кристаллическая структура комплекса мевалонаткиназы из археи *Methanosarcina mazei* (Miller et al., 2018) с субстратом и, впервые, с продуктом реакции – 5-фосфомевалонатом, которая согласуется с наблюдаемыми ранее. Однако более детальный разбор механизма реакции, показал, что перенос фосфорильной группы с АТР на мевалонат может катализироваться Asp138 только опосредованно через молекулу воды, которая участвует в переносе протона.

Также доступна структурная информация для фермента со связанными метаболитами, которые отрицательно регулируют активность MVK. Было представлено строение бинарного комплекса *Streptococcus pneumoniae* MVK с мевалонат-5-дифосфатом (Andreassi 2nd et al., 2007). Связанный метаболит изначально был охарактеризован как аллостерический ингибитор этого бактериального фермента (Andreassi 2nd et al., 2004). Он расположен в каталитической щели кристаллизованного белка, таким образом, что он взаимодействует с остатками аспартата, серина и лизина, которые гомологичны остаткам, взаимодействующими со связанным MgАТР у MVK крысы (Fu et al., 2002). Кроме того, мевалонатдифосфат взаимодействует с треонином, для которого было показано ранее влияние на K_m по мевалонату (Cho et al., 2001). Таким образом, структурные результаты (Andreassi 2nd et al., 2007) интерпретируются как предположение о том, что мевалонатдифосфат взаимодействует с MVK как частичный аналог бисубстрата с его пирогосфорильной группой.

ровкой, имитирующей связь между мевалонатом и АТР как донором фосфора.

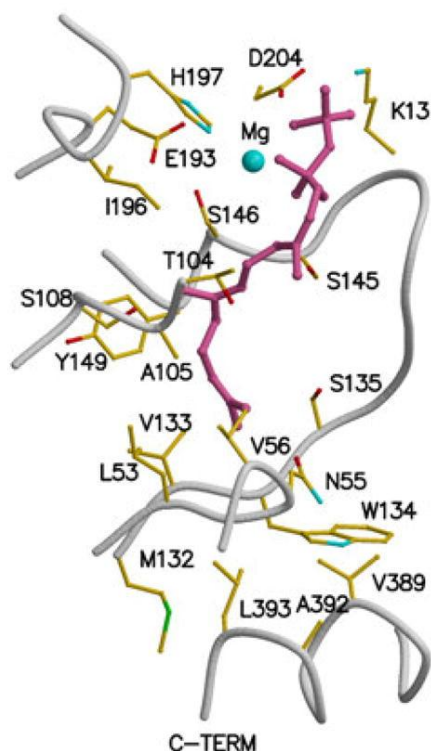


Рисунок 6. Показано связывание ретро-ингибитора с MVK крысы на основе структурных координат 2R42. Нумерация остатков такая же, как и для человеческой MVK. Электронная плотность для связанного ингибитора подгоняется с использованием фарнезилтиодифосфата (FSPP), хотя β -фосфорил не был структурно определен, возможно из-за его неупорядоченной конформации, или частичного гидролиза. Ингибитор находится в сайте связывания АТР (Fu et al., 2008), его α -фосфорильная группа обнаружена, там, где предположительно должна была бы находиться β -фосфорильная группа АТР. Asp-204 и Ser-146 функционируют как лиганды для катиона. Ожидается, что Lys-13 будет взаимодействовать с β -фосфорилем ингибитора. Последние 10 атомов углерода фарнезильного фрагмента взаимодействуют с несколькими неполярными остатками (такими как, Leu-53, Val-56, Val-133, Ile-196). Изображение взято из (Miziorko et al., 2010).

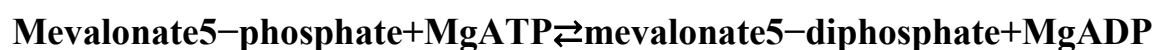
Структурная характеристика ретро-ингибитора, связанного с животными MVK, основывалась на допущении, что FSPP, тио-аналог FPP, является таким же эффективным конкурентным ингибитором АТР, как и природный метаболит (Рисунок 6). Исходное наблюдение, согласно которому кристаллизация человеческой MVK в присутствии FPP приводит только к структуре фермент-пирофосфатного комплекса, побудило использовать MVK крысы с FSPP, который, как ожидается, будет более устойчив к гидролизу (Voynova et al., 2004).

Кристаллизация растворов фермента с FSPP в присутствии Mg^{2+} приводит к образованию структуры MVK крысы, связанной с фарнезилтиофосфатом (FSP) (Fu et al., 2008), что указывает либо на некоторую нестабильность β -фосфорильной группы, либо на частичный гидролиз ингибитора в процессе роста кристаллов (рис. 5). Тем не менее, заполняемость фермента ингибитором была достаточной для идентификации молекулы FSP целиком. Ингибитор связывается в АТФ-сайте с его тиофосфорилом, расположенным в положении, наблюдаемом для β -фосфорильной группы АТФ. Asp-204 и Ser-146 функционируют как катионные лиганды, а K13, как ожидается, взаимодействует с β -фосфорилом FSPP (или FPP).

Полиизопреноидная цепь FSP перекрывает участок, на котором связывается аденозиновая часть АТФ. Последние 10 углеродов FSP (C6-C15, две изопренильные единицы) взаимодействуют с неполярными остатками (например, Leu-53, Val-56, I-196). Ранее при сопоставлении MVK человека и *Staphylococcus* наблюдалось 1000-кратное увеличение констант ингибирования для FPP и FSPP (Voynova et al., 2004). При сравнении поверхности связывания, полученной для связывания FSP / FSPP с животным MVK и смоделированное для MVK из *Streptococcus*, можно проследить причины различий в родстве. MVK животных содержит карман, в котором расположены атомы ингибитора C6-C15 (Рисунок 6). В модели для бактериальной MVK, напротив, цепь C15 ретроингибитора в значительной степени подвергается воздействию растворителя.

2.1.1.5. Фосфомевалонаткиназа.

Фосфомевалонаткиназа (PMK, EC 2.7.4.2) катализирует обратимую реакцию мевалонат-5-фосфата и АТФ с образованием мевалонат-5-дифосфата и ADP:



Активность этого фермента была продемонстрирована в печени свиньи (Cornforth et al., 1960), и впоследствии он был выделен и более подробно охарактеризован (Bazaes et al., 1980). РМК встречается у эукариот и некоторых эубактерий. Аминокислотные последовательности белков животных и РМК с низкой гомологией из беспозвоночных не являются ортологами РМК из растений, грибов и бактерий (Smit et al., 2000).

Таким образом, белки, которые катализируют одну и ту же ферментативную реакцию, могут довольно сильно различаться в зависимости от источника их происхождения. Белки РМК животных и беспозвоночных демонстрируют типичную структуру семейства нуклеозидмонофосфат (NMP) киназ, в то время как другие белки РМК являются членами семейства GMP киназ. Получены данные, что выделенный из тканей фермент свиней катализирует упорядоченную последовательную реакцию с мевалонат-5-фосфатом, который сначала связывается как субстрат, с последующим высвобождением продукта и АТФ (Eyzaguirre et al., 2006). Охарактеризована рекомбинантная форма РМК из *Streptococcus pneumoniae* (Pilloff et al., 2002), для которой наблюдается неупорядоченный (случайный) последовательный механизм реакции. Также, была выделена и охарактеризована РМК из *Enterococcus faecalis* (Doun et al., 2005). Определена последовательность реакции, катализируемой человеческой РМК (Chambliss et al., 1996). Соответствующий ген был использован для получения рекомбинантного белка GST-РМК для проверки подверженности ретро-ингибированию (Hinson et al., 1997). Также была получена и экспрессирована N-концевая His-tag форма рекомбинантного человеческого белка. Этот фермент был использован для исследований по сайт-специфическому мутагену функциональных остатков активного центра (Herdendorf et al., 2006), а также для экспериментов по определению структуры фермента.

N-конец белка содержит вариацию на мотиве Р-петли, задействованной в связывании АТФ. Работа с рекомбинантным белком человека показала, что

Lys-22, а также Arg-18 оказывают существенное влияние на катализ в соответствии с их расположением в Р-петле (Herdendorf, Mizioro, 2006). При оценке важности других основных консервативных остатков было показано, что Arg-110 вносит большой вклад в катализ, Arg-111 и Arg-84 влияют на связывание с мевалонат-5-фосфатом и Arg-141 на связывание с АТФ (Herdendorf et al., 2007).

Мутации в группе остатков, предположительно расположенных на поверхности, были охарактеризованы (Andreassi 2nd, Leyh, 2004) и результаты интерпретированы в контексте структурной модели рекомбинантного фермента из *Streptococcus pneumonia* с лигандами MgАТФ и фосфомевалонатом. Мутация Asp-105, в основном, приводит к уменьшению k_{cat} , в то время как мутации в Lys-9 и Ser-291 оказывают значительное влияние на K_m по фосфомевалонату. Огромный эффект, проявляющийся как взлет K_m по фосфомевалонату, возникает при мутации Ala-293, которая расположена в последовательности петли богатой глицином, отвечающей за распознавание субстрата.

Равномерно ^{15}N -меченый рекомбинантный человеческий белок РМК был также использован в исследованиях ЯМР по изменению структуры, происходящего под воздействием субстрата (Olson et al., 2009). Оценка ЯМР констант равновесного связывания находились в обоснованном соответствии с оценками сродства при исследовании кинетических характеристик. Динамические результаты были интерпретированы в контексте участков, которые могут воздействовать на закрытие домена, что хорошо известно для NMP-киназ подобных белков. В отличие от наблюдения за сопоставимыми конформационными изменениями, зависящими от АТФ или ADP, консервативно замещенный аналог AMPPNP1 индуцирует достаточный размер химического сдвига сигнала ЯМР, затрудняя оценку влияния активного сайта на γ -фосфорильную часть аденинового нуклеотида. Основываясь на наблюдаемом химическом сдвиге, связывание либо мевалонат-5-фосфата, либо АТФ вызывает конформационные изменения в человеческой РМК. Эти биофизические

наблюдения контрастируют с ожиданиями упорядоченного последовательного механизма, основанного на исследованиях кинетики стационарного состояния для свиной РМК (Eyzaguirre et al., 2006).

Возможность случайного связывания субстрата/продукта с человеческой РМК согласуется с наблюдением ингибирования РМК человека продуктом мевалонат-5-дифосфатом, который является конкурентным по отношению к субстрату мевалонат-5-фосфату (Herdendorf TJ, Mizioro NM. 2007). Получение серии ^{15}N меченых белков РМК человека, содержащих одиночные замены аргинина (например, R48M, R111M, R130M, R141M), облегчило ЯМР определение боковых цепей аргинина. Исследования динамики дикого типа РМК и мутантных по аргинину РМК (Olson et al., 2010) показывают, что связывание субстрата с РМК коррелирует с переходом от гибкой к более жесткой структуре белка. Наблюдение распространяется на аргинин, расположенный в боковых цепях, включая несколько остатков на определенном расстоянии от активного сайта. Возникающая жесткость, предложенная по результатам этих динамических исследований, представляется разумной в контексте существенных структурных изменений, документированных для NMP киназных белков.

Информация о трехмерной структуре стала доступной из рентгеновских дифракционных экспериментов на бактериальных и человеческих РМК. Первоначально была описана структура РМК из *Streptococcus pneumoniae* без лиганда, для которой показана характерная структура GHMP киназ (Romanowski et al., 2002), и впоследствии была опубликована структура тройного комплекса РМК- фосфомевалонат-Mg AMPPNP (Andreassi 2nd et al., 2009). Сравнение структур апофермента и тройного комплекса показывает октаэдрическую координацию Mg, включающую Asp-197, Ser-213, мевалонат-5-фосфат и три молекулы воды. Активный пентамер воды отмечается как сильно взаимодействующий с реакционноспособными группами связанного субстрата и аналогом АТР. Наблюдается, что Lys-9 взаимодействует с γ -

фосфорильной группой связанного АМРPNP, что аналогично наблюдению для лизина в комплексе АТФ с другим белком GНMP киназы, крысиной мевалонаткиназой. Ser-147 образует водородную связь с карбоксильной группой связанного фосфомевалоната.

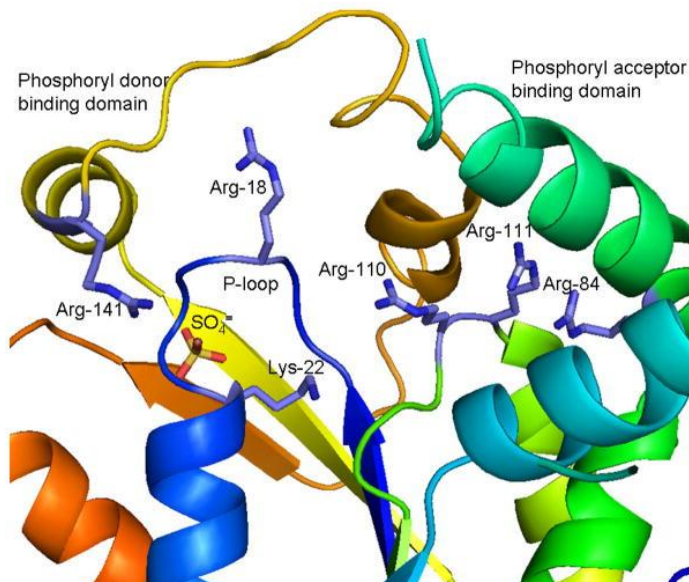


Рисунок 7. Полость активного сайта человеческой РМК и расположение консервативных аминокислот боковых цепей, определяющих ферментативную функцию, в соответствии со структурными координатами 3CH4 (Chang). В то время как фермент без лиганда имеет открытый активный сайт, то связанный сульфат позиционируется в сайте связывания фосфорилированных субстратов. Сульфат расположен вблизи N-концевой Р-петли и взаимодействует с боковой цепью Arg-141, которая, как было показано (Herdendorf, Mizioroko, 2006), существенна для связывания с АТФ. Мутагенез Arg-18, Lys-22, Arg-84, Arg-110 и Arg-111 привел к наблюдению значимых эффектов связывания катализатора или субстрата с этими консервативными для структур РМК остатками. Изображение взято из (Mizioroko et al., 2010).

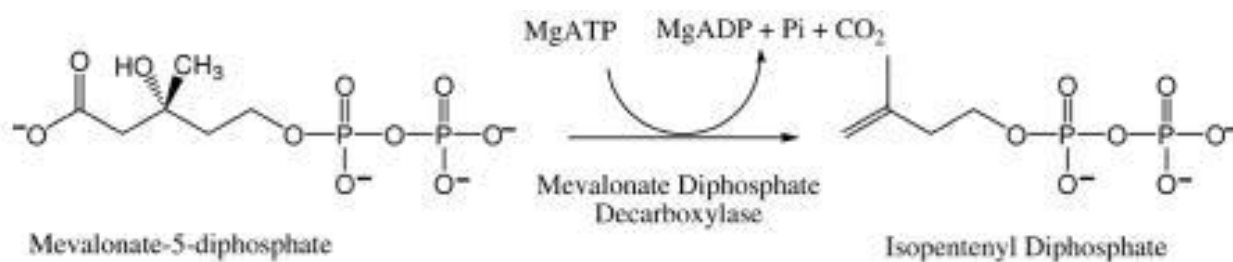
Недавно появилась структура апо-формы человеческой РМК (Chang et al., 2008). Результаты подтверждают, что белок является членом семейства NMP-киназ. Следовательно, нелегированная структура, предположительно, отражает «открытую» форму фермента, то есть участки связывания субстрата или «крышки» не настолько близки к Р-петле содержащейся в сердцевине, как можно было бы ожидать в образцах, содержащих лиганды в сайтах донора и/или акцептора фосфора. Однако имеется ион сульфата, связанный в непосредственной близости к Р-образной петле (Рисунок 7); это интерпретируется как аналог фосфорильной группы и маркер для активного сайта. N-концевое назначение Р-образной петли, которое было предметом более ран-

них функциональных исследований (Herdendorf, Miziorko, 2006), было подтверждено в структуре РМК человека.

Связанный сульфат-ион взаимодействует с амидным азотом Gly-21 в Р-петле, а также боковой цепью Arg-141, который, как было показано (Herdendorf, Miziorko, 2006), влияет на связывание субстрата АТР. Консервативные остатки, проявляющие при мутагенезе наибольшие функциональные изменения каталитической активности РМК или K_m субстрата, могут быть отображены в открытой полости, которая существует между ядром, содержащим Р-петлю и «крышками», которые, как ожидается, будут обладать сайтами связывания субстратов доноров и акцепторов фосфорила (Рисунок 7). Безусловно, более точное функциональное назначение было бы значительно понятнее при наличии структурной информации о лигандных формах РМК человека.

2.1.1.6. Мевалонатдифосфатдекарбоксилаза.

Мевалонатдифосфатдекарбоксилаза (ЕС 4.1.1.33, сокращения: MDD, MVD, MPD, DPM-DC) катализирует АТР-зависимое декарбоксилирование 5-дифосфо-мевалоната (MVAPP) с образованием изопентенил-5-дифосфата (Bloch et al., 1959), отображенное в приведенной ниже схеме:



Эта реакция имеет важное значение для синтеза полиизопреноидов и стеролов по мевалонатному пути (Bergès et al., 1997). Активность была измерена у животных (Alvear et al., 1982), растений (Skilleter et al., 1971) и дрожжей (Chaykin et al., 1959). Генетическая комплементация подразумевает активность в белках *Staphylococcus aureus* и *Trypanosoma brucei* (Byres et al., 2007). Высокоочищенный активный фермент был приготовлен из тканей

птицы (Alvear et al., 1982), свиньи (Chiew et al., 1987) и крысы (Michihara et al., 1997), а в рекомбинантной форме для экспрессии в бактериях, из дрожжей (Krepkiy et al., 2004), человека (Toth et al., 1996; Voynova., 2008; Hinson et al., 1997), *Trypanosoma brucei* и *Staphylococcus aureus* (Byres et al., 2007). При характеристике выделенного из ткани белка предполагалось наличие аргинина, который влияет на активность птичьего фермента (Jabalquinto et al., 1983) и была зафиксирована избирательность для двухвалентных катионов (Jabalquinto et al., 1987). Фермент птиц использовался также для демонстрации того, что переходный перенос фосфорила к С3-кислороду протекает с инверсией стереохимии (Iyengar et al., 1986) и, таким образом, не содержит ковалентных промежуточных Е-Р форм.

Известно, что аналоги метаболитов могут блокировать биосинтез полиизопреноидов/стеролов. Данное предположение, которое также относится к реакции MDD, стимулировало синтез и оценку различных ингибиторов. При использовании 6-фторомевалоновой кислоты в тканевых экстрактах (Nave et al., 1985) MDD стала мишенью для нижестоящего метаболита (6-фтор-MVAPP), который блокировал продукцию стерола. Позднее при исследовании влияния различных фтор производных мевалоната, было показано уже на очищенном свином белке, что 6-фтор-MVAPP является мощным ингибитором MDD и блокирует синтез стерола именно на этом этапе (Reardon et al., 1987). Эти исследования были расширены (Dhe-Paganon et al., 1994), чтобы показать, что 3-фосфо-6-фтор MVAPP аналог нормального интермедиата реакции может образовывать разновидность комплекса с MDD. Кроме того, был синтезирован и охарактеризован азотзамещенный аналог переходного состояния (N-метил-N-карбоксиметил-2-пирофосфоэтаноламин). Результаты показали, что положительно заряженный атом азота имитировал промежуточное соединение реакции, содержащее карбокатион. Чтобы подтвердить, что присутствие карбокатиона определяет природу ингибирующего MDD соединения, был также синтезирован пролин-N-дифосфогликолят

(Barta et al., 2011). На основании подобного рода разнообразных исследований можно было предполагать довольно детальный механизм реакции MDD задолго до появления рекомбинантных ферментов, которые можно было бы использовать для исследования того, как аминокислоты активного сайта MDD задействованы в предсказанном ходе реакции.

Для рекомбинантной MDD человека (Voynova et al., 2008) было подтверждено высокое сродство при ингибировании (конкурентного по отношению к MVAPP) фермента обоими 6-фтор-MVAPP и дифосфогликолилпропином. Предположили, что 2-флюоромевалонат дифосфат может необратимо инактивировать MDD (Qiu et al., 2006), но в последующей работе (Qiu et al., 2007) оказалось, что 2-фтор- и 2-дифтор-MVAPP являются обратимыми конкурентными ингибиторами по отношению к MVAPP. Не так давно была подготовлена серия аналогов мевалоната в качестве субстратов для MVK, PMK и MDD из *Streptococcus pneumoniae* (Lefurgy et al., 2010). Результаты показали, что этот бактериальный MDD очень терпим к замещению 6-метильной группы небольшими заместителями. Устойчивость MDD к соединениям, предназначенным для ковалентного изменения и инактивации фермента, породило гипотезу о том, что декарбоксилирование и отщепление фосфата от промежуточного соединения 3-фосфо-MVAPP являются скорее согласованными, чем диссоциативными процессами. Исходя из чего, согласно данной теории, предполагалось развитие непродолжительного промежуточного состояния в виде карбокатиона (Lefurgy et al., 2010).

Мутагенез дрожжевой MDD и использование кинетических и биофизических методов (Barta et al., 2012; Krepiy, Mizioro, 2004) для характеристики мутантных белков первоначально были сосредоточены на паре консервативных остатков Lys-18 / Asp-305, которые гомологичны аналогичной паре, отвечающей за функцию MVK крысы. Наблюдалось значительное (в 103-105 раза) снижение каталитической активности в результате замещения карбоксил боковой цепи Asp-305 (D305N, D305A). Расширение этого подхода к за-

мещению аланина серией консервативных сериновых остатков показало, что Ser-121 оказывает большое влияние на катализ (уменьшение эффекта в 104 раза при мутации до аланина). Селективное влияние этого второго из двух tandemных консервативных серинов в АТР-консенсусном мотиве ранее наблюдалось у MVK крыс (Cho et al., 2001). Результаты также включали Ser-153 в возможное взаимодействие с АТР и Ser-155 при связывании MVAPP. Мутант Ser-155 демонстрировал завышенные значения K_m и K_i как для MVAPP, так и для дифосфогликолилпролина. В работе над MDD человека (Voynova et al., 2008) было показано, что консервативная мутация Arg-161 (R161Q) снижает значение каталитической активности в 1000 раз. Такое наблюдение согласуется с более ранней работой, в которой задействованность аргинина в активном сайте изучалась методами модификации белка (Jabalquinto et al., 1983). Мутация Asn-17 (N17A) приводит к завышенным оценкам K_m и K_i для MVAPP, дифосфогликолил-пролина и 6-фтор-MVAPP, что указывает на то, что этот остаток участвует во взаимодействиях, которые влияют на связывание фосфорильного акцепторного субстрата. Мутация рекомбинантной крысиной MDD (Qiu et al., 2007) приводила к недетектируемому уровню активности при мутации Lys-23 (K23A) или Arg-162 (R162A).

Чтобы понять, как устроен каталитический центр MDD, были использованы такие подходы как молекулярный докинг и компьютерная симуляция (Weerasinghe et al., 2009), в которых использовалась структурная информация для исходной рентгеновской структуры MDD (дрожжевой фермент (Bonanno et al., 2001)). Хотя структура MDD со связанным лигандом еще не получена, был смоделирован тройной комплекс фермента с АТР и акцептором фосфора. В частности, предполагается, что молекула воды опосредует взаимодействие каталитического аспартата с С3-гидроксилом MVAPP. Также было предсказано, что критическим при взаимодействии MVAPP с глицин богатым консенсусным АТР мотивом является наличие серина.

Структуры белков MDD из *Trypanosoma brucei* и *Staphylococcus aureus* были определены эмпирически (Bytes et al., 2007). Предполагаемые структуры не содержат связанные лиганды, за исключением сульфат-аниона. Для структуры белка из *T.brucei* в высоком разрешении обнаружен Lys-18 / Asp-293 солевой мостик, аналогичный наблюдаемому ранее для крысиной мевалонаткиназы. Для получения модели тройного комплекса, АТР и MVAPP были помещены в структуру белка, которая предсказывает взаимодействие Arg-77 с β -фосфатом MVAPP. Также предлагается взаимодействие Tyr-19 и Arg-149 с C1-карбоксилем MVAPP.

Была получена структура MDD человека (Voynova et al., 2008). Кристаллизованный белок также не содержит связанных лигандов, за исключением сульфат / фосфат-аниона (из буфера кристаллизации); анион связан с Lys-26 и Arg-78. Был использован Z-докинг алгоритм (<http://zdock.bu.edu>) для моделирования бинарного комплекса человеческой MDD с мевалонат дифосфатом. β -фосфат смоделированного субстрата находится в пределах 1 Å связанного аниона Lys-26, Arg-78. Это наблюдение показывает, что модель совокупности бинарных взаимодействий является разумной. Наложение бинарной структуры АТР-MVK позволяет позиционировать АТР в трехмерную модель MDD-АТР-MVAPP без каких-либо стерических конфликтов, поддерживая позиционирование пристыкованных лигандов. Эта модель предсказывает нахождение (наложение) Arg-161 гуанидиновой группы в пределах 3,5 Å C1-карбоксила MVAPP; также было обнаружено, что Asn-17 образует водородную связь с Arg-161. Эти взаимодействия согласуются с результатами функционального и исследованиями по мутагенезу для этих остатков. Карбоксильная боковая цепь Asp-305 находится в пределах 4 Å C3 гидроксила субстрата. Это предположение согласуется с каталитической функцией для Asp-305. Позиционирование Ser-127 вблизи фосфорильных групп АТР также подтверждает прогнозируемую роль этого остатка в активном центре.

Другие, не связанные с лигандом структуры MDD (*Streptococcus pneumoniae* (2GS8) и *Legionella pneumophila* (3LTO) белки) были получены и депонированы в публичной базе данных, но не опубликованы в рецензируемых изданиях. Информация о структурах MDD, содержащих лиганды, ускорило бы детальное понимание функционального назначения.

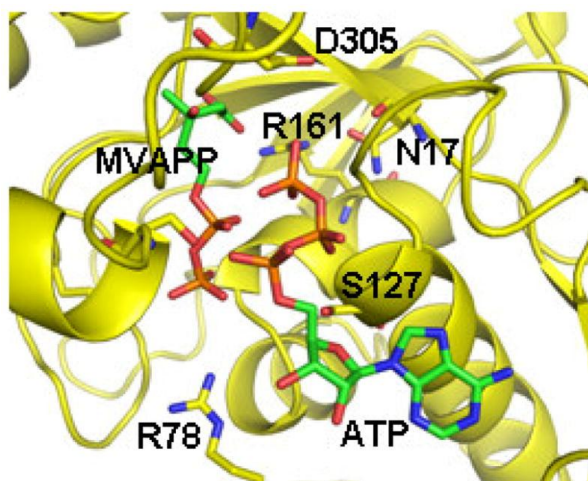


Рисунок 8. Модель тройного комплекса MDD человека с АТФ и мевалонат5-дифосфатом. Бинарная комплексная модель была сгенерирована с использованием алгоритма Z-докинга (<http://zdock.bu.edu>), координат мевалонатдифосфата (2OI2) и человеческого фермента (3D4J). Положение АТФ основано на наложении структуры комплекса MVK-АТФ (1KVK) на структуру человеческой MDD (Voynova et al., 2004). Прогнозируемое положение S127 согласуется с предыдущим предположением о его взаимодействии с фосфорильной цепью АТФ (Kerpiu, Mizioro, 2004). Изображение взято из (Mizioro et al., 2010).

Схема, приведенная на Рисунке 8, объединяет имеющуюся информацию и гипотезы относительно химического состава реакции и участия консервативных остатков MDD. Показано взаимодействие Asp-305 с С3 гидроксидом MVAPP. Это согласуется с наблюдаемым большим вкладом в каталитическую эффективность, а также с позиционной гомологией с предлагаемым общим основным катализом как у MVK. Аналогичные наблюдения за функциональным вкладом в катализ MDD и гомологией с серином, участвующим в реакции MVK, свидетельствуют о том, что Ser-127 взаимодействует с АТФ для ориентации фосфорильной цепи для продуктивного переноса гамма-фосфорильной группы АТФ на MVAPP. Было установлено образование водородной связи Arg-161 с Asn-17.

2.1.1.7. Изопентенилфосфатизомераза

Изопентенилфосфатизомераза (ЕС 5.3.3.2, общепринятые сокращения IDI, IPI, IDP, IPP-изомераза) катализирует решающее превращение IPP в DMAPP в Mg-зависимом и обратимом процессе изомеризации, который является важным этапом, контролирующим биосинтез всех терпеноидов (Berthelot et al., 2012).

Изопентенилфосфатизомераза является необходимым ферментом в организмах, использующих мевалонатный путь, в отличие от МЕР пути, в котором одновременно могут образовываться оба предшественника изопrenoидов. Тем не менее, их соотношение также находится под контролем изомеразы. С учетом потенциальной токсичности пренилдифосфатов (Sivy et al., 2011; Withers et al., 2007; Martin et al., 2001), наличие IDI, несомненно, регулирует пул IPP / DMAPP и поток в путях биосинтеза терпенов. Благодаря пулу DMAPP и работе изопренсинтазы (ЕС 4.2.3.27) происходит эмиссия изопрена у растений (Brüggemann et al., 2002). Кроме того, ферменты цитохром P450, присутствующие в эндоплазматическом ретикулуме растений, также могут окислять и модифицировать монотерпены (Wu et al., 2006; Lückner et al., 2004; Cankar et al., 2011). Интересно, что внешние условия, такие как яркий свет и высокие концентрации солей, способны стимулировать работу изомеразы (Sun et al., 1998; El-Jack et al., 1988; Albrecht, Sandmann, 1994).

Гены IDI двух продуцентов астаксантина, *Phaffia rhodozyma* и *Haematococcus pluvialis*, были клонированы в *E. coli* вместе с другими генами ферментов синтеза каротиноидов. При этом показано, что активность IDI положительно коррелирует с уровнем накопления каротиноидов, что свидетельствует о важности данного фермента для их образования (Kajiwara et al., 1997).

На сегодняшний день было клонировано и идентифицировано множество генов IDI. При проведении филогенетического анализа и поиска гомологии для этих последовательностей были выделены два семейства - IDI1 и

IDI2. Оба типа могут быть найдены в живых организмах, экспрессирующих MEP и / или MVA-пути (Laupitz et al., 2004). Сочетание MEP пути с IDI1 и IDI2 происходит с более низкой частотой, поскольку не является необходимой, и могло быть приобретено, либо утеряно в результате горизонтального переноса генов, аналогично таковому для HMG-CoA редуктазы (Boucher, Doolittle, 2000; Boucher et al., 2001). Существуют организмы, в которых отсутствуют (*Mycoplasma*, *Spiroplasma* и *Nanoarchaeum equitans*) или присутствуют (*Halobacterium sp. NRC1*, *Mycobacterium marinum*, *Photorhabdus luminescence*) оба вида генов IDI (Laupitz et al, 2004; Hoshino et al., 2007). Кроме того, было показано наличие нескольких копий этих генов у млекопитающих, растений и водорослей (Breitling et al., 2003). Поскольку изомераза II типа является необходимой в некоторых важных патогенах человека, включая *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*, также экспрессирующих гены мевалонатного пути, при этом, человеческая изомераза относится к I типу, то IDI2 может представлять собой новую мишень при создании антибиотиков.

IDI1 широко распространен, однако, для растений более характерно наличие двух изоформ: короткой - в цитозоле, длинной - в пластидах (Kreuz et al., 1984; Lütke-Brinkhaus et al., 1984). Содержание IDI в органеллах (Clizbe et al., 2007; Paton et al., 1997), подразумевает ее свободный транспорт через внутреннюю мембрану, а также наличие специфического транспортера (Flügge et al., 2005). В одном организме может иметься несколько изоформ с различной сигнальной последовательностью.

Изомеразы первого типа представляют небольшой белок, всего лишь 182 аминокислоты у *E.coli* (Hahn et al., 1999), активный в виде мономера, что делает его привлекательной моделью для изучения кристаллической структуры. Было показано, например, что он является биметаллическим ферментом с сайтами связывания для Mg^{2+} и Zn^{2+} (Carrigan et al., 2003). Zn^{2+} также участвует в правильном сворачивании белка (Gresh et al., 2010), в то время

как Mg^{2+} имеет решающее значение для катализа и связывания IPP, посредством взаимодействия C67 и E87 с дифосфатным фрагментом. Zn-связывающий сайт включает 3 гистидина (H25, H32 и H69) и 2 глутаминовые кислоты (E114 и E116) (de Ruysck et al., 2006). Предложенный механизм изомеризации IPP в DMAPP (рисунок 9) происходит поэтапно путем добавления / элиминации протонов (Wouters et al., 2004; Wouters et al., 2003). Донором при протонировании ненасыщенной связи IPP выступает E116, с образованием промежуточного третичного карбокатиона. Акцептором при депротонировании с образованием DMAPP является C67.

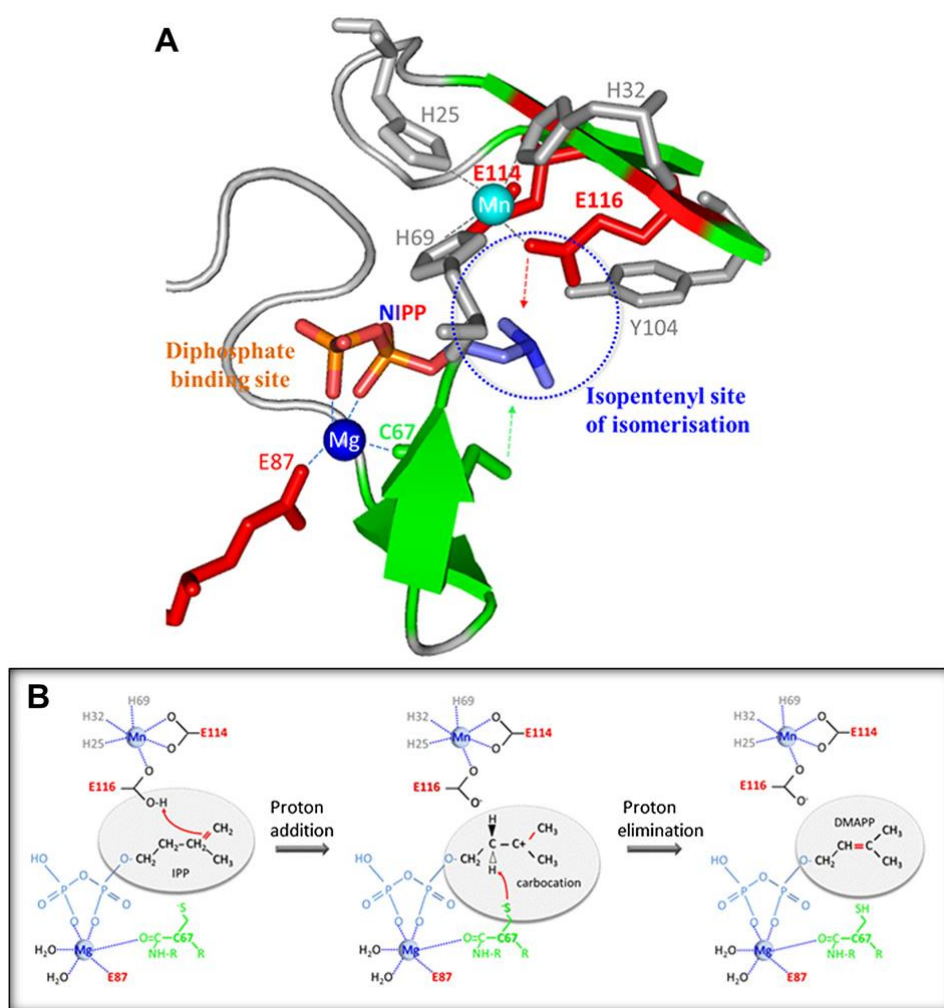


Рисунок 9. Гипотетический механизм изомеризации IDI1. А) Каталитический сайт IDI1 *E. coli* на основе структурных координат PDB 1NFS A (Gresh et al., 2010). В сайте связывания находится аналог субстрата NIPP (N, N-диметил-2-амино-1-этилдифосфат). В) Механистическое представление изомеризации с IDI1 (Wouters et al., 2003). Изображение взято из (Berthelot et al., 2012).

IDI1 относится к семейству ферментов NUDIX, катализирующих гидролиз связей с дифосфатной группой по механизму нуклеофильного замещения в присутствии двухвалентных катионов металлов (Bonanno et al, 2001; Mildvan et al., 2005; Durbecq et al., 2001; Oudjama et al., 2001). В 2007 году для двух одновременно полученных структур человеческих IDI1 из печени и мозга было обнаружено высокое сходство со структурой IDI1 из *E.coli* (Zhang et al., 2006; Zheng et al., 2006).

IDI2 обнаруживается в основном в Gram+ бактериях (Firmicutes, Actinobacteria), некоторых археях, протеобактериях и цианобактериях, с большей частотой в термофильных и гипертермофильных их видах, способных расти в экстремальных условиях. Были получены кристаллические структуры IDI2 из *Thermos thermophiles* (de Ruysck et al., 2008), *Sulfolobus shibatae* (Unno et al., 2009) и *Methanocaldococcus jannaschii* (Hoshino et al., 2011). По сравнению с другим типом, является IDI2 крупным белком, активная форма, как правило, тетрамер/ октамер. Белок относится к семейству флавинсодержащих (FMN) триозфосфат изомераз (TIM) (Macheroux et al., 2011). Впервые этот тип изомеразы был обнаружен у *Streptomyces sp. CL190* и *Staphylococcus aureus* и показана его потребность в FMN и NADPH в дополнение к катионам двухвалентных металлов при аэробных, а также в анаэробных условиях (Kaneda et al., 2001). Однако, для очищенного фермента из *B. subtilis*, близкого по гомологии к *Streptomyces sp. CL190*, NADPH не является необходимым. Аминокислотные остатки, задействованные в сайте связывания FMN абсолютно консервативны для большого количества ортологов. Это указывает на существенную роль FMN, несмотря на низкое сродство фермента к этому кофактору и кажущееся отсутствие окислительно-восстановительного процесса как части каталитического цикла. Сайт связывания субстрата ферментом типа II остается скрыт. Однако участок абсолютно консервативных аминокислотных остатков, содержащих полярные аминокислотные остатки H147, N149, Q152 и E153 в непосредственной близости к

сайту связывания FMN, предполагает, что субстраты могут быть связаны в непосредственной близости с изоаллоксазиновой частью (Laupitz et al, 2004). В *S. shibatae* аминокислотные остатки Ser195, His155, Gln160 и Trp225 образуют сайт связывания изопреноидной части (Nagai et al., 2011). Предполагаемый механизм изомеризации IPP в DMAPP (Рисунок 10) происходит за счет окисления FMN посредством такого же процесса протонирования / депротонирования, как тот, который наблюдается в IDI1 (Rothman et al., 2008; Heaps, Poulter, 2011). Механизмы протонирования можно рассматривать, в частности, как катализируемый N1 / O4 согласованный механизм (Thibodeaux et al., 2010). Возможны несколько других вариантов механизма, основанных на катализируемом N5 карбокатионом (Calveras et al., 2011).

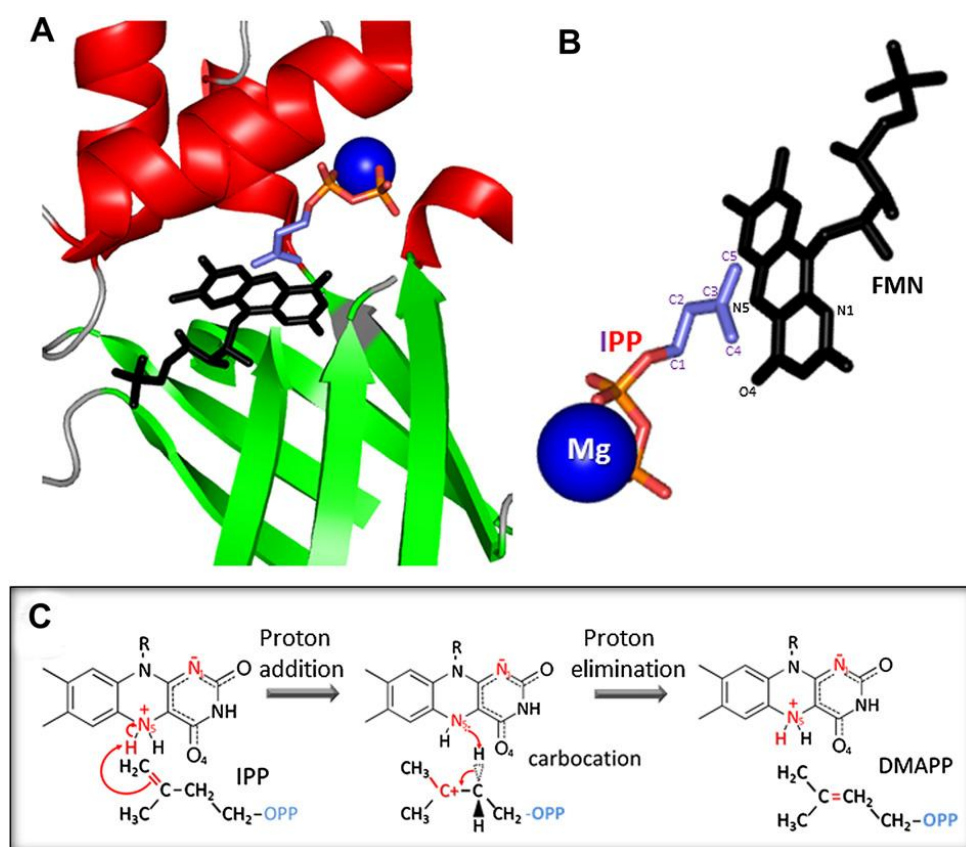


Рисунок 10. Гипотетический механизм изомеризации IDI2. А) Каталитический сайт *Sulfolobus shibatae* IDI2 на основе структурных координат PDB 2ZRW А. Сайт представлен субстратом IPP (цветные линии), кофактором FMN (черные линии) и катион Mg^{2+} (синяя сфера). В) Потенциальные точки взаимодействия между тремя партнерами. С) Механистическое представление изомеризации IDI2, основанное на присутствии цвиттер-ионной формы восстановленного FMN. В этой схеме предлагается каталитический механизм с промежуточным N5-карбокатионом (Unno et al., 2009; Nagai et al., 2011; Heaps, Poulter, 2011). Изображение взято из (Berthelot et al., 2012).

2.1.2. Метилэритритолфосфатный путь – основной путь биосинтеза изопреноидов у бактерий

Немевалонатный путь встречается у бактерий, в пластидах растений и водорослей. Поскольку он является необходимым для многих патогенных бактерий, например *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *P. falciparum*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* и др., а также представителей *Apicomplexa*, таких как возбудитель малярии *Plasmodium falciparum*, соответствующие гены высоко консервативны (Lange et al., 2000), и отсутствуют у человека, имеется возможность использования белков немевалонатного пути в качестве мишеней для создания антибиотиков широкого спектра действия с минимальной токсичностью для человека.

MEP путь начинается с конденсации пирувата и глицеральдегидфосфата с образованием 1-дезоксид-ксилозу-5-фосфата (DXP) в реакции, катализируемой тиаминдифосфатзависимым ферментом 1-дезоксид-ксилозу-5-фосфатсинтазой (DXS) [EC 4.1.3.37]. DXP восстанавливается DXP-редуктоизомеразой [EC 1.1.1.267] (DXR, также известной как IspC) до 4-фосфат-2-С-метил-Д-эритритола (MEP), первого специфического интермедиата, по которому путь и получил свое название. Затем MEP активируется 2-С-метил-Д-эритритол-4-фосфат цитидилтрансферазой [EC 2.7.7.60] (IspD) с получением дифосфоцитидил-2С-метил-Д-эритритола с последующим фосфорилированием 4-цитидил-5'-дифосфо-2-С-метил-Д-эритритолкиназой [EC 2.7.1.148] (IspE), в результате которого образуется 4-дифосфоцитидил-2-метил-Д-эритритол-2-фосфат. Последующая его циклизация в 2-С-метил-Д-эритритол-2,4-циклодифосфат (MEcPP) катализируется MEcPP-синтазой [E.C. 4.6.1.12] (IspF). Затем MEcPP восстанавливается (Е)-гидрокси-3-метилбутен-2-илпирофосфат-ферредоксин-оксидоредуктазой [EC 1.17.7.1] (IspG) до (Е)-4-гидрокси-3-метилбутен-2-илпирофосфата (HMB-PP). Фермент 4-гидрокси-3-метилбутен-2-ил-пирофосфатредуктаза [EC 1.17.1.2] (IspH) ка-

тализует последнюю реакцию МЕР пути, в ходе которой одновременно образуются IPP и DMAPP.

В то время как путь MVA изучался десятилетиями, исследования МЕР пути все еще находятся на ранней стадии из-за недавнего открытия в конце 1990-х годов. Многие вопросы, касающиеся взаимодействия между MVA и МЕР-путями, регуляция и контроль этих путей, внутриклеточное распределение вовлеченных ферментов биосинтеза и каталитические механизмы ферментов МЕР пути все еще недостаточно исследованы, и некоторые известные на данный момент факты кратко излагаются здесь.

DXS катализирует лимитирующий этап биосинтеза изопреноидов и подвержена ретро-ингибированию IPP/DMAPP, что было продемонстрировано для фермента из *Populus trichocarpa* (Banerjee et al., 2013).

Анализ DXR из *Francisella tularensis* предполагает, что Ser177 (эквивалент Ser185 DXR *E. coli*) фосфорилируется (Jawaid et al., 2009). Ввиду непосредственной близости Ser177 к сайту связывания субстрата, фосфорилирование Ser177 должно быть связано с регуляцией активности DXR.

По всей видимости, IspF подвержен ретроингибированию. При рассмотрении его кристаллической структуры обнаруживается центральная полость, в которой предположительно находится сайт связывания пренилфосфата (Richard et al., 2002; Ni et al., 2004; Kemp et al., 2002).

Поскольку в состав комплекса с IspG входит [4Fe-4S] кластер, который является лабильным и чувствительным к кислороду, может быть также задействован в регуляции части клеточных процессов. При некоторых условиях (например, окислительном стрессе) IspG может инактивироваться, что приводит к накоплению МЕСРР, функционирование которого в качестве антистрессора наблюдалось еще до открытия МЕР пути (Ostrovsky et al., 1998). Кроме того, известно, что МЕСРР модулирует структуру хромосом *Chlamydia trachomatis* (Grieshaber et al., 2004). *C. trachomatis* является внутриклеточным патогеном с двухфазным циклом развития, состоящим из инфекционной вне-

клеточной формы, имеющей конденсированную структуру, и внутриклеточной репликативной формой, имеющей диспергированный хроматин, образующейся через несколько часов после заражения. Было высказано предположение, что МЕСРР может нарушить взаимодействие гистонов и ДНК и отвечает за трансформацию *C. trachomatis* из неактивной в активную форму. Было обнаружено, что МЕСРР реактивирует «некультивируемую» форму *Mycobacterium smegmatis*, вызывая высвобождение гистоноподобного белка HupB для регенерации транскрипционно активного дисперсного состояния (Goncharenko et al., 2007). Таким образом, IspG играет ключевую роль во взаимодействии МЕР-пути со многими физиологическими процессами.

IspH также предположительно является частью глобального механизма регуляции, связанного с изменением уровня 3'-5'-биспирофосфата гуанозина ((p) ppGpp) (Gustafson et al., 1993; Potrykus, Cashel, 2008). RelA-белок - это фермент, участвующий в биосинтезе (p) ppGpp. IspH и RelA образуют белковый комплекс, а образование такого комплекса ограничивает активность RelA и синтез ppGpp (Gustafson et al., 1993). При определенных условиях разрушение комплекса RelA-IspH приводит к высвобождению белка RelA и увеличению концентрации (p) ppGpp. В результате повышенный уровень (p) ppGpp, алармона пищевого стресса, вызывает серию энергопотребляющих метаболических процессов, включая синтез пептидогликана и гидролиз. Однако детали такого механизма, связанного с IspH, еще предстоит проверить.

2.2. Использование гетерологичного мевалонатного пути для продукции изопреноидов в *E. coli*

На сегодняшний день большинство продуцирующих изопреноиды штаммов сконструированы на основе *E. coli*. Метаболизм изопреноидов в *E. coli* сравнительно прост: пренильные группы, полученные из IPP/DMAPP, требуются для ориентации хинонов в мембранах, связывание гема в цитохромах, транслокации сахаров для биосинтеза клеточной стенки и пренилирования тРНК (Keseler et al., 2013). Хотя все гены природного МЕР пути (за

исключением *idi*) необходимы для *E. coli*, фактический поток через путь низкий (Ajikumar et al., 2008), поскольку, скорее всего, природная потребность в изопреноидах небольшая. Чтобы обеспечить продукцию изопреноидов в *E. coli* на приемлемом уровне, необходимо преодолеть природную регуляцию MEP пути. Современное понимание регуляции MEP пути в *E. coli* преимущественно происходит из попыток получения гетерологичных изопреноидов (Vickers et al., 2014), в основном каротиноидов. Например: лейкопина и β -каротина (Rodríguez-Villalón et al., 2008; Yoon et al., 2006; Jin, Stephanopoulos, 2007; Alper et al., 2005; Farmer et al., 2000; Farmer, Liao, 2000; Farmer, Liao, 2001; Kajiwarra et al., 1997;) реже, других изопреноидов, включая, изопрен (Zhao et al., 2011), различные моно- и дитерпены (Reiling et al., 2004; Morrone et al., 2009), таксадиен (Huang et al., 2001; Ajikumar et al. 2010). Несмотря на то, что многое еще предстоит изучить, ясно, что регуляция пути MEP чрезвычайно сложна, причем большинство ферментов задействованы в регуляции на различных уровнях. На сегодняшний день лучший титр для изопреноидов, достигаемый в *E. coli* с использованием MEP пути, составляет 1 г/л (Ajikumar et al. 2010). Это потребовало сложной балансировки экспрессии генов с использованием различных модулей пути. Однако это намного меньше максимального теоретически возможного выхода для MEP пути (Rude et al., 2009). Наибольшие титры изопреноидов порядка десятков грамм на литр были достигнуты в *Saccharomyces cerevisiae* с усиленным нативным MVA путем (Paddon et al., 2013; Westfall et al., 2012).

Чтобы обойти регуляцию нативного MEP пути возможно использование гетерологичного MVA пути полностью (Martin et al., 2003), или частично с добавлением мевалоната (Campos et al., 2001; Rodríguez-Villalón et al., 2008), но присутствие последнего в коммерческих биопроцессах невозможно. Хотя MVA путь в *E. coli* более эффективен при продукции изопреноидов из глюкозы, чем MEP путь (Martin et al., 2003; Yang et al., 2016), он требует оптимизации (Jung et al., 2016; Shen et al., 2016).

Впервые при введении набора плазмид, содержащих гены гетерологичного MVA пути из *Saccharomyces cerevisiae*, в штамм *E. coli* было доказано, что происходит нарушение соотношения предшественников, если работает только нативная изомераза. Как следствие, накопление токсичных для клетки пирофосфатов, замедляющих рост тем сильнее, чем выше концентрация добавленного в среду мевалоната. При этом введение гетерологичного гена на многокопийной плазмиде позволяет исправить ситуацию (Martin et al., 2003).

В последующих работах были оптимизированы кодоны генов MVA пути из *Saccharomyces cerevisiae*, использованы более сильные промоторы и векторы большей копийности в *E. coli*. При этом определялось оптимальное число вводимых копий, какого именно гена приводит к увеличению выхода конечного продукта. MVK оказалась узким местом (Anthony et al., 2009). Оптимизация кодонов и выбор более сильного промотора привели к более высокому уровню экспрессии и трехкратному увеличению конечного продукта аморфа-4,11-диена (предшественник артемизинина) (500 mg/l) (Redding-Johanson et al., 2011). Кроме того, особенно важен баланс экспрессии HMGR и MVK, поскольку накопление HMG-CoA, по-видимому, токсично для клеток *E. coli* (Martin et al. 2003; Pitera et al., 2007). Благодаря разумному выбору HMGR с соответствующими каталитическими свойствами (Приложение) в сочетании со стратегией улучшения доступности кофактора (NADPH) было достигнуто 120-процентное улучшение продукции аморфо 4,11-диена (700mg/l) (Ma et al., 2011). Использование устойчивой к ретроингибированию MVK из археи *Methanosarcina mazei* (Primak et al., 2011) играет ключевую роль для увеличения потока через MVA путь (Beck et al., 2013). Было получено улучшение продукции ликопина при использовании специально отобранной мутантной MVK из *S. cerevisiae* (Chen et al., 2018).

Независимо от того, какой путь биосинтеза изопреноидов используется как основной, необходим соответствующий баланс предшественников C5 (IPP и DMAPP). Более длинноцепочечные изопреноиды требуют увеличения

отношения IPP: DMAPP, а стадия изомеризации становится ограничивающей скоростью для большинства условий. Увеличение экспрессии изопентенилдифосфатизомеразы (IDI) в *E. coli* помогает преодолеть это узкое место (Martin et al. 2003; Vadali et al., 2005; Kajiwara et al. 1997; Alper et al., 2005; Yuan et al., 2006; Ohto et al., 2009; Yan et al., 2011).

2.3. *Pantoea ananatis* как бактерия с высоким биотехнологическим потенциалом

Штамм *P. ananatis* AJ13355 принадлежит к семейству *Enterobacteriaceae*, способный расти при кислот pH в присутствии насыщающих концентраций L-глутамата, большинства органических кислот и сахаров (Moriya et al., 1999). Он был выделен из почвы чайных плантаций (Кавасаки, Япония) специалистами компании Ajinomoto. Хотя многие штаммы *Pantoea* - патогены, штамм AJ13355 относится к 1 группе безопасности, это позволяет использовать его в качестве био-платформы. Проведенное определение полной последовательности генома *P. ananatis* AJ13355 и его аннотация проложило путь для направленной метаболической инженерии и получению биотехнологически значимых соединений на его основе (Hara et al., 2012). Наиболее мощные методы генной инженерии и редактирования геномов, позволяющие вводить как точечные мутации, так и оптимизировать уровень экспрессии генов, были скорректированы для использования в специально отобранном для этого варианте штамма AJ13355, устойчивом к экспрессии генов λ Red-системы (Katashkina et al., 2009). Введение в хромосому протяженных участков, состоящих из нескольких генов, стало возможным благодаря использованию Dual In/Out метода (Minaeva et al. 2008), а также клонированию *in vivo* (Andreeva et al. 2011). Природная устойчивость этого штамма к высоким концентрациям L-глутаминовой кислоты и способность роста при низких значениях pH были успешно использованы для промышленного производства данной аминокислоты (Izui et al., 2006) и цистеина (Takumi et al., 2017).

3. Материалы и методы

3.1 Бактериальные штаммы и плазмиды

Таблица 1 - Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы	Генотип	Источник
SC17(0)	Штамм <i>P. ananatis</i> AJ13355, устойчивый к экспрессии генов Red фара λ	ВКИМ / (Katashkina et al., 2009)
CC118(λ pir)	<i>E.coli</i> λ pir Δ (ara-leu) araD Δ lacX74 galE galK phoA20 thi-J rpsE rpoB argE(Am) recAl	ВКИМ/ (Herrero et al., 1990)
MG1655	<i>E.coli</i> F ⁻ , ilvG, rfb-50, rph-1	ВКИМ/ (Blattner et al., 1997)
BL21(DE3)	<i>E.coli</i> B F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	коллекция АГРИ (Studier & Moffatt 1986)
SC17(0) Δ ampC Km ^R	SC17(0) Δ ampC::attL _{φ80} -kan-attR _{φ80}	(Mihara et al., 2016)
SC17(0) Δ ampC	SC17(0) Δ ampC::attB _{φ80}	
SC17(0) Δ ampH Km ^R	SC17(0) Δ ampH::attL _{φ80} -kan-attR _{φ80}	
SC17(0) Δ ampH	SC17(0) Δ ampH::attB _{φ80}	
SC17(0) Δ crtEZ Km ^R	SC17(0) Δ crtEZ::attL _{φ80} -kan-attR _{φ80}	
SC17(0) Δ crtEZ	SC17(0) Δ crtEZ::attB _{φ80}	
SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K)	SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K)	
SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K) Δ ampH	SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K) Δ ampH::attB _{φ80}	
SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K) Δ ampH::P _{ara} -mvaES	SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K) Δ ampH::P _{ara} -mvaES	
SC17(0) Δ crt::P _{tac} -ispS(M)-mvk ^{mma}	SC17(0) Δ crt::P _{tac} -ispS(M)-mvk ^{mma}	
ISP3-S	SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K) Δ ampH::P _{ara} -mvaES Δ crt::P _{tac} -ispS(M)-mvk ^{mma}	
SC17(0) Δ ampC:: P _{tac} -KKDyI-ispS(K) Km ^R	SC17(0) Δ ampC:: λ attL-kan- λ attR- P _{tac} -KKDyI-ispS(K)	
SC17(0) Δ crt::P _{tac} -mvk ^{mpd}	SC17(0) Δ crt::pAH162-P _{tac} -mvk ^{mpd}	
ISP3-mvk ^{mpd}	SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K) Δ ampH::P _{ara} -mvaES Δ crt::P _{tac} -mvk ^{mpd}	
ISP2	SC17(0) Δ ampC::KKDyI-ispS(K) Δ ampH::P _{ara} -mvaES Δ crt::attB _{φ80}	
ISP3-mvk ^{mma}	SC17(0) Δ ampC:: KKDyI-ispS(K) Δ ampH::P _{ara} -mvaES Δ crt::P _{tac} -mvk ^{mma}	
ISP3-mvk ^{mcl}	SC17(0) Δ ampC:: KKDyI-ispS(K) Δ ampH::P _{ara} -mvaES Δ crt::P _{tac} -mvk ^{mcl}	

Продолжение таблицы 1

ISP3.2-mvk ^{mpd}	SC17(0)ΔampC::λattL-kan-λattR-P _{tac} KKDyI-ispS(K) ΔampH::P _{ara} -mvaES Δcrt::P _{tac} -mvk ^{mpd}	(Mihara et al.,2016)
ISP2.2	<i>P. ananatis</i> SC17(0) ΔampC::λattL-kan-λattR-P _{tac} KKDyI-ispS(K) ΔampH::P _{ara} -mvaES Δcrt:: attB _{φ80}	
ISP3.2-mvk ^{mma}	SC17(0)ΔampC::λattL-kan-λattR-P _{tac} KKDyI-ispS(K) ΔampH::P _{ara} -mvaES Δcrt::P _{tac} -mvk ^{mma}	
ISP3.2-mvk ^{mcl}	SC17(0)ΔampC::λattL-kan-λattR-P _{tac} KKDyI-ispS(K) ΔampH::P _{ara} -mvaES Δcrt::P _{tac} -mvk ^{mcl}	
SC17(0) ΔampC::λattR-Km ^R	SC17(0) ΔampC::λattR-attL _{φ80} -kan-attR _{φ80}	Данная работа
SC17(0) ΔampC::λattR-attB _{φ80}	SC17(0) ΔampC::λattR-attB _{φ80}	
IR1	SC17(0) ΔampC::λattB- P _{tac} -KDyI	
	SC17(0) ΔampC::λattB- P _{tac} -KDyI ΔampH::λattR-attL _{φ80} -kan-attR _{φ80}	
IR2	SC17(0) ΔampC::λattB- P _{tac} -KDyI ΔampH::λattR-pAH162-P _{phoC} -mvaES	
IR3	SC17(0) ΔampC::λattB-P _{tac} -KDyI ΔampH::λattB-P _{phoC} -mvaES	
IR4	SC17(0) ΔampC::λattB-P _{tac} -KDyI ΔampH::λattR-P _{phoC} -mvaES ΔcrtEZ::λattR-attB _{φ80}	
IR5	SC17(0) ΔampC::λattB-P _{tac} -KDyI ΔampH::λattB-P _{phoC} -mvaES ΔcrtEZ::λattB-P _{tac} -mvk ^{mpd}	
IR6	SC17(0) ΔampC::λattB-P _{tac} -KDyI ΔampH::λattB-P _{phoC} -mvaES ΔcrtEZ::λattB-P _{tac} -mvk ^{mpd} Δgcd:: λattR-attB _{φ80}	
IR6-mvk	SC17(0) ΔampC::λattB-P _{tac} -KDyI ΔampH::λattB-P _{phoC} -mvaES ΔcrtEZ::λattB-P _{tac} -mvk ^{mpd} Δgcd:: λattR-pAH162-P _{tac} -mvk ^{mpd}	
IR6-mvaES	SC17(0) ΔampC::λattB-P _{tac} -KDyI ΔampH::λattB-P _{phoC} -mvaES ΔcrtEZ::λattB-P _{tac} -mvk ^{mpd} Δgcd:: λattR-pAH162-P _{phoC} -mvaES	
IR5-3Δ	SC17(0) ΔampC::λattB-P _{tac} -KDyI ΔampH::λattB-P _{phoC} -mvaES ΔcrtEZ::λattB-P _{tac} -mvk ^{mpd} Δgcd::λattR-attB _{φ80} ΔampC2::λattR-attB _{φ80} Δbla::λattR-attB _{φ80}	

Продолжение таблицы 1

Плазмиды	Генотип	Источник
pET-21a(+)	Экспрессионный вектор (Cat. No. 69740-3) на основе системы, полимеразы фага Т7. Содержит С-концевую His•Tag®.	“Novagen” Individual pET Vectors, Cat No. 69740-1; Cat No. 69865-1 коллекция АГРИ
pET-28b(+)	Экспрессионный вектор (Cat. No. 69865-3) на основе системы полимеразы фага Т7. Содержит N-концевую His•Tag®.	
pET-28 <i>mvk</i> ^{mpd}	pET-28b с клонированной <i>M. paludicola</i> SANAЕ MCP_1639 Гис6 сигналом; Km ^R	(Kazieva et al., 2017)
pET-28 <i>mvk</i> ^{mcl}	pET-28b с клонированной MCON_2559 <i>M. concilii</i> GP6 Гис6 сигналом; Km ^R	
pET-28 <i>mvk</i> ^{nmr}	pET-28b с клонированной <i>N. maritimus</i> NMAR_0315 Гис6 сигналом; Km ^R	
pET-28 <i>mvk</i> ^{mma}	pET-28b с клонированной <i>M. mazei</i> Go1 MM_RS09140 Гис6 сигналом; Km ^R	
pET-28 <i>mvk</i> ^{sce}	pET-28b с клонированной <i>Saccharomyces cerevisiae</i> X55875.1 Гис6 сигналом; Km ^R	
RSFRedTER	- RSF1010 репликон; Cm ^R ; λ <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> под контролем промотора P _{lacUV5} с авторегулируемым элементом P _{lacUV5-lacI} ; <i>sacB</i> ; Cm ^R	(Katashkina et al., 2009)
pMW- λ attL-Km ^R - λ attR	pMW118 содержит кассету λ attL-Km ^R - λ attR; Ap ^R ; Km ^R	
pMW- λ Int/Xis-cat	pSC101-ts; λ <i>xis-int</i> гены транскрибируются с λ P _R промотора под контролем CIts857; Cm ^R	
pAH123-cat	pSC101-ts; Cm ^R ; ϕ 80 <i>int</i> ген транскрибируется с λ P _R промотора под контролем CIts857;	(Andreeva et al., 2011)
pAH129-cat	pSC101-ts; Cm ^R ; ϕ 80 <i>xis-int</i> гены транскрибируются с λ P _R промотора под контролем CIts857;	
pMWattphi80	Содержит кассету attL _{ϕ80} -kan-attR _{ϕ80} ; Km ^R	(Minaeva et al., 2008)
pAH162- λ attL-Tc ^R - λ attR	R6K репликон; Tc ^R ; λ attL; λ attR; attP фара ϕ 80	
pAH162- λ attL-Km ^R - λ attR	R6K репликон; Km ^R ; λ attL; λ attR; attP фара ϕ 80	

Продолжение таблицы 1

pАН162- P_{tac} - <i>mvkX</i>	R6K репликон; Tc^R ; $\lambda attL$; $\lambda attR$; <i>attP</i> фага $\phi 80$; содержит гены <i>mvk</i> под контролем P_{tac} промотора($X - mpd, mcl, mma, sce, nmr$)	(Mihara et al., 2016)
pАН162- P_{tac}	R6K репликон; Tc^R ; $\lambda attL$; $\lambda attR$; <i>attP</i> фага $\phi 80$; P_{tac} промотор	
pАН162-KKDyI- <i>ispS(K)</i>	R6K репликон; Km^R ; $\lambda attL$; $\lambda attR$; <i>attP</i> фага $\phi 80$; содержит гены <i>mvk, pmk, mdd, idi</i> из <i>S. cerevisiae</i> и изопренсинтазы из Kudzu	
pАН162- P_{ara} - <i>mvaES</i>	R6K репликон; Tc^R ; $\lambda attL$; $\lambda attR$; <i>attP</i> фага $\phi 80$; содержит гены верхнего MVA пути из <i>E. faecalis</i> под контролем P_{ara} промотора	
pАН162- P_{tac} - <i>ispS(M)</i> - <i>mvk^{mma}</i>	R6K репликон; Tc^R ; $\lambda attL$; $\lambda attR$; <i>attP</i> фага $\phi 80$; содержит ген изопренсинтазы и <i>mvk^{mma}</i> под контролем P_{tac} промотора	
pАН162- P_{tac} -KDyI	R6K репликон; Km^R ; $\lambda attL$; $\lambda attR$; <i>attP</i> фага $\phi 80$; содержит гены <i>pmk, mdd, idi</i> из <i>S. cerevisiae</i> под контролем P_{tac} промотора	(Tajima et al., 2016)
pАН162- P_{phoC} - <i>mvaES</i>	R6K репликон; Tc^R ; $\lambda attL$; $\lambda attR$; <i>attP</i> фага $\phi 80$; содержит гены верхнего MVA пути из <i>E. faecalis</i> под контролем P_{phoC} промотора	

3.2 Среды и условия культивирования штаммов

В работе штаммы *E. coli* и *P. ananatis* культивировались в следующих средах при +37°C и при +34°C соответственно. LB-среда (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl). В качестве минимальной среды использовалась среда M9 (0,04 М Na_2HPO_4 , 0,02 М KH_2PO_4 , 0,019 М NH_4Cl , 0,008 М NaCl). Комбинированная среда представляла собой смесь 1 х LB и 0,5 х M9 с добавлением глюкозы до конечной концентрации 5 г/л. Антибиотики добавлялись в среду до конечных концентраций: канамицин – 50 мкг/мл, хлорамфеникол – 50 мкг/мл, тетрациклин – 10 мкг/мл.

3.3. Генно-инженерные методики

Конструирование, выделение и рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид, проведение Ca^{2+} -зависимой трансформации клеток *E. coli* осу-

ществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами (Sambrook et al., 2001). В работе использовали коммерчески доступные препараты рестриктаз, T4 ДНК-лигазы и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (Fermentas, Литва). Геномная ДНК выделялась набором «Genomic DNA Isolation Kit» (Sigma, США).

3.3.1. Проведение полимеразной цепной реакции

ПЦР проводили на амплификаторе «Perkin-Elmer 2400 GeneAmp PCR System». Реакционная смесь, общим объемом 50 мкл, состояла из: 5 мкл 10x PCR-buffer (Fermentas, Литва) с добавлением $MgCl_2$ до конечной концентрации 1,5 мМ в реакционной смеси, 200 мкМ каждого dNTP, 400 нМ каждого из олигонуклеотидных праймеров и 2ед. Taq-полимеразы (Силекс-М, Москва). Количество ДНК, используемой в качестве матрицы для амплификации, добавлялось в реакционную смесь из расчета 0,2 нг целевого гена. Температурный режим и время реакции подбирали с учётом длины амплифицируемого фрагмента, длины и состава праймеров. Выделение и очистку амплифицированных фрагментов ДНК производили с использованием набора «Genomic DNA isolation kit» (Sigma, США)

3.3.2. Трансформация клеток *P. ananatis* плазмидной ДНК с помощью процедуры электропорации

Штаммы *P. ananatis* выращенные в течение ночи на агаризованной LB среде при +34°C засекали петлей в жидкую среду того же состава и подращивали до $OD_{595}=0,6-0,8$ примерно полтора часа. Для приготовления одной пробы электрокомпетентных клеток использовали 10 мл культуры. Для этого культуру клеток разливали по 1,5 мл в шесть центрифужных пробирок, осаждали центрифугированием 13.000 об/мин в течении 1 мин, промывали дважды 1 мл холодной (0°C) дистиллированной воды, объединяя при этом клетки из двух пробирок. Далее промывали еще три раза 1 мл холодной дистиллированной водой, собирая клетки при последней промывке в одну пробир-

ку. Затем промывали 1 мл 10% холодного (0°C) глицерина и суспендировали в 35 мкл такого же глицерина. Все манипуляции проводились на водяной бане при температуре 0°C. К суспензии клеток добавляли растворенную в дистиллированной воде плазмидную ДНК (50-100 нг). Электропорацию осуществляли на приборе «GenePulser and GeneController» (BioRad, США) при следующих значениях электрического импульса: напряженность электрического поля – 20 кВ/см, постоянная времени 5 мс. Сразу после электропорации клетки суспендировались в 1 мл комбинированной среды и инкубировались при +34°C в течение 1 часа. После этого клетки высевали на твердую селективную среду и инкубировались при +34°C в течение ночи.

3.3.3. Проведение интеграции хромосомы в штамм *P.ananatis*

Штаммы *P. ananatis* выращенные в течение ночи на агаризованной LB среде при +34°C засеивали петлей в жидкую среду того же состава и подращивали до $OD_{595}=0,6-0,8$. Приготовление электрокомпетентных клеток осуществлялось так же, как было описано в предыдущем пункте. Для электропорации использовали (1-2) мкг геномной ДНК. Процедура электропорации осуществлялась при напряженности электрического поля 12,5 кВ/см и длительность электрического импульса 10 мс. Сразу после электропорации клетки суспендировались в 1 мл комбинированной среды и инкубировались при +34°C в течение 1 часа. После этого клетки высевали на необходимую твердую селективную среду и инкубировались при +34°C в течение ночи.

3.3.4. λ Red-зависимая интеграция двухцепочечных фрагментов ДНК в хромосому

Штаммы *P. ananatis*, несущие плазмиду-помощник RSFRedTER, обеспечивающую экспрессию генов гомологичной рекомбинации фага λ , засеивали в LB среду с добавлением хлорамфеникола и подращивали до $OD_{595}=0,25-0,30$. Далее в среду добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 mM для индукции экспрессии генов λ Red-системы. После индукции клетки подра-

щивали до $OD_{595}=0,6-0,8$ и использовали для приготовления электрокомпетентной культуры (см. выше). К суспензии электрокомпетентных клеток добавляли 200-500 нг двухцепочечного фрагмента ДНК. Процедура электропорации осуществлялась при напряженности электрического поля 20 кВ/см и длительности электрического импульса 5 мс. Сразу после электропорации клетки суспендировались в 1 мл комбинированной среды и инкубировались при $+34^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа. После этого клетки высевались на твердую селективную среду и инкубировались при $+34^{\circ}\text{C}$ в течение ночи.

3.3.5. Излечение клеток от плазмиды-помощника RSFRedTER

Для излечения от плазмиды-помощника RSFRedTER клетки *P. ananatis* рассевались до отдельных клонов на комбинированной среде. Среда содержала 20 г/л сахарозы и 1 мМ ИПТГ.

3.3.6. Излечение клеток *P. ananatis* от термочувствительных плазмид-помощников pMW- λ Int/Xis-cat, pAH123-cat, pAH129-cat

Для излечения *P. ananatis* от термочувствительных плазмид-помощников клетки инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$ 3-4 часа в 1 мл LB. Высеивали на твердую среду и инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение ночи. Среди полученных колоний отбирали чувствительные к хлорамфениколу колонии.

3.3.7. Интеграция в хромосому *P. ananatis* с помощью метода «Dual In/Out»

Интеграция в желаемую точку в хромосоме *P. ananatis* с помощью метода «Dual In/Out» в общем виде состоит из четырех этапов:

- 1) клонирование целевой кассеты на CRIM плазмиду (pAH162-Tc^R или pAH162-Km^R);
- 2) конструирование $attB_{\phi 80}$ в хромосоме *P. ananatis* с помощью λ Red-зависимой интеграции и последующей эксцизии с помощью $\phi 80$ Xis;

- 3) введение интегративного вектора, несущего целевую кассету в *attB*_{φ80} в хромосоме *P. ananatis*, с помощью φ80 Int;
- 4) выщепление из хромосомы части интегрированной плазмиды, несущей ориджин репликации с помощью λ Int/Xis.

В результате получается бесплазмидный, безмаркерный штамм, несущий *λattB* и целевой локус, фланкированный φ80*attL/R*.

3.3.8. Конструирование точек интеграции в хромосоме *P. ananatis*

Для конструирования *attB*_{φ80} в геномной ДНК *P. ananatis* с помощью λ Red-зависимой интеграции фрагмент ДНК *attL*_{φ80} -*kan*- *attR*_{φ80} был амплифицирован в ПЦР с праймерами указанными в Таблице 2 и плазмиды pMWattphi (Minaeva et al., 2008) в качестве матрицы для интеграции вместо генов *ampC* (ORF PAJ_1290), *ampH* (ORF PAJ_2072), *crtE-Z* (ORF PAJ_p0121-PAJ_p0126) и *gcd* (ORF PAJ_3473) электропорацией в штамм SC17(0)/RSFRedTER (Katashkina et al., 2009).

Таблица 2 - Конструирование точек интеграции

Локус	Интегративные праймеры	Тестовые праймеры	Тестовые праймеры на интеграцию CRIM плазмид	Тестовые праймеры на вырезание векторной части
Δ <i>ampC</i>	P1 / P2	P7 / P8	P13/P7; P14/P8	P7 / P30
	P51 / P8*			
Δ <i>ampH</i>	P3 / P4	P9 / P10	P13/P9; P14/P10	P9 / P31
	P52 / P4*			
Δ <i>crtE-Z</i>	P5 / P6	P11 / P12	P13/P11; P14/P12	P11 / P32
	P53 / P6*			
Δ <i>gcd</i>	P54 / P58	P63 / P64	P13/P63; P14/P64	P63/ P31
	P57 / P58*			

*- используются для конструирования модифицированной точки интеграции

При проверке Km^R клонов в ПЦР с соответствующими тестовыми праймерами указанными в Таблице 2 были отобраны мутации Δ*ampC*::

attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}, *ΔampH::attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}*, *ΔcrtE-Z::attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}* и *Δgcd::attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}*.

Для конструирования модифицированных точек интеграции *λattR-attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}* в хромосоме *P. ananatis* с помощью *λRed*-зависимой интеграции, фрагмент DNA *λattR* был амплифицирован в ПЦР с праймерами P49 – P50 (таблица 4) и плазмидой рАН162-*λattL*-Tc^R-*λattR* (Minaeva et al., 2008) в качестве матрицы. Фрагмент DNA *attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}* был амплифицирован в ПЦР с праймерами P51 – P8 (Таблица 4) и хромосомой штамма SC17(0) *ΔampC::attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}* (Mihara et al., 2015). Затем, оба фрагмента были обработаны *PstI* и лигированы. Фрагмент DNA, выделенный из агарозного геля соответствующего размера, был использован в качестве матрицы для наработки полноразмерного фрагмента в ПЦР с праймерами P8 и P51 (Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix, NEB) для интеграции вместо гена *ampC* (ORF PAJ_1290) элетропорацией в штамм SC17(0)/RSFRedTER (Katashkina et al., 2009). При проверке Km^R клонов в ПЦР с соответствующими тестовыми праймерами, указанными в Таблице 2, была отобрана мутация *ΔampC::λattR-attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}*. Хромосома, выделенная из данного штамма, использовалась в дальнейшем в качестве матрицы для наработки фрагментов для *λRed*-зависимой интеграции в локусы *ampH*, *ΔcrtE-Z*, *bla*, *gcd* и *ampC2* с помощью выбора соответствующих концевых олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагмента, фланкированного сайтами *λattR* и *attR_{φ80}*. Полученные модификации были проверены в ПЦР с соответствующими тестовыми праймерами. Используемые праймеры указаны в Таблицах 2 и 3.

Штамм SC17(0) *Δbla::λattR - attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}* был получен заменой гена *kan*, в хромосоме SC17(0) *Δbla::λattR - attL_{φ80}-kan-attR_{φ80}* на ген *tetAR*, посредством *λRed*-зависимой интеграции фрагмента ДНК, полученного в ПЦР с праймерами P44/ P45 (Таблица 4) и рАН162-*λattL*-Tc^R-*λattR* в качестве матрицы.

Таблица 3 - Конструирование модифицированных точек интеграции

Делеция	Праймеры для интеграции	Тестовые праймеры	Тестовые праймеры для интеграции			
			CRIM плазмид	pАН162-P _{tac} -KDyI	pАН162-P _{phoC} -mvaES	pАН162-P _{tac} mvk ^{mpd}
Δbla	P55 / P56	P61 / P62	P14/P62	P47/P62	P48/P62	P33/P62
Δgcd	P57 / P58	P63 / P64	P14/P64	P47/P64	P48/P64	P33/P64
$\Delta ampC2$	P59 / P60	P65/ P46	P14/P46	P47/P46	P48/P46	P33/P46

Далее было проведено вырезание маркера канамициновой устойчивости с помощью плазмиды pАН129-*cat* (обеспечивает экспрессию генов $\phi 80int$ и $\phi 80xis$ под контролем термочувствительного репрессора $\lambda CI857$). После электропорации клетки инкубировали при +37°C в течение двух часов, после чего высевали на твердую среду с хлорамфениколом и инкубировали при +37°C в течение ночи. Среди полученных колоний Cm^R были отобраны чувствительные к канамицину варианты и проверены с помощью ПЦР. После чего клетки были излечены от плазмиды-помощника pАН129-*cat*. В результате были получены штаммы, содержащие немаркированные *attB* _{$\phi 80$} ($\lambda attR$ - *attB* _{$\phi 80$} для модифицированного метода «Dual In/Out») в соответствующих локусах.

Таблица 4 - Праймеры, использованные в работе.

	последовательность (5'→3')
P1	ctgatgaactgtcacctgaatgagtgctgatgaaaatatagaaaggctattttcctgaatatgctca
P2	attcgccagcataacgatgccgctgttgagctgaggaacacgtttgtagacagctggccaatg
P3	atgcgcactccttacgtactggctctactggttctttgcgaaaggctattttcctgaatatgctcaca
P4	ttaaggaatcgccctggaccatcatcggcgagccgttctgacgttgtagacagctggccaatg
P5	atgttggtgatttggaatgccctgatcgtttcgttaccggaaaggctattttcctgaatatgctca
P6	atgacggctctgcgcaaaaaaacacgttcactcactcgcgcttgtagacagctggccaatg
P7	gattcccacttcaccgagccg
P8	ggcaggtatgggtgctctgacg
P9	gcgaagccctctccgttg
P10	agccagtcagcctcatcagcg
P11	ccgtgtgggttctgaaagccga
P12	cgttgccgtaaattgatccgt
P13	gttcgcagagtggtatgggttacatcc
P14	gattgggtgggtgaattgtccgtaac
P15	gcaattccatatgacgatggcttccgctccgggcaa
P16	cccaagcttacgcgacttcaggcgaacacctt
P17	gcaattgcatatgacgatgtgctcagctccgggtaa
P18	ggaattcactgaatgaaaataccttccgccgtcgg
P19	gcaattccatatgggtatcctgttctgcgccgg
P20	cccaagcttaattctactttcagaccttgctcgggc
P21	gcaattgcatatgtcattaccgttcttaacttctgc
P22	cccaagcttatgaagtccatggtaaattcgtgtt
P23	gcaattccatatgaagagcaaggcatctgcgcc
P24	cccaagcttaaaacgtgtccaggcccttgaaatc
P25	cccaagcttcgcgacttcaggcgaacacctt
P26	cccaagcttttgatgaatattccctccgccgtt
P27	cccaagcttatctactttcagaccttgctcggtc
P28	cccaagcttatgaagtccatggtaaattcgtgtt
P29	cccaagcttaaacgtgtccaggcccttgaaatc
P30	tggaaaggattcgatagttgag
P31	ggcaatcagcacttccgc
P32	ggttcgtatttatccagcagcca
P33	gcttaaagcttcctgttgacaattaatcatcgg
P34	ctgttgcatgctgtgtgaaattgtatccgctcac
P35	ttcacacaaggagactcccatgtcattaccgttcttaac
P36	cagcgggaactggcggctgggttatgaagtccatggtaa
P37	ccaaaaataataacctttcccggtgcagaagttaagaacggtaatgacatggcagctccttgtgtgaaattgtatccg
P38	tcattgtaatacgcgtaattccgggtgcctgtagtaccaggcgcagcttttgagcctgctttttataactaagtggca
P39	cgcaaaatgtgatctctcca
P40	cgattgagacaagcagtcca
P41	tcagagttgagagccttcagtgcgccag
P42	ggaattctctttatcaagataagttccggatctttt
P43	ccaccagagcagccgtgcccagaccacagcgtgttcgccaacagaataatcttgcgggagcgga
P44	ctacggccagccctgctaaggtagctcgtattcaaatcctaagcacttgctcctgtttactccc
P45	ttgtgtacccaaaaacaaaaatgtgtaccattcaatgatttaagaccactttcacatttaagtgt
P46	tccttcctgccagcctgtct

Продолжение таблицы 4

P47	gaccgtcaaattcatcgtagctc
P48	caatacgggtgcgtagttaccgc
P49	atgccactgcagtcgtttacagggtcactaataccatctaag
P50	ctgatgaactgtcacctgaatgagtgctgatgaaaatata-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac
P51	acagactgcaggaaagggtcatttttctgaatatgctcaca
P52	atgcgcactccttacgtactggctctactggtttctttgc-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac
P53	atgttggtggatttggaatgccctgatcgttttcgttaccg-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac
P54	gagcggaagccatcgtcatcacgttcctcctgttatcatcctcaaataggcaatgagc
P55	atgactcatctgttcagacgacgcgccagcacggccgtta-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac
P56	ttatttggtgtaccctgaggcgacaattttcgctgcaccccgttgttgacagctgggtccaatg
P57	aatgaggtcaacattatggggaaaaactcctcatccttta-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac
P58	gttaattacttctggtcgggcagcgcataggcaatcacgtcgtttgttgacagctgggtccaatg
P59	gtgaccagaaaagagtattcacccagagggttacaccgcccgtcaagtagtataaaaaagctgaac
P60	ctaggcgatattctgcgtctgtgcgccctgctgatacacgcgtttgttgacagctgggtccaatg
P61	gcggggcattcatcagtggga
P62	ccgacgagactcttgagcacac
P63	tctgattgttttctgagtttc
P64	agggcagatagcaggcataa
P65	cgatataggcacagcgggaat

3.3.9. Интеграция CRIM плазмид, рАН162- в сайт $attB_{\phi 80}$ в хромосоме *P. ananatis*

В штамм SC17(0)- $B_{\phi 80}$ с помощью электротрансформации была введена термочувствительная плаزمид-помощник рАН123-*cat* (обеспечивает экспрессию гена $\phi 80int$ под контролем термочувствительного репрессора $\lambda CI857$). После чего в полученные Sm^R колонии была трансформирована целевая плазмид рАН162-*X*. После электропорации клетки инкубировали при +37°C в течение двух часов, затем высевали на твердую с тетрациклином (10 мкг/мл) среду и инкубировали при +37°C в течение ночи. Полученные Tc^R были проверены с помощью ПЦР. После чего клетки были излечены от плазмиды-помощника, рАН123-*cat*. В результате был получен штамм SC17(0)- $\phi 80attB$ -*X*- Tc^R , содержащий оперон в месте заданного гена.

3.3.10. Выщепление плазмидной части

Для выщепления плазмидной части в целевой штамм SC17(0)- $\phi 80attB$ -*X* - Tc^R с помощью электропорации была введена плазмид рMW-Int/*Xis-cat*

(содержит гены фага λ *int* и *xis* под контролем термочувствительного репрессора λ CI857). После электропорации клетки инкубировали при +37°C 3-4 часа, высевали на твердую среду с хлорамфениколом (25 мкг/мл) и инкубировали при +37°C в течение ночи. Среди полученных колоний Cm^R были отобраны варианты Tc^S и проверены с помощью ПЦР. После чего клетки излечены от плазмиды-помощника pMW-Int/Xis-cat. В результате был получен бесплазмидный, безмаркерный штамм SC17(0)-ф80attB-X

3.4. Конструирование штаммов и плазмид

3.4.1. Конструирование плазмид

3.4.1.1. Клонирование генов *mvk^{mpd}*, *mvk^{mcl}* и *mvk^{sce}*, *mvk^{mma}* на pET векторы

Фрагменты ДНК содержащие кодирующую часть генов *mvk^{mma}*, *mvk^{mpd}*, *mvk^{mcl}* и *mvk^{nmr}* были химически синтезированы и амплифицированы с помощью праймеров, указанных в Таблице 5. Прямой и обратный праймеры содержат *Nde*I и *Hind*III (*Eco*RI для *mvk^{mpd}*) сайты рестрикции, соответственно.

Ген ERG12 *mvk* был амплифицирован в ПЦР с использованием Prime Star Polymerase (Takara Bio Inc., Japan) и хромосомы, выделенной из *S. cerevisiae*, в качестве матрицы, с праймерами, указанными в Таблице 5.

Полученные фрагменты были обработаны рестриктазами *Nde*I и *Hind*III (*Eco*RI для *mvk^{mpd}*) и лигированы в соответствующие сайты pET-21a(+) и pET-28b(+) плазмид. Последовательности встроенных фрагментов ДНК были подтверждены секвенированием.

Таблица 5 – Конструирование плазмид.

Ген Вектор	<i>mvk^{mcl}</i>	<i>mvk^{mpd}</i>	<i>mvk^{mma}</i>	<i>mvk^{sce}</i>	<i>mvk^{nmr}</i>
pET-28b(+)	P15/P16	P17/P18	P19/P20	P21/P22	P23/P24
pET-21a(+)	P15/P25	P17/P26	P19/P27	P21/P28	P23/P29

3.4.1.2. Конструирование плазмиды рАН162- P_{tac}

Фрагмент промотора P_{tac} был амплифицирован в ПЦР с праймерами P33/P34 (Таблица 4). После чего, полученный фрагмент и вектор рАН162- $\lambda attL$ - Tc^R - $\lambda attR$ были обработаны рестриктазами *HindIII-SphI* и лигированы. Полученная конструкция была проверена секвенированием.

3.4.1.3. Клонирование генов mvk^{mpd} , mvk^{mma} , mvk^{mcl} , mvk^{nmr} и mvk^{sce} на интегративный вектор

Гены мевалонаткиназ были химически синтезированы в составе векторов рMW-Ptac-Mclmvk-Ttrp, рMW-Ptac-Nmrmvk-Ttrp и рMW-Ptac-Mmamvk-Ttrp (Mihara et al., 2016). Плазмиды обрабатывали рестриктазой *BamHI*, фрагментом Кленова, после этого очищали и обрабатывали рестриктазой *KpnI*. Интегративный вектор рАН162- $\lambda attL$ - Tc^R - $\lambda attR$ был обработан рестриктазами *KpnI-Ecl136II*. В результате лигазной реакции каждого из фрагментов с вектором, были получены плазмиды рАН162- mvk^{mma} , рАН162- mvk^{nmr} и рАН162- mvk^{mcl} .

Химически синтезированный фрагмент гена мевалонаткиназы из *Methanocella paludicola strain SANAE* был переклонирован с плазмиды рUC на интегративный вектор рАН162- P_{tac} по сайтам *PstI-KpnI*. Все конструкции подтверждались рестрикционным анализом.

Фрагмент mvk^{sce} был амплифицирован в ПЦР с праймерами P35/P36 (Таблица 4) с хромосомы, выделенной из *S. cerevisiae*, в качестве матрицы. Затем фрагмент и вектор рАН162- P_{tac} были обработаны рестриктазами *SphI/SacI* и лигированы. Амплифицированный фрагмент был проверен секвенированием. На Рисунке 11 показаны схемы полученных конструкций.

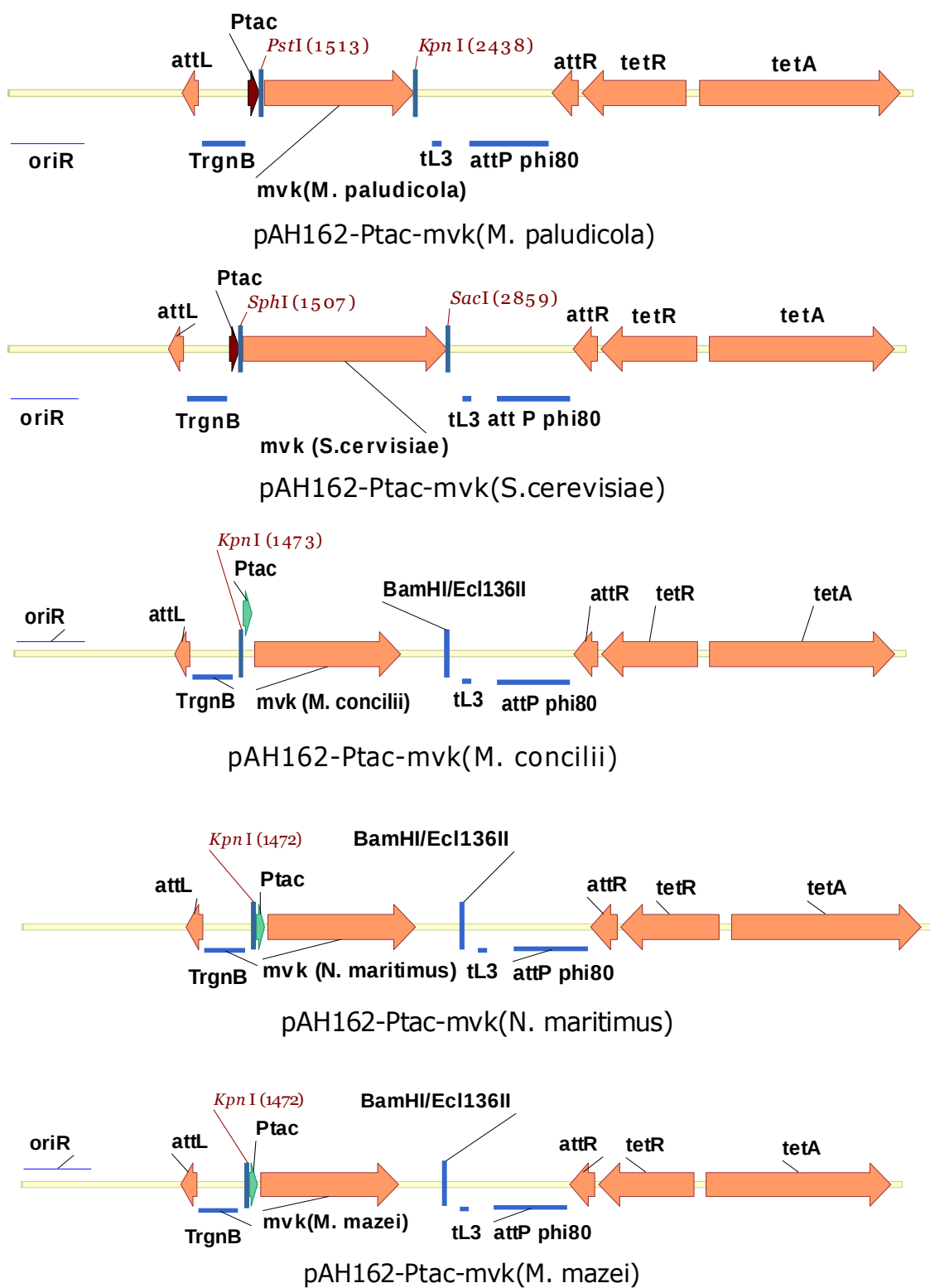


Рисунок 11 - Интегривные кассеты, несущие гены мевалонаткиназ

3.4.2 Конструирование штаммов

3.4.2.1. Конструирование штаммов ISP3.2-*mvk*(X)

Интеграцией плазмиды рАН162-KKDyI-*ispS*(K) в SC17(0)- $\Delta ampC::attB_{\phi 80}$, следуя стандартному протоколу, был получен штамм SC17(0) $\Delta ampC::KKDyI-ispS(K)$.

Хромосома, выделенная из штамма SC17(0) $\Delta ampH::attL_{\phi 80}-kan-attR_{\phi 80}$, была электропорирована в штамм SC17(0) $\Delta ampC::KKDyI-ispS(K)$. Факт интеграции был подтвержден ПЦР (Таблица 2).

После $\phi 80$ -Int/Xis- зависимого вырезания маркера устойчивости к канамицину по стандартному протоколу Km^S клоны были проверены в ПЦР (Таблица 2), и отобран штамм SC17(0) $\Delta ampC::KKDyI-ispS(K)$ $\Delta ampH::attB_{\phi 80}$.

В полученный штамм была интегрирована плазмида рАН162-*P_{ara}-mvaES*. После проверки ПЦР (Таблица 2) на каждом шаге согласно протоколу интеграции был получен штамм SC17(0) $\Delta ampC::KKDyI-ispS(K)$ $\Delta ampH::P_{ara}-mvaES$. В этот штамм была электропорирована хромосома, выделенная из штамма SC17(0) $\Delta crt::pАН162-P_{tac}-ispS(M)-mvk^{mma}$, полученного интеграцией плазмиды рАН162-*P_{tac}-ispS(M)-mvk^{mma}* в штамм SC17(0) $\Delta crt::attB_{\phi 80}$ в соответствии с протоколом.

Структура финальной конструкции $\Delta crt::P_{tac}-ispS(M)-mvk^{mma}$ после вырезания векторной части подтверждалась ПЦР (Таблица 2). В результате, полученный штамм *P. ananatis* SC17(0) $\Delta ampC::KKDyI-ispS(K)$ $\Delta ampH::P_{ara}-mvaES$ $\Delta crt::P_{tac}-ispS(M)-mvk^{mma}$ был назван ISP3-S.

Для получения штамма ISP3-*mvk^{mpd}* сначала плазмида рАН162-*P_{tac}-mvk^{mpd}* была интегрирована в штамм SC17(0) $\Delta crt::attB_{\phi 80}$ (подробное описание конструирования см. в разделе «Материалы и Методы») согласно стандартному протоколу. Из полученного штамма SC17(0) $\Delta crt::pАН162-P_{tac}$

mvk^{mpd} была выделена геномная ДНК для переноса модификации $\Delta crt::pAN162-P_{tac}-mvk^{mpd}$ с помощью электропорации в штамм ISP3-S. После излечения от маркера был получен штамм ISP3- mvk^{mpd} .

Полученный штамм не имел промотора перед генами нижнего MVA пути. Чтобы обеспечить эффективную конститутивную экспрессию перед этим опероном (KKDyI) был введён P_{tac} промотор. Кассета $\lambda attL-kan-\lambda attR-P_{tac}$ была амплифицирована с помощью ПЦР с праймерами P37/P38 (Таблица 4) и хромосомы, выделенной из штамма *P. ananatis* SC17(0) $\lambda attL-kan-\lambda attR-P_{tac}-lacZ$ (Mihara et al., 2015), в качестве матрицы. После чего проводилась λ Red-зависимая интеграция этого фрагмента в штамм *P. ananatis* SC17(0) $\Delta ampC::KKDyI-ispS(K)$, полученный по стандартному протоколу. После удаления плазмиды RSFRedTER стандартным способом, был получен штамм *P. ananatis* SC17(0) $\Delta ampC::P_{tac}-KKDyI-ispS(K)Km^R$.

Затем хромосома, выделенная из штамма *P. ananatis* SC17(0) $\Delta ampC::P_{tac}-KKDyI-ispS(K)Km^R$ была электропорирована в штамм ISP3- mvk^{mpd} . После ПЦР проверки факта интеграции был получен штамм *P. ananatis* SC17(0) $\Delta ampC::\lambda attL-kan-\lambda attR-P_{tac}-KKDyI-ispS(K) \Delta ampH::P_{ara}-mvaES \Delta crt::P_{tac}-mvk^{mpd} Km^R$. В результате удаления маркера устойчивости был получен штамм, названный ISP3.2- mvk^{mpd} .

Для конструирования изогенных штаммов с разными мевалонаткиназами, после $\phi 80$ Int/Xis-зависимого удаления кассеты $P_{tac}-mvk^{mpd}$, и подтверждения наличия модификации $\Delta ampC::\lambda attL-kan-\lambda attR-P_{tac} KKDyI-ispS(K)$ и $\Delta ampH::P_{ara}-mvaES$, был получен штамм *P. ananatis* SC17(0) $\Delta ampC::\lambda attL-kan-\lambda attR-P_{tac}-KKDyI-ispS(K) \Delta ampH::P_{ara}-mvaES \Delta crt::attB_{\phi 80}$, названный ISP2.2.

Штаммы ISP3.2- mvk^{mma} и ISP3.2- mvk^{mcl} были получены интеграцией плазмид $pAN162-P_{tac}-mvk^{mma}$ и $pAN162-P_{tac}-mvk^{mcl}$, соответственно, в штамм ISP2.2 в соответствии со стандартным протоколом. На рисунке 12 представ-

лена структура модификации $\Delta crt::pAN162-P_{tac}-mvk(X)$, где $mvk(X)$ один из генов mvk представленных выше.

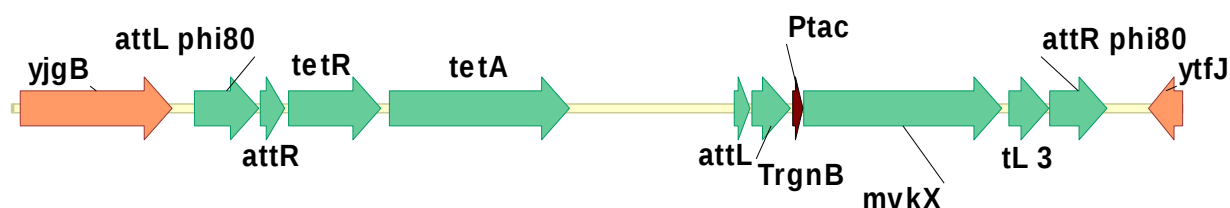


Рисунок 12 - Структура модификации $\Delta crt::pAN162-P_{tac}-mvk(X)$, содержащей гены мевалонаткиназ.

3.4.2.2. Конструирование штамма IR5-3Δ

С использованием модифицированной системы Dual In/Out был сконструирован штамм продуцент изопрена с интегрированными в хромосому всеми генами гетерологичного мевалонатного пути.

В первую очередь, *in vitro* был сконструирован фрагмент $\lambda attR-attL_{\phi 80}-kan-attR_{\phi 80}$, после λ Red-зависимой интеграции которого вместо гена $ampC$ (ORF PAJ_1290) был получен штамм SC17(0) $\Delta ampC::\lambda attR-attL_{\phi 80}-kan-attR_{\phi 80}$.

При вырезании гена kan и удалении хелперной плазмиды был получен штамм SC17(0) $\Delta ampC::\lambda attR-attB_{\phi 80}$.

После введения интегративной плазмиды $pAN162-Km-P_{tac}-KDyI$ в SC17(0) $\Delta ampC::\lambda attR-attB_{\phi 80}$ был получен штамм SC17(0) $\Delta ampC::\lambda attR-pAN162-Km-P_{tac}-KDyI$.

Одновременным удалением $attL_{\phi 80}$ сайта с векторной частью из последнего штамма был получен новый вариант, названный SC17(0) $\Delta ampC::\lambda attB-P_{tac}-KDyI$. В этот штамм была проведена λ Red-зависимая интеграция модификации $\Delta ampH::\lambda attR-attL_{\phi 80}-kan-attR_{\phi 80}$. После вырезания гена kan и интеграции $pAN162-P_{phoC}-mvaES$ с последующим удалением векторной части, был получен штамм IR3.

В штамм IR3 была проведена λ Red-зависимая интеграция хромосомной модификации $\Delta crtEZ::\lambda attR-attL_{\phi 80}-kan-attR_{\phi 80}$. После стандартных шагов для интеграции кассеты $pAN162-P_{tac}-mvk^{mpd}$ был получен штамм IR5.

На первом этапе, модификация $\Delta gcd::\lambda attR-attL_{\phi 80}-kan-attR_{\phi 80}$ была перенесена в продуцент изопрена с помощью Red-зависимой интеграции. После $\phi 80$ -Int/Xis-зависимого удаления маркера устойчивости к канамицину, осуществлялся последовательный перенос $\Delta ampC2::\lambda attR-attL_{\phi 80}-kan-attR_{\phi 80}$ и $\Delta bla::\lambda attR-attL_{\phi 80}-tetAR-attR_{\phi 80}$ модификаций в штамм с последующим одновременным $\phi 80$ -Int/Xis-удалением обоих селективных маркеров. В итоге полученный безмаркерный штамм, содержащий все гены мевалонатного пути, интегрированные в хромосому, и три дополнительных $attB_{\phi 80}$ сайта, был назван IR5-3 Δ . На каждом этапе конструирования были использованы праймеры, указанные в Таблице 2 и 3.

3.4.2.3. Конструирование набора штаммов интеграцией смеси плазмид $pAN162-P_{phoC}-mvaES$, $pAN162-P_{tac}-mvk$ и $pAN162-P_{tac}-KDyI$ в IR5-3 Δ -S

Смесь плазмид, состоящая из $pAN162-P_{phoC}-mvaES$, $pAN162-P_{tac}-mvk$ и $pAN162-P_{tac}-KDyI$ (0.5 мкг каждой) была электропорирована в штамм IR5-3 Δ , содержащий плазмиду-помощник $pAN123-cat$. $pAN162-P_{phoC}-mvaES$ и $pAN162-P_{tac}-mvk$ содержали ген устойчивости к тетрациклину, в то время как $pAN162-P_{tac}-KDyI$ содержит ген устойчивости к канамицину. После электропорации, клетки культивировали аэробно при +37°C в течение 2 часов, после чего рассеивались на L-агар с добавлением тетрациклина либо с добавлением обоих антибиотиков и инкубировались 16 ч при +37°C.

3.5. Ферментация штаммов

3.5.1. Ферментация штаммов ISP3-*mvk*(X) содержащих многокопийную плазмиду с изопренсинтазой

Культивирование штаммов *P. ananatis*, продуцирующих изопрен, проводили в ферментерах ABLE объемом 1 л. Состав среды культивирования указан в Таблице 6. Интересующие штаммы высевали на чашку LB, содержащую 60 мг/л хлорамфеникола, и культивировали при 34 ° С в течение 16 часов. Клетки, полученные с одной чашки, инокулировали и культивировали в 0,3 л среды с глюкозой в ферментер объемом 1 л. Культивирование проводили при pH 7.0 (контролируемом газообразным аммиаком) при температуре 30°C при перемешивании со скоростью 150 - 300 мл/мин. Контроль перемешивания проводили так, чтобы концентрация кислорода в среде составляла 5% или более. Во время культивирования непрерывно добавляли раствор глюкозы 500 г/л, так что концентрация глюкозы составляла 10 г/л.

Таблица 6 - Состав ферментационной среды.

Среда А	
Glucose	80 г/л
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,0 г/л
Среда В	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 г/л
KH ₂ PO ₄	2,0 г/л
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20 мг/л
MnSO ₄ ·5H ₂ O	20 м г/л
Yeast Extract	4,0 г/л

Для индукции генов верхнего мевалонатного пути, регулируемых арабинозным промотором, добавляли L-арабинозу (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) до концентрации 20 mM при OD₅₉₅=16. После добавления L-арабинозы ферментационный газ собирали, а концентрацию газообразного

изопрена определяли с помощью газовой хроматографии (GC-2010 Plus AF, Shimadzu Corporation) проточного мультигазового анализатора (F10, GASERA Ltd.).

3.5.2. Ферментация штаммов производных IR5-3Δ в виалах для газовой хроматографии, содержащих многокопийную плазмиду с изопренсинтазой

Штаммы были трансформированы мультикопийной плазмидой, содержащей ген изопренсинтазы из *Mucuna bracteata*, и культивировались при 34°C на чашках с агаризованной LB средой с добавлением хлорамфеникола (100 мг/л) в течение ночи. Выросшие отдельные клоны штаммов *P. ananatis*, содержащие плазмиду пересеивали и культивировали в течение ночи при 34°C. Полученную биомассу инокулировали в 1 мл среды, содержащей хлорамфеникол (добавляли в виде спиртового раствора с концентрацией 100 г/л до конечной концентрации 100 мг/л). Культивирование проводили в течение 65 часов при 32°C при перемешивании 120 об/мин в виалах для газовой хроматографии объемом 20 мл.

Состав сред, использованных для оценки продуцирующей способности штаммов:

- 1) 100 мМ MOPS pH7.0, 5 г/л глюкозы, 18.7 мМ NH₄Cl, 50.6 мМ NaCl, 0.5 мМ MgSO₄, 0.1 мМ CaCl₂, 1мкМ Na₂MoO₄, 5 мкМ NiSO₄, 10 мг/л KH₂PO₄;
- 2) 20 мМ MES (pH7.0), 4 г/л глюкозы, 1 г/л MgSO₄·7H₂O, 10 г/л (NH₄)₂SO₄, 5 мг/л FeSO₄·7H₂O, 5 мг г/л MnSO₄·5H₂O, 50 мг/л Yeast Extract (Difco, Нидерланды).

3.5.3. Измерение концентрации изопрена

Приготовление стандартов:

Для приготовления стандартных растворов изопрена в воде с концентрацией 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 и 100 мг/л использовался 2,03 г/л раствор изопрена в метаноле (конечная концентрация метанола в растворе стандарта 2,5%).

Для измерения использовали газовый хроматограф GC-2014 (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором и парофазным автосемплером HT200H (hta company, Италия) и колонку RXI-1ms 30м 0,53мм 1,5 мкм (Restek, США). Время измерения 15 мин, температура колонки 37°C, температура детектора 250°C, давление газа в колонке 64,7 кПа, поток поддувочного газа (гелий) 105,1 мл/мин, объемная скорость газа-носителя через колонку 17,02 мл/мин, объем вводимой пробы 0,4 мл.

3.6 Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

3.6.1. Экспрессия и предварительный анализ активности мевалонаткиназ

Трансформанты культивировали в LB, содержащей 0,1 мг/мл ампициллина (для pET-21a(+)) в качестве экспрессионного вектора) либо 0,05 мг/мл канамицина (для pET-28b(+)) в качестве экспрессионного вектора), при 20°C при постоянном перемешивании 140 rpm. При достижении OD₆₀₀ приблизительно 0.5, добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 mM, и далее культивировали в течение ночи при 20°C. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 50 mM NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl и 20 mM имидазола. Затем клетки были разрушены ультразвуком (TOMY UD-201) при 3.5. После центрифугирования (20 000 x g, 20 мин) разрушенные клетки адсорбировали на колонке His-SpinTrap (GE Healthcare). После промывания тем же буферным раствором белки элюировали буферным раствором, содержащим 50 mM фосфата натрия, 0,3 M NaCl и 0,5 M имидазола (pH 7,5). Элюат диализовали в течение ночи при 4°C, с внешним раствором, содержащим 20 mM Трис-HCl (pH 7,5) и 50 mM NaCl, с последующим измерением ферментативной активности.

3.6.2. Экспрессия и очистка рекомбинантных мевалонаткиназ из *M. concilii*, *M. paludicola*, *M. mazei*, *N. maritimus* и *S. cerevisiae*

Для анализа экспрессии мевалонаткиназ из *M. mazei* и *S. cerevisiae*, каждый трансформант культивировали в пробирке при 20°C, содержащей 20 мл LB при 140 об/мин. Для анализа экспрессии мевалоаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola*, каждый трансформант культивировали в 3-литровой колбе в 2 л LB при 20°C, при 140 об/мин. При достижении OD₆₀₀ порядка 0,5, добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ (для продуктов генов *mvk^{mma}*, *mvk^{nmr}* и *mvk^{sce}*) или 1 мМ ИПТГ (для продуктов генов *mvk^{mpd}* и *mvk^{mcl}*), и инкубировали в течение ночи при 20°C для индукции синтеза целевого белка. Собранные клетки суспендировали в буферном растворе А (50 мМ фосфата натрия, 0,3 М NaCl и 20 мМ имидазола), и клетки были разрушены с помощью ультразвука. Разрушение ультразвуком трансформантов, экспрессирующих MVK^{mma}, MVK^{nmr} и MVK^{sce} проводилось при амплитуде 3.5, в то время как для трансформантов, экспрессирующих MVK^{mcl} и MVK^{mpd} использовалась амплитуда 8. После центрифугирования (28000 x g, 30 мин) супернатант адсорбировали на колонке His-Trap HP (GE Healthcare) для элюирования целевого белка линейным градиентом концентрации имидазола (конечная концентрация 0,5 М). Полученные белки подвергали диализу (внешний раствор, содержит 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1 мМ DTT и 50 мМ NaCl). Такой белок считался очищенным ферментом. Количество белка измеряли с помощью Bio-Rad Protein Assay Kit и стандартов BSA.

3.6.3. Приготовление РМК

Ген ERG8 (NM_001182727.1) кодирующий фосфомевалонаткиназу в *Saccharomyces cerevisiae* амплифицировали с помощью ПЦР PrimeSTAR MAX DNA Polymerase Premix (Takara Bio Inc.), используя праймеры P41/P42 (Таблица 4) и хромосому, выделенную из *S. cerevisiae* в качестве матрицы.

pET21-d(+) обрабатывали рестриктазой *NcoI*, затем фрагментом Klenow DNA polymerase I, после чего рестриктазой *EcoRI*. Фрагмент DNA, полученный ПЦР был обработан рестриктазой *EcoRI* и лигирован с описанным выше фрагментом вектора. Ожидаемая последовательность ДНК вставленного фрагмента была подтверждена секвенированием.

E. coli BL21(DE3) трансформировали полученной плазмидой и культивировали в 20 мл бульона LB при 30 ° C при 140 rpm. Когда OD₆₀₀ достиг приблизительно 0,7, добавляли 0,1 mM ИПТГ и культивирование продолжали в течение ночи в тех же условиях. Клетки осаждали центрифугированием, после чего снова суспендировали в буферном растворе А (50 mM фосфат натрия, 0,3 M NaCl и 20 mM имидазол) и разрушали ультразвуком. После центрифугирования полученный супернатант осаждали на колонке His-SpinTrap (GE Healthcare), а адсорбированные белки элюировали элюирующим раствором (буферный раствор А, содержащий 0,5 M имидазол). Полученный элюат диализовали 20 mM Трис-HCl (pH 8,0), содержащим 50 mM NaCl в качестве внешнего раствора.

3.6.4. Определение кинетических параметров ферментов и ингибирование DMAPP, GPP, FPP и DPM.

Каталитическую активность мевалонаткиназы измеряли с использованием модифицированного спектрофотометрического анализа, по сопряженной реакции образования ADP в обратной реакции пируваткиназы (PK) и лактатдегидрогеназы (LDH). Мерой фосфорилирования мевалоната мевалонаткиназой служила начальная скорость убыли NADH. Миллимолярный коэффициент экстинкции NADH в данном исследовании принимался за 6.22 mM⁻¹ см⁻¹.

Каждая 100-мкл реакционная смесь содержала 50 mM Tris (pH 7.6), 50 mM NaCl, 0.4 mM фосфоенолпирувата, 0.05 mM DTT, 0.33 mM NADH, 10 mM MgCl₂, 2 у LDH и 2 у PK.

Константа Михаэлиса по мевалонату K_{m-Mev} для мевалонаткиназ из *M. concilii*, *M. paludicola*, *M. mazei*, *N. maritimus* и *S. cerevisiae* определялись при насыщающей концентрации АТФ (5 мМ) и переменных концентрациях мевалоната. Константа Михаэлиса по АТФ K_{m-ATP} для мевалонаткиназ из *M. concilii*, *M. paludicola*, *M. mazei*, *N. maritimus* и *S. cerevisiae* определялись при насыщающей концентрации мевалоната (5 мМ) и переменных концентрациях АТФ. Значения K_m и погрешности вычислялись с использованием графиков Lineweaver-Burk, полученных путем аппроксимации экспериментальных данных в программе SigmaPlot (<http://www.systat.com>). Для определения скорости сопряженной с реакцией мевалонаткиназы строили график зависимости от времени изменения адсорбции, связанное с количеством NADH, окисленного до NAD^+ , непрерывно измеренного при 340 нм.

Исследования ингибирования белка проводили путем добавления терпенилдифосфатов (DMAPP, GPP, FPP или DPM) в различных концентрациях к реакционной смеси.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Новые мевалонаткиназы и их характеристика

Снятие ингибирования ферментов конечным продуктом является одной из важнейших задач при конструировании штаммов-продуцентов. На сегодняшний день из всех ферментов MVA пути ретроингибирование изучено только для мевалонаткиназ, из-за сложности получения субстратов соответствующих реакций и потенциальных ингибиторов. Как было сказано ранее, поиск мевалонаткиназ с лучшими кинетическими параметрами лежит в основе успешного конструирования штаммов-продуцентов.

4.1.1. Выбор генов, предположительно кодирующих устойчивые к ретро-ингибированию мевалонаткиназы

Впервые устойчивая к ретро-ингибированию MVK была найдена в метаногенной архее *Methanosarcina mazei* и продемонстрировано эволюционное разделение MVK из *Archaea*, *Bacteria* и *Eukarya* (Primak et al., 2011). Эти же авторы предположили, что альтернативные механизмы регуляции присущи различным филогенетическим ветвям MVK.

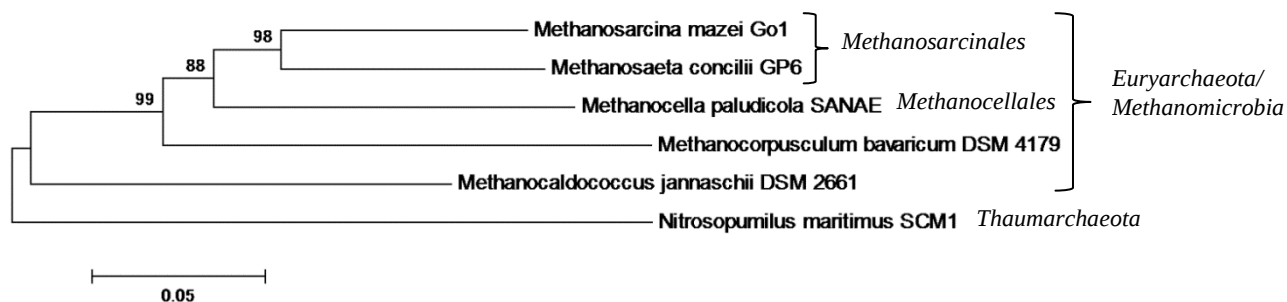


Рисунок 13 - Филогенетический анализ последовательностей 16S рРНК представителей архей из класса *Methanomicrobia*, рассмотренных в работе. *M. jannaschii* и *N. maritimus* использованы как представители внешней группы. Цифры указывают значения бутстрэпа для 1000 итераций. Последовательности 16S rRNA получены из базы данных DDBJ/EMBL/GenBank и RefSeq (ID): AUMX01000033, 12...1465: *M. bavaricum* DSM 4179; CP002565, 291377...292844: *M. concilii* GP6; AE008384, 235306...236779: NC_000909, 157985...159459: *M. jannaschii* DSM 2661; *M. mazei* Go1; AP011532, 106585...108054: *M. paludicola* SANAЕ; CP000866, 896241... 897709: *N. maritimus* SCM1.

Большинство метаногенных архей использует $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ в качестве субстрата, но не могут использовать ацетат (Welte et al., 2014). Только два рода,

принадлежащие к *Methanosarcinales*, *Methanosarcina* и *Methanosaeta*, способны использовать ацетат для роста и генерации метана (Ferry et al., 2010); они вносят наибольший вклад в продукцию метана в биосфере. *M. mazei* принадлежит к одному из них – *Methanosarcina* (Рисунок 13).

Были проанализированы MVK из представителей класса *Methanomicrobia*. Гомологи MVK из *M. mazei* были выбраны из базы данных для *Methanomicrobia* (taxid: 224756) с использованием программы PSI-BLAST (Altschul et al., 1997). Множественное выравнивание было сделано с помощью ClustalW (Thompson et al., 1997), филогенетическое дерево выбранных белков было построено с использованием метода ближайших соседей (Neighbor-Joining) (Saitou, Nei, 1987). Оказалось, что MVK из семейства *Methanosaetaceae* формируют отдельную, более удаленную эволюционно ветвь от ветви семейства *Methanosarcinaceae*, хотя и относятся к одному порядку *Methanosarcinales*. При этом MVK из семейства *Methanocellaceae*, которое относится к другому порядку *Methanocellales*, оказываются более близкими с MVK семейства *Methanosarcinaceae* (Рисунок 14). Таким образом, для дальнейшего анализа были выбраны MVK из *M. paludicola* SANAЕ, которая, не являясь близкородственной *M. mazei*, обладает похожей первичной структурой, и *M. concilii* GP6, которая, хоть и относится к тому же порядку *Methanosarcinales*, что и *M. mazei*, но эволюционно является более далекой. Как *M. paludicola* SANAЕ, так и *M. concilii* GP6 являются мезофильными микроорганизмами I уровня биобезопасности. Полные аннотированные последовательности геномов доступны для обоих штаммов. *M. concilii* - хорошо изученная метаногенная бактерия, которую можно обнаружить в болотном иле (Zehnder et al., 1980; Fathepure, 1983; Patel, Sprott, 1990). *M. paludicola* был первым культивируемым представителем *Methanocellales*, выделенным из почвы рисового поля (Sakai et al., 2008; Sakai et al., 2011). MVK из *N. maritimus*, по классификации относится к *Thaumarchaeota*, была выбрана в качестве внешней к группе *Methanomicrobia* (Walker et al., 2010).

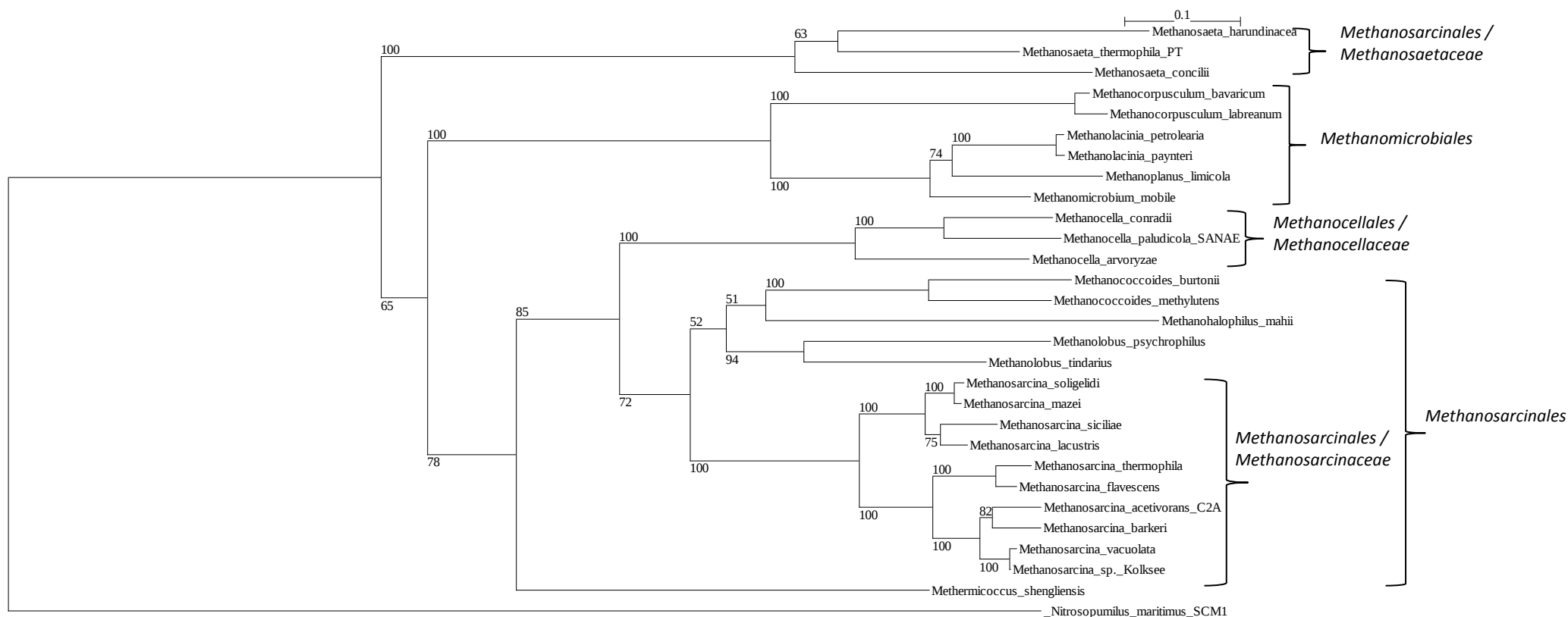


Рисунок 14 - Филогенетический анализ последовательностей MVK из класса *Methanomicrobia*, рассмотренных в работе. *N. maritimus* использован как представитель внешней группы. Цифры указывают значения бутстрэпа для 1000 итераций. Последовательности мевалонаткиназ получены из базы данных DAD/TrEMBL/GenPept (ID): WP_012037131.1: *Methanocella arvoryzae*; WP_014406849.1: *Methanocella conradii*; BAI61711.1: *Methanocella paludicola* SANAЕ; WP_011500381.1: *Methanococcoides burtonii*; WP_048193216.1: *Methanococcoides methylutens*; WP_042697404.1: *Methanocorpusculum bavaricum*; WP_011833054.1: *Methanocorpusculum labreanum*; WP_013037987.1: *Methanolalophilus mahii*; WP_048150253.1: *Methanolacinia paynteri*; WP_013328711.1: *Methanolacinia petrolearia*; WP_015052815.1: *Methanolobus psychrophilus*; WP_023846035.1: *Methanolobus tindarius*; WP_042705532.1: *Methanomicrobium mobile*; WP_004076515.1: *Methanoplanus limicola*; WP_013720012.1: *Methanosaeta concilii*; WP_014586538.1: *Methanosaeta harundinacea*; ABK14267.1: *Methanosaeta thermophila* PT; AAM04046.1: *Methanosarcina acetivorans* C2A; WP_048154424.1: *Methanosarcina barkeri*; WP_054297850.1: *Methanosarcina flavescens*; WP_048124443.1: *Methanosarcina lacustris*; WP_048036269.1: *Methanosarcina mazei*; WP_048179583.1: *Methanosarcina siciliae*; WP_048051657.1: *Methanosarcina soligelidi*; WP_048153542.1: *Methanosarcina* sp. Kolksee; WP_048167857.1: *Methanosarcina thermophile*; WP_048117800.1: *Methanosarcina vacuolata*; WP_042685946.1: *Methermicoccus shengliensis*; ABX12211.1: *Nitrosopumilus maritimus*

4.1.2. Клонирование генов мевалонаткиназ из *M. concilii*, *M. paludicola*, *M. mazei*, *N. maritimus* и *S. cerevisiae* их экспрессия в *E. coli* и очистка соответствующих рекомбинантных белков.

Нуклеотидные последовательности для генов мевалонаткиназ из *M. concilii* GP6 (GenBank: NC_015416.1, locus_tag="MCON_2559"), *M. paludicola* SANAE (GenBank: AP011532.1, locus_tag="MCP_1639"), *M. mazei* Go1 (GenBank: NC_003901.1, locus_tag="MM_RS09140") и *N. maritimus* (GenBank: CP_000866.1, locus_tag="NMAR_0315") и ERG12 гена из *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank: X55875.1) были модифицированы для эффективного клонирования и экспрессии в *E. coli*. Для генов *mvk^{mcl}*, *mvk^{mpd}* и *mvk^{mma}* были оптимизированы кодоны с учетом сохранения темпа трансляции в новом организме для правильного фолдинга белковой структуры во время синтеза (OptimumGene™, GenScript), соответствующие последовательности представлены ранее (Kazieva et al., 2017). Фрагменты ДНК клонировали на pET-21a(+) (С-концевой His-Tag) и pET-28b(+) (N-концевой His-Tag) экспрессионных векторах.

Полученные рекомбинантные плазмиды трансформировали в штамм *E. coli* BL21 (DE3), лизогенный по фагу DE3 с геном 1.0 РНК полимеразы фага Т7 (РНКПТ7) под транскрипционным контролем P_{lacUV5} промотора (Studier & Moffatt, 1986). Полученные клоны культивировали в среде LB при +34°C до $OD_{600} = 0,8$. Для индукции синтеза РНКПТ7 добавляли 1 мМ IPTG и культивирование продолжали в течение 1 часа. SDS-ПААГ электрофорез растворимых и нерастворимых фракций клеточных полипептидов выявил в условиях индукции высокое накопление целевого белка в нерастворимой фракции и только следовые количества в растворимой фракции - типичная картина SDS-электрофореза проб белков для одного из полученных рекомбинантных штаммов представлена на (Рисунок 15). Практически все полученные рекомбинантные штаммы обеспечивали достаточно высокий уровень накопления целевых белков с несколько более высоким накоплением в случае векторов на основе pET-28b(+). Тем самым целевые полипептиды синтезировались в

виде гибридных белков с 20 дополнительными N-концевыми аминокислотными остатками, включая кластер из 6 гистидинов, слитых с N-концом различных мевалонаткиназ.

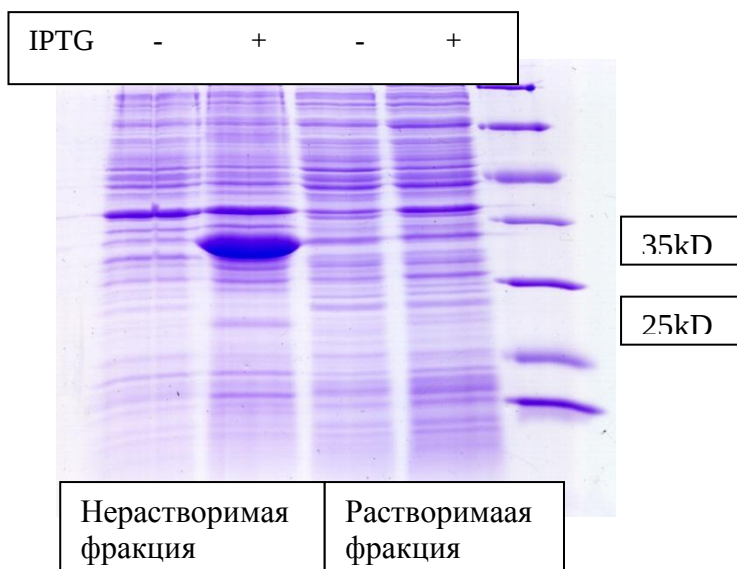


Рисунок 15 - Электрофорез в ПААГ лизата BL21(DE3)/pET28b(+)-mvk(Mpd)

Оказалось, что растворимость рекомбинантных полипептидов могла быть существенно повышена при культивировании клеток при пониженной температуре (20°C) после индукции. Пять рекомбинантных мевалонаткиназ из *M. concilii*, *M. paludicola*, *M. mazei*, *N. maritimus* и *S. cerevisiae* были очищены с помощью металл-аффинной хроматографии до 95% гомогенности (см. «Материалы и Методы»), оцениваемой визуально SDS-PAGE с окрашиванием Coomassie (Рисунок 16).

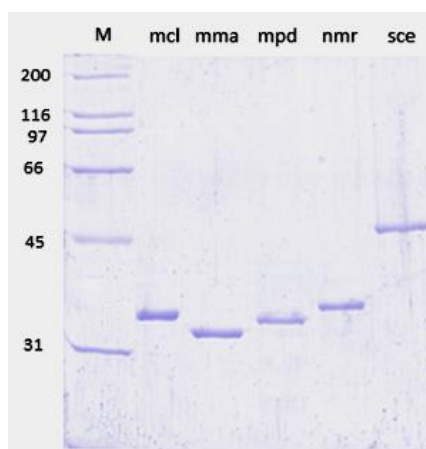


Рисунок 16 - Электрофорез мевалонаткиназ очищенных с помощью металл-аффинной хроматографии в ПААГ

Мевалонаткиназы принадлежат к семейству GHMP киназ (Bork et al., 1993). Для описанных ранее членов этого семейства обычно наблюдается мономерный или гомодимерный состав. Массы, определенные с помощью гель-фильтрации (см. «Материалы и Методы»), составляют 158 кДа для *M. concilii* и 72 кДа для *M. paludicola*. Рассчитанные из аминокислотных последовательностей молекулярные массы, составляют 35,6 кДа и 33,9 кДа соответственно. Следовательно, MVK^{mpd} образует димер в растворе, аналогично другим гомодимерным GHMP киназам, тогда как MVK^{mcl} имеет необычную тетрамерную структуру. Недавно была охарактеризована еще одна мевалонаткиназа имеющая тетрамерную структуру из *Trypanosoma evansi* (Duarte et al., 2018). Интересно, что этот фермент имеет большую гомологию с мевалонаткиназами из архей, а не из эукариот.

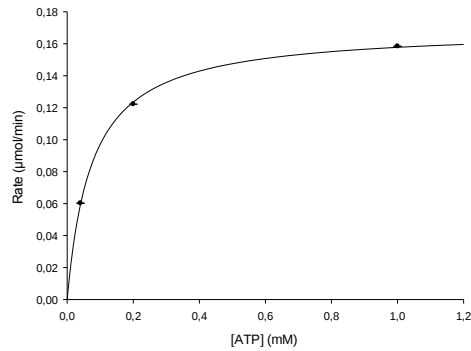
4.1.3. Определение кинетических параметров MVK^{Mma} , MVK^{Mpd} , MVK^{Mma} , MVK^{Nmr} и MVK^{Sce}

Для каждого фермента скорость фосфорилирования мевалоната контролировалась в сопряженной реакции с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой в соответствии с (Andreassi et al., 2004). Полученные [S] -v графики показаны на Рисунке 17.

Были рассчитаны кажущиеся значения K_m по отношению к АТР ($K_m\text{-АТР}$) и мевалонату ($K_m\text{-Mev}$) для каждого His-tag рекомбинантного фермента с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен.

Mcl

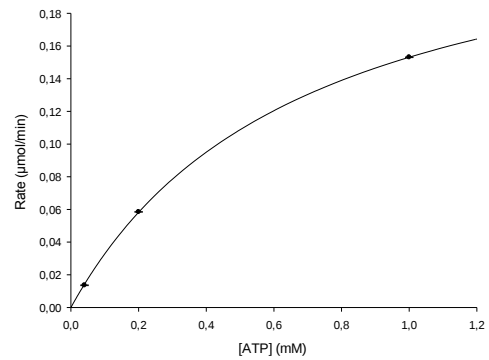
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0.1695 8.238e-4
Km 7.436e-2 1.446e-3

Mma

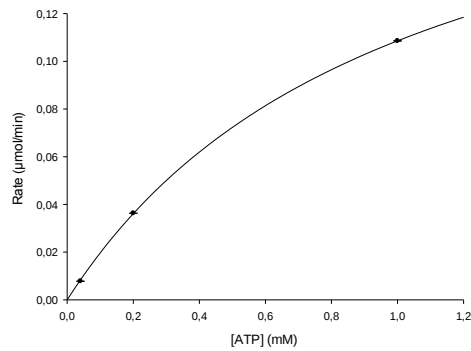
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0.2584 1.654e-3
Km 0.6871 9.255e-3

Nmr

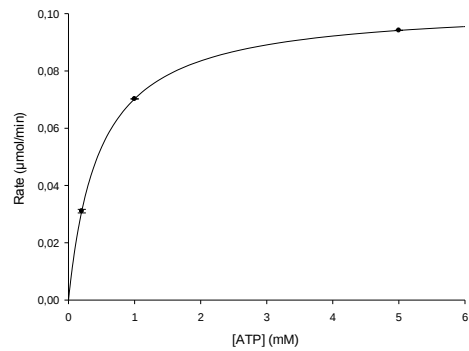
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0.2178 2.341e-3
Km 1.0057 1.977e-2

Sce

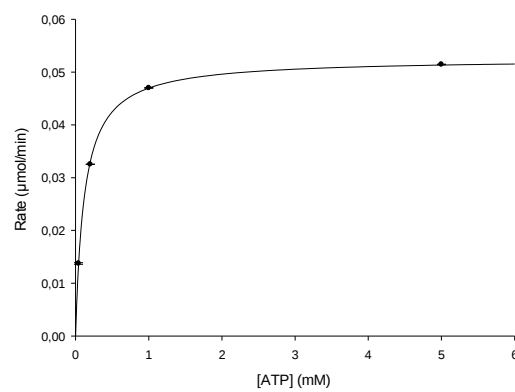
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0.1029 4.448e-4
Km 0.4637 7.595e-3

Mpd

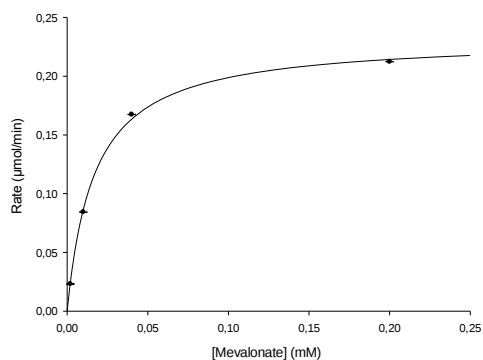
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 5.250e-2 1.993e-4
Km 0.1187 2.120e-3

Mcl

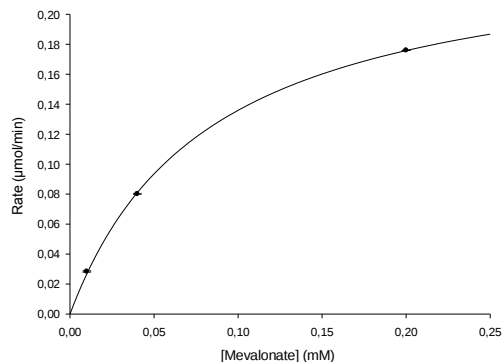
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0,2323 2,060e-3
Km 1,683e-2 5,451e-4

Mma

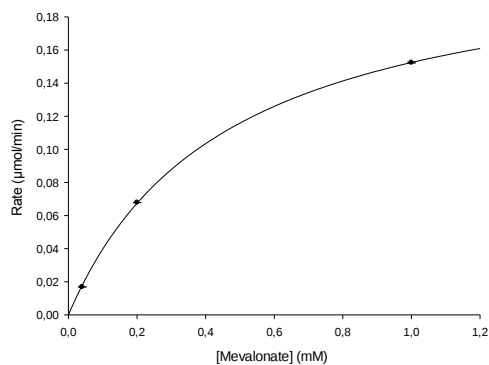
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0,2487 2,324e-3
Km 8,294e-2 1,922e-3

Nmr

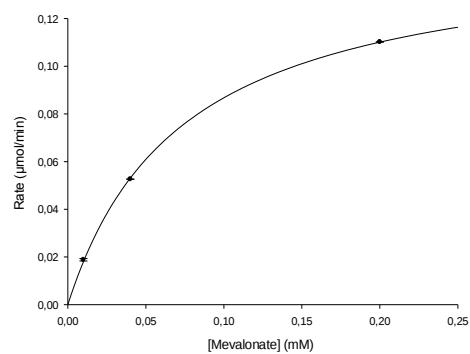
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0,2227 1,500e-3
Km 0,4606 7,515e-3

Sce

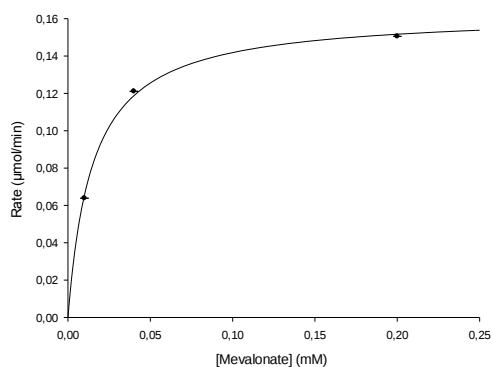
Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0,1506 1,262e-3
Km 7,355e-2 1,584e-3

Mpd

Michaelis-Menten



□ Value: ±Std. Error
Vmax 0,1630 1,430e-3
Km 1,489e-2 5,131e-4

Рисунок 17 - Графики Michaelis-Menten для расчета Km

В условиях эксперимента наблюдалось значительно более высокое сродство к мевалонату и АТР для MVK из *M. concilii* ($K_{m-Mev} = 17.0 \pm 0.5$ мкМ, $K_{m-ATP} = 74 \pm 1$ мкМ) и *M. paludicola* ($K_{m-Mev} = 15.0 \pm 0.5$ мкМ, $K_{m-ATP} = 119 \pm 2$ мкМ) по сравнению с MVK^{mma} ($K_{m-Mev} = 83 \pm 2$ мкМ, $K_{m-ATP} = 687 \pm 9$ мкМ) или MVK^{sce} ($K_{m-Mev} = 73 \pm 2$ мкМ, $K_{m-ATP} = 464 \pm 8$ мкМ). MVK^{mpd} показала самую низкую k_{cat} (7.30 ± 0.04 с⁻¹) среди всех изученных ферментов, тогда как для MVK^{mcl} k_{cat} была сравнимой с MVK^{mma} и MVK^{sce} (14.0 ± 0.1 с⁻¹, 19.0 ± 0.2 с⁻¹, и 16.0 ± 0.1 с⁻¹, соответственно). Самая высокая каталитическая эффективность ($k_{cat} / K_{m-Mev} = 0.824$ мкМ с⁻¹) наблюдалась для MVK^{mcl} (Таблица 7). Каталитическая эффективность MVK^{mpd} оказалась примерно в 2 раза ниже, чем для MVK^{mcl}, но в 2 раза выше, чем для MVK^{mma}.

Таблица 7 - Кинетические характеристики мевалонаткиназ

MVK	K_{m-Mev} (мкМ)	K_{m-ATP} (мкМ)	Удельная актив- ность мкмоль/мин*мг	k_{cat} (с ⁻¹)	k_{cat} / K_{m-Mev} (мкМ/с)
<i>mcl</i>	17.0±0.5	74±1	233±2	14.0±0.1	0.824
<i>mpd</i>	15.0±0.5	119±2	129±1	7.30±0.04	0.487
<i>mma</i>	83±2	687±9	348±3	19.0±0.2	0.229
<i>nmr</i>	461±7.5	1006±20	204±2	12±0.11	0.026
<i>sce</i>	73±2	464±8	188±3	16.0±0.1	0.219

Таким образом, константы Михаэлиса по (R, S)-мевалонату, определенные для этих ферментов, в 4-5 раз ниже, чем у MVK^{mma} (см. (Primak et al., 2011) и эту работу), MVK^{nmr} (эта работа) или MVK из *M. jannaschii*, который относится к гипертермофильным, автотрофным и строго гидрогенотропным археям (Huang et al., 1999). Сравнимый K_m по (R, S)-мевалонату $K_{m-Mev} = 19,0$ мкМ ранее наблюдался для MVK свиньи; однако этот фермент чувствителен к ретро-ингибированию (Houten et al., 2000).

4.1.4. Превращение мевалоната в фосфо- и дифосфомевалонат *in vitro* в присутствии очищенной мевалонаткиназы и фосфомевалонаткиназы из *S. cerevisiae*.

Мевалоновая кислота содержит две гидроксильные группы (C3 и C5) и C1-карбоксильную группу, которые могут быть фосфорилированы. Мевалонат-5-фосфат является промежуточным звеном в классическом мевалонатном пути. Продукты реакций, катализируемых двумя другими мевалонаткиназами из архей *Methanosarcina mazei* и *Methanocaldococcus jannaschii*, могут быть затем превращены в дифосфомевалонат 5-фосфомевалонаткиназой из *S. cerevisiae* (PMK) (Primak et al., 2011). С другой стороны, две АТР (R)-мевалонат 3-фосфотрансферазы недавно были идентифицированы в археях *Thermoplasma acidophilum* (Azami et al., 2014) и *Picrophilus torridus* (Rossoni et al., 2015).

Для определения того, какая группа подвергается фосфорилированию MVK^{mcl} и MVK^{mpd} , применялся метод *in vitro*, разработанный ранее (Andreassi et al., 2001) и использованный в дальнейшем для анализа ингибирования MVK с помощью DPM (Primak et al., 2011). В этом подходе сначала в присутствии MVK фосфорилируется мевалонат с последующей конверсией фосфомевалоната в DPM после добавления РМК. В обоих случаях скорость образования ADP контролировалась как уменьшение оптической плотности при 386 нм в сопряженной реакции пируваткиназы и лактатдегидрогеназы при спектрофотометрическом анализе (миллимолярный коэффициент поглощения NADH при 386 нм принимался за $0,61 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Полученные кривые подтвердили полное превращение мевалоната в DPM через фосфомевалонат (Рисунок 18). Полученные результаты свидетельствуют о том, что MVK^{mcl} и MVK^{mpd} следует рассматривать как мевалонат-5-киназы. Тем не менее, чтобы убедиться, что эти ферменты не могут продуцировать также мевалонат-3-фосфат, необходима прямая идентификация продуктов, образующихся в реакциях.

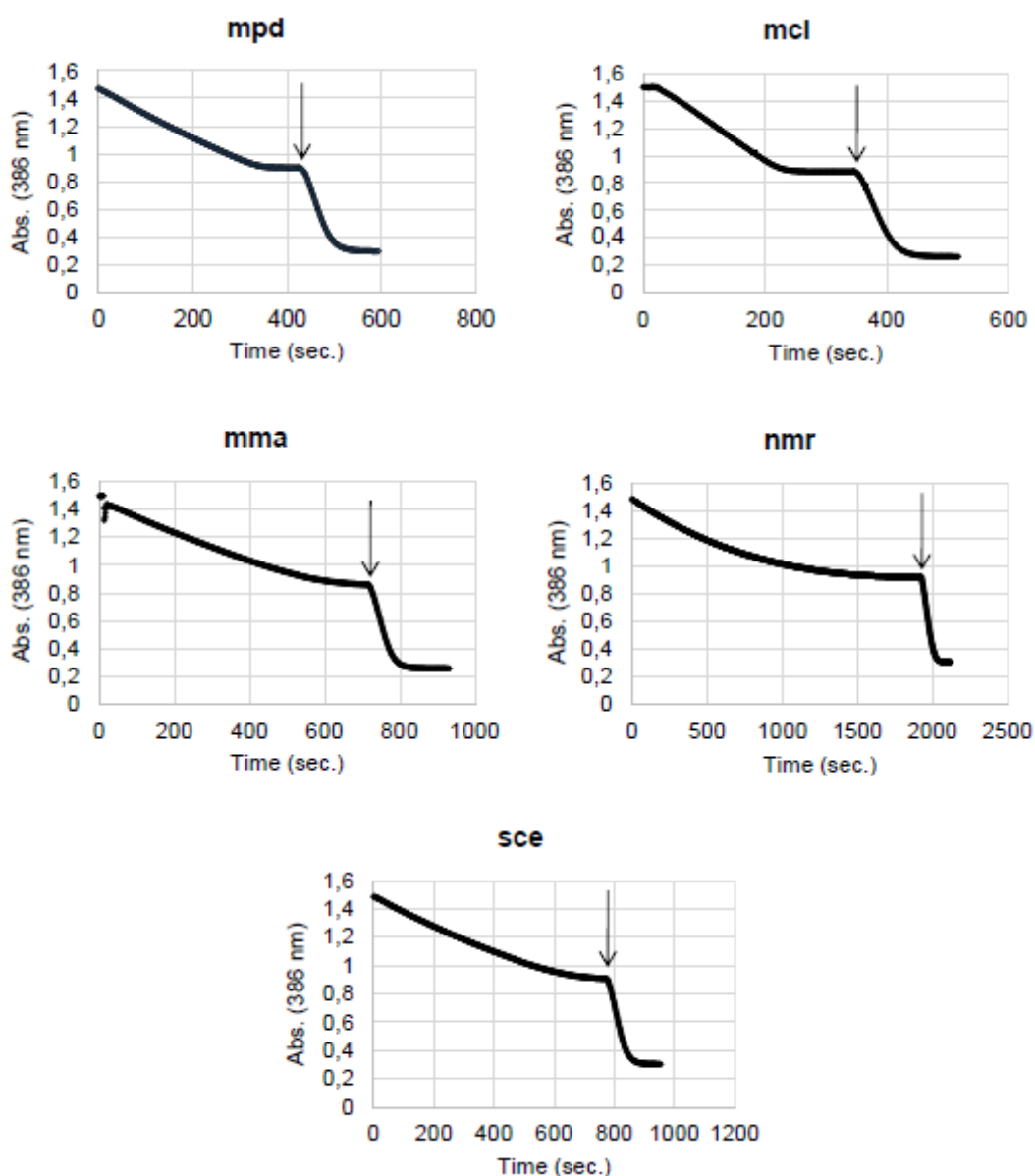


Рисунок 18 - Превращение фосфомевалоната, продуцируемого MVK^{mma} , MVK^{sce} , MVK^{mcl} , MVK^{mpd} и MVK^{nmr} в дифосфомевалонат РМК из *S. cerevisiae*.

Превращение мевалоната в фосфо- и, впоследствии, дифосфомевалонат контролировали косвенно, путем окисления NADH в сопряженной реакции пируваткиназы и лактатдегидрогеназы. На графике изображена кинетика поглощения при 386 нм. Очищенную РМК добавляли в точках, обозначенных стрелками

В реакциях с MVK^{mma} , MVK^{sce} , MVK^{mcl} и MVK^{mpd} наблюдалось почти линейное уменьшение поглощения до добавления РМК. Напротив, для MVK^{nmr} наблюдалось ступенчатое снижение скорости реакции, связанное с накоплением продукта. Этот результат указывает на ингибирование MVK^{nmr} продуктом фосфомевалонатом.

4.1.5. Проверка ингибирования различных мевалонаткиназ интермедиатами мевалонатного пути, GPP и FPP

Производилась оценка ингибирования MVK из *M. concilii*, *M. paludicola*, *M. mazei*, *S. cerevisiae* и *N. maritimus* нижестоящими промежуточными продуктами биосинтеза изопреноидов (DPM, DMAPP, GPP и FPP). Для этого проводилось параллельное измерение активности в присутствии высокой концентрации потенциального ингибитора и без него (таблица 8).

Таблица 8 - Влияние потенциальных ингибиторов на активность мевалонаткиназы
Представлены результаты индивидуальных экспериментов. Показаны относительные каталитические активности ферментов (%). Активность без потенциальных ингибиторов принималась за 100%.

MVK	DPM	DMAPP	GPP	FPP
	1mM	5 mM	100 мкМ	100 мкМ
<i>sce</i>	96	8	9	10
<i>mma</i>	85	91	96	98
<i>mcl</i>	99	122	104	105
<i>mpd</i>	105	97	101	101
<i>nmr</i>	97	95	100	92

В таблице указаны относительные каталитические активности (%) каждого фермента. Активность в реакционной смеси без ингибиторов принималась равной 100%. Согласно ранее опубликованным данным, MVK из *S. cerevisiae* сильно ингибируется 5 mM DMAPP, 0,1 mM GPP и 0,1 mM FPP, но не ингибируется 1 mM DPM. Для MVK из *M. janashii* уже при концентрации 5 мкМ GPP и FPP активность снижается примерно в два раза (Huang et al., 1999). Мевалонаткиназа из *M. mazei* не ингибируется 0,1 mM GPP и 0,1 mM FPP. Небольшое снижение активности наблюдалось для этого фермента при

добавлении 1 мМ DPM или 5 мМ DMAPP. Ни MVK^{mcl}, ни MVK^{mpd} не ингибировались 1 мМ DPM, 5 мМ DMAPP, 0,1 мМ GPP или 0,1 мМ FPP (Таблица 8). Напротив, фермент из *M. concilii* даже слегка активировался 5 мМ DMAPP (его активность увеличилась на 20% по сравнению с контролем). Более низкие концентрации (33,6 мкМ или 168 мкМ) DMAPP или IPP не влияли на активность этого фермента.

4.1.6. Анализ генетического окружения генов *mvk*

Суммируя приведённые выше данные можно заключить, что все проверенные нами MVK из архей, оказались устойчивыми к ретроингибированию. Исходя из этого, можно предположить, что данные археи могут использовать другой механизм регуляции MVA пути. Вполне вероятно, что экспрессия генов, участвующих в нижнем MVA пути, координируется в этих организмах на уровне транскрипции.

Для бактерий известно, что часто скоординированная транскрипция генов, относящихся к одному метаболическому пути, реализуется благодаря образованию оперона. Было проанализировано окружение ортологов MVK, обнаруженных в сиквенированных геномах, с помощью программного обеспечения STRING v.10 (Search Tool for Retrieval of Interacting Genes / Proteins) (Szklarczyk et al., 2015). У всех представителей *Methanomicobia* ген *mvk* входит в состав протяженных оперонов, включающих и другие гены нижнего мевалонатного пути (Рисунок 19). Во многих других *Euryarchaeota* ген *mvk* связан с геном IP-киназы, как показано на Рисунке 19. И наоборот, ORF, кодирующая чувствительную к ретроингибированию MVK из *M. jannaschii* (Huang et al., 1999), расположен в геноме как отдельный ген. Такое же отдельное расположение гена *mvk* является характерным и для других организмов, содержащих мевалонаткиназы, подверженные ретроингибированию. Хотя для подтверждения нашей гипотезы о скоординированной регуляции

транскрипции генов мевалонатного пути в археях необходимы дальнейшие исследования, мы полагаем, что анализ генетического окружения может быть полезен для поиска новых генов мевалонаткиназ, не подверженных ретро-ингибированию.

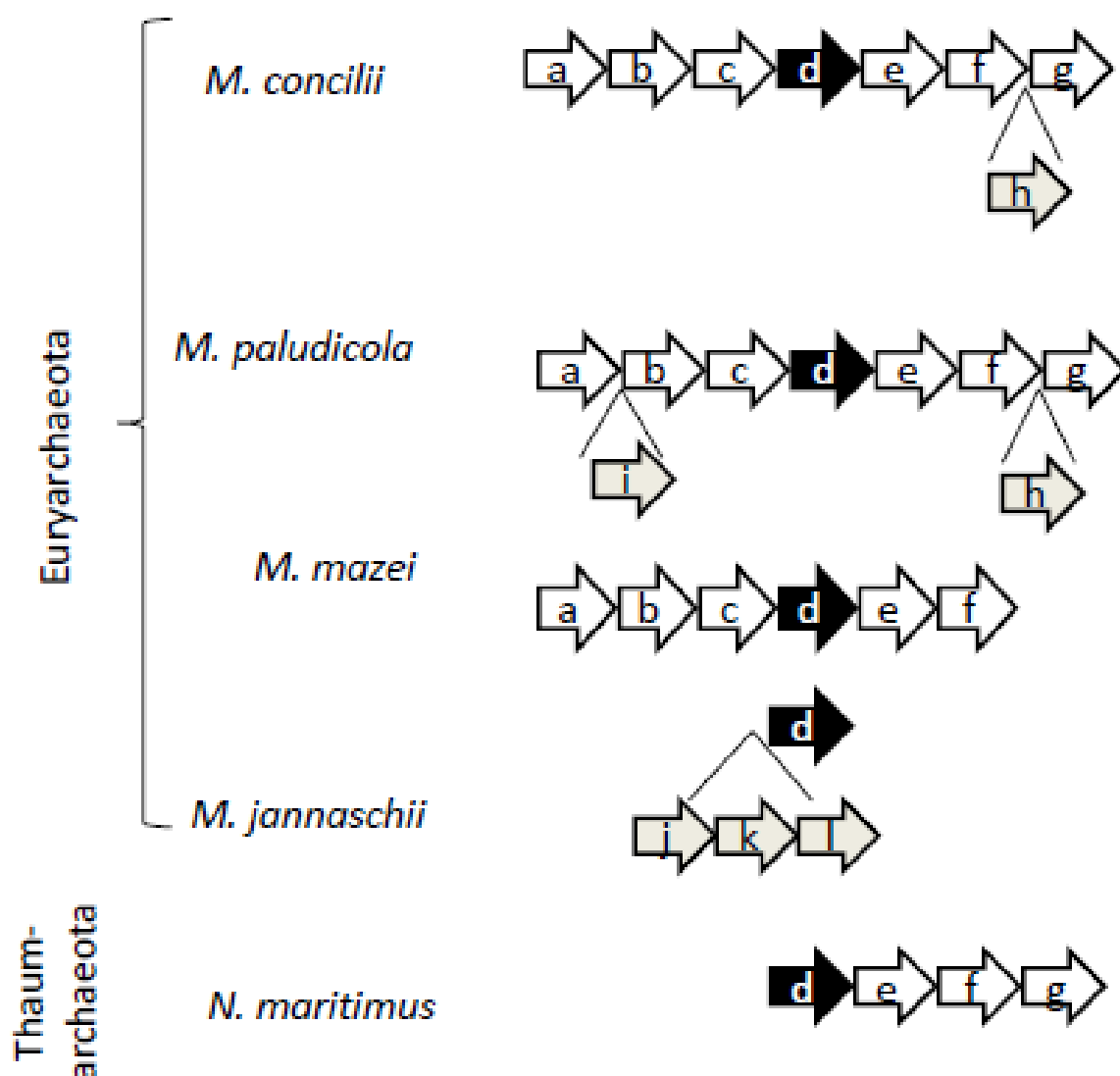


Рисунок 19 - Консервативные последовательности, включающие гены, кодирующие устойчивые к ретро-ингибированию мевалонаткиназы из архей.

(a) RpoK, (b) 30S рибосомальный белок S2, (c) гипотетический белок, (d) мевалонаткиназу, (e) изопентенилкиназу, (f) изопентенилпирофосфат изомеразу, (g) изопренилдифосфатсинтазу, (h) белок, содержащий бета-лактамазу, (i) енолазу, (j) шикимат-5-дегидрогеназу, (k) гипотетический белок, (l) гипотетический белок.

4.1.7. Анализ структурных особенностей устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ

В настоящее время получена кристаллическая структура мевалонаткиназы крысы в комплексе с АТР (ингибируется по конкурентному механизму), на основании которой можно было бы попытаться выявить структурные особенности устойчивых к конкурентному ингибированию ферментов. Для полученной ранее структуры MVK крысы в комплексе с АТР были определены аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с фосфатными остатками АТР (Fu et al., 2002). Чтобы попытаться понять, за счет чего все-таки описанные в данной работе мевалонаткиназы не подвержены конкурентному ингибированию, нами было проведено выравнивание известных аминокислотных последовательностей мевалонаткиназ. Выравнивание аминокислотной последовательности рассчитывали с помощью программы CLUSTALX и веб-инструмента ESPRIPT 3.0. Вторичная структура MVK *Rattus norvegicus*, размещенная над выравниванием, была загружена из базы данных PDB.

При структурном выравнивании MVK было показано, что Мотивы 1, 2 и 3 - консервативные мотивы GНMP-киназ являются консервативными для организмов, принадлежащих к различным царствам (Рисунок 20). Как видно из рисунка, в прокариотических MVK спейсер между консервативными областями 1 и 2 значительно короче, чем у эукариотических ферментов. Известно, что среди аминокислотных остатков MVK крысы, участвующих в связывании изопреноидной группы фарнезилтиофосфата, пять расположены в данном спейсере, а четыре аминокислоты расположены в консервативной области и только Р139 является высококонсервативным. Возможно, структура этой области определяет спектр ингибиторов, которые могут взаимодействовать с конкретным ферментом.

Мотив 4 - менее консервативный мотив, который можно определить на основе этого выравнивания. Данная область в MVK^{mcl} содержит две положительно заряженные аминокислоты - лизин и аргинин, которые расположены между остатками, отвечающими за связывание фосфатной части АТР (Рисунок 20, треугольники). Возможно, именно эта структурная особенность вызывает специфические биохимические свойства MVK^{mcl}. Дальнейшее изучение MVK из архей, бактерий и эукариот и сравнение их структур могут обеспечить понимание механизма взаимодействия между потенциальными ингибиторами прокариотических и эукариотических MVK.

Понимание структурных особенностей связанных с ингибированием мевалонаткиназ очень важно, поскольку у человека как избыточная, так и недостаточная активность фермента вызывает соответствующие заболевания (Qiu et al., 2006; Schneiders et al., 2006). Кроме того, они могут составлять отдельный класс новых антимикробных агентов (Gharehbeglou et al., 2015).

4.1.8. Сопоставление продукции изопрена изогенными штаммами с разными мевалонаткиназами

Целью данной работы являлся поиск не подверженных ретроингибированию MVK, которые могли бы обеспечить увеличение продукции изопрена клетками *P. ananatis*. В первой части работы были найдены и охарактеризованы две новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, обладающие существенно лучшими кинетическими параметрами, чем ранее описанная MVK^{Mma}. Однако измерение кинетических параметров зачастую проводится в условиях далеких от физиологических. Кроме того, продуцирующая способность штамма зависит не только от кинетических параметров соответствующих биосинтетических ферментов, но и от их содержания в клетках, т.е. от уровня экспрессии кодирующих их генов. Как известно, уровень экспрессии гена определяется совокупностью целого ряда факторов (эффективность инициации транскрипции, стабильность мРНК,

эффективность её трансляции, стабильность и растворимость образующегося белка). Поэтому невозможно гарантировать, что введение в штамм-продуцент генов высокоэффективных мевалонаткиназ *mvk^{mcl}* или *mvk^{mpd}* немедленно улучшит его продуцирующую способность.

Чтобы выяснить, какой из генов действительно обеспечивает максимальную продукцию, было необходимо сконструировать набор изогенных штаммов, содержащих все гены мевалонатного пути, различающиеся только геном мевалонаткиназы.

На момент начала работы в нашей лаборатории был получен модельный штамм-продуцент изопрена *P. ananatis* ISP3-S (SC17(0) Δ *ampC*::KKDyI-*ispS*(K) Δ *ampH*::*P_{ara}-mvaES* Δ *crt*::*P_{tac}-ispS*(M)-*mvk^{mma}*), в геном которого были интегрированы все гены мевалонатного пути и ген изопренсинтазы (Mihara et al., 2016). На его базе была получена линия изогенных штаммов ISP3-*mvk^{mpd}* ISP3.2-*mvk^{mcl}* и ISP3.2-*mvk^{mma}* с генотипом SC17(0) Δ *ampC*::*P_{tac}*-KKDyI-*ispS*(K) Δ *ampH*::*P_{ara}-mvaES* Δ *crt*::*P_{tac}-mvk*(X), различающихся только геном мевалонаткиназы.

Для проверки продуцирующей способности, изогенные штаммы ISP3-*mvk^{mpd}*, ISP3.2-*mvk^{mma}* и ISP3.2-*mvk^{mcl}* были трансформированы многокопийной плазмидой pSTV28-*P_{tac}-ispS*(K) (Mihara et al., 2015), несущей ген изопренсинтазы из Kudzu (*Pueraria montana*). Полученные плазмидные штаммы культивировали в соответствии с протоколом, подробно описанным в разделе «Материалы и Методы». Особенностью изопреновой ферментации является то, что её конечный продукт находится в газообразном состоянии (температура кипения изопрена +34°C). В ходе ферментации измерялась концентрация изопрена в выходящем газе в режиме реального времени с помощью проточного мультигазового анализатора (F10, GASERA Ltd). Количество накопленного изопрена за время ферментации приведены в Таблице 9.

Из полученных данных видно, что даже в штамме, несущем дополнительный ген мевалонаткиназы из *S. cerevisiae*, введение генов *mvk* из *M.*

paludicola или *M. concilii*, обеспечило большую продукцию изопрена, чем интеграция ранее известного гена из *M. mazei*.

Таблица 9 - Продукция изопрена штаммами, содержащими различные гены мевалонаткиназы.

Штамм	Изопрен, мг	Глюкоза, г	Выход, г/г %
ISP3.2-mvk(Mma)	276	64.3	0,42
ISP3.2-mvk(Mcl)	301	67.2	0,48
ISP3.2-mvk(Mpd)	307	60.1	0,51

В дальнейшем, была продолжена линия штаммов с мевалонаткиназой из *M. paludicola*. Для улучшения экспрессии генов фосфомевалонаткиназы, дифосфомевалонат декарбоксилазы и IPP изомеразы в этом штамме, был удален ген мевалонаткиназы из *S. cerevisiae* (проксимальный ген KKDyI оперона), а в оставшихся генах нижнего мевалонатного пути были заменены аргининовые кодоны, редко встречающиеся в *P. ananatis* (Рисунок 21). Для этого был осуществлён химический синтез фрагмента, включающего гены PMK, MVD и *yldI* с оптимизированной последовательностью ДНК и осуществлено его клонирование и интеграция в хромосому штамма SC17(0) с последующим переносом в штамм-продукент (Tajima et al., 2017).

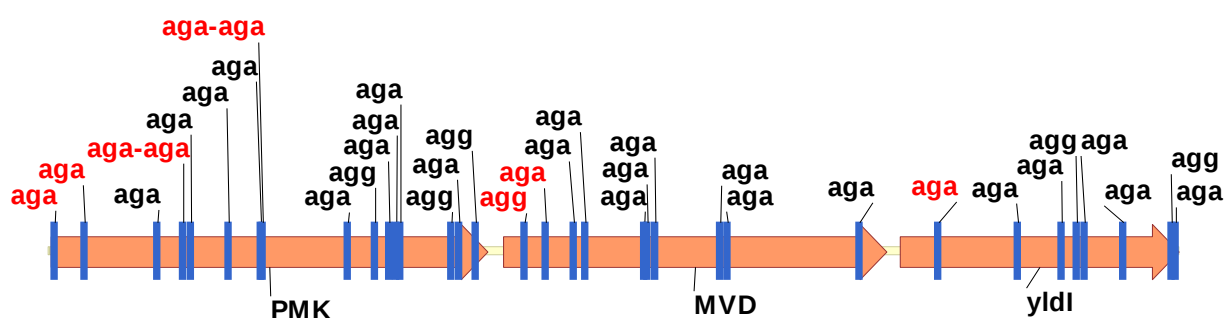


Рисунок 21 - Схема расположения редковстречающихся кодонов в *P. ananatis* в опероне нижнего MVA пути из *S. cerevisiae* (красным цветом выделены кодоны в начале генов либо сдвоенные, наиболее сильно влияющую на трансляцию).

Благодаря этой модификации, продукция изопрена значительно увеличилась и составила 563 мг. Последующая замена арабинозного промотора перед генами верхнего MVA пути на авторегулируемый промотор P_{phoC} , активирующийся лимитом по фосфату при входе клеток в стационарную фазу, привело к дальнейшему увеличению продукции до 869 мг (Tajima et al., 2017). Полученный таким образом штамм был назван SWITCH-phoC.

4.2. Обеспечение баланса биосинтетических активностей в штамме, продуцирующем DMAPP, при введении дополнительных копий генов мевалонатного пути.

При несбалансированной экспрессии генов любого биосинтетического пути происходит накопление интермедиатов, которые будут оказывать влияние на продукцию. Для мевалонатного пути известно, что, по крайней мере, часть его интермедиатов может накапливаться в клетке и оказывать токсическое воздействие (Martin et al., 2003; Pitera et al., 2008). Так, при несбалансированной суперэкспрессии генов верхнего мевалонатного пути может накапливаться гидроксиметилглутарил-СоА, что приводит к нарушению биосинтеза жирных кислот и изменению состава клеточной мембраны, вызывая значительное замедление роста (Kizer et al., 2008). При согласованной же работе генов верхнего мевалонатного пути образуется мевалонат, который легко секретируется клетками и может накапливаться в культуральной жидкости до высокой концентрации, не вызывая заметного ухудшения роста культуры. Продуктами реакции мевалонаткиназы и последующих ферментов мевалонатного пути являются фосфорилированные интермедиаты, которые накапливаются в клетке, и являются ингибиторами большинства мевалонаткиназ. Для достижения высоких уровней продукции изопреноидов необходимо использовать мевалонаткиназы, устойчивые к данным ретроингибиторам (Primak et al., 2011; Kazieva et al., 2017). Кроме того, накопление дифосфомевалоната может приводить к резкому снижению уровня АТФ и dNTP в клетке, накоплению повреждений ДНК, и остановке роста (Sánchez et al., 2015).

Накопление IPP обратно коррелирует с уровнем АТФ в клетке и дестабилизирует фосфомевалонаткиназу из *S. cerevisiae*, что может авторегулировать его биосинтез (George et al., 2018). С другой стороны, IPP, DMAPP и пирофосфаты с более длинной цепью (GPP, FPP и т.д.) являются необходимыми для клетки, и истощение их пула также приводит к остановке роста. Кроме того, для синтеза необходимых клетке изопреноидов необходимо строго определенное соотношение концентраций IPP и DMAPP, которое определяется свойствами IPP изомеразы (Berthelot et al., 2012). Высокий уровень продукции изопрена нарушает необходимый баланс, вызывая дефицит DMAPP (Martin et al., 2003).

При конструировании штамма-продуцента изопрена гетерологичные гены мевалонатного пути в составе трех интегративных кассет были последовательно интегрированы в хромосому штамма SC17(0), λ Red-устойчивого производного AJ13355, с помощью метода Dual In/Out. При этом гены верхнего мевалонатного пути из *E. faecalis* (Yoon et al., 2009; Zurbriggen et al., 2012) под транскрипционным контролем P_{phoC} промотора входили в состав первого из оперонов (Tajima et al., 2016). Гены нижнего мевалонатного пути из *S. cerevisiae* с оптимизированными для экспрессии в *P. ananatis* кодонами под контролем конститутивного P_{tac} промотора входили в состав второго оперона (Tajima et al., 2016). Ген мевалонаткиназы из *M. paludicola* экспрессировался отдельно под контролем конститутивного P_{tac} промотора в составе третьей кассеты (Mihara et al., 2017). Таким образом, полученный штамм SWITCH-phoC содержал все гены мевалонатного пути, интегрированные в хромосому в одной копии. При этом была достигнута сравнительно высокая продукция изопрена (Tajima et al., 2016). Можно было ожидать, что сбалансированное увеличение числа копий отдельных или, возможно, всех выбранных генов позволит обеспечить повышенное накопление изопрена.

4.2.1. Конструирование базового штамма для одновременной интеграции нескольких экспрессионных кассет

Чтобы обеспечить сбалансированное увеличение уровней экспрессии генов мевалонатного пути, было решено первоначально осуществить конструирование рекомбинантного штамма, содержащего в своем геноме (1) все гены мевалонатного пути, (2) несколько точек потенциальной интеграции «дополнительных» копий уже интегрированных генов этого биосинтетического пути или их гомологов из других организмов (в данной работе использовалась стратегия с 3 точками потенциальной вторичной интеграции, а «дополнительные» гены входили в состав тех же интегративных кассет, которые использовались на первом этапе – в идеале число потенциальных точек интеграции должно было бы быть значительно бóльшим, а интегрировать «дополнительные» гены надо было бы по одному. Тем не менее, даже использованная, существенно методически сокращенная стратегия с минимальными затратами на селекцию на заключительном этапе, как будет видно из представленных результатов, позволила отобрать желаемый продуцент изопрена, превосходящий на 30% свой исходный аналог). В полученную таким образом хромосому реципиентного штамма, IR5-3Δ (Табл. 1), в одном эксперименте должна была вводиться смесь CRIM плазмид (в нашем случае – из 3 различных плазмид с 1 из двух селективных маркеров устойчивости к антибиотикам – Tc^R , Km^R) со всеми генами мевалонатного пути и интегрироваться по $\phi 80$ -Int-зависимому механизму с последующим отбором целевых множественных интегрантов на среде с обоими антибиотическими маркерами. Индивидуальные клоны планировалось использовать в качестве реципиентов для электропорации плазмиды с геном изопренсинтазы, а полученные трансформанты – тестировать на продукцию изопрена.

4.2.1.1. Необходимость модификации метода Dual In/Out

Предлагаемая стратегия была реализована с получением штамма IR5-3Δ клонированием всех генов мевалонатного пути и созданием трех точек интеграции дополнительных копий генов следующим образом. Первоначально в качестве основного метода для интеграции целевых генов планировалось использовать Dual In/Out стратегию (Minaeva et al., 2008). Однако, в данном случае прямое использование всех ранее созданных элементов метода Dual In/Out было осложнено тем, что при λ Red-зависимой интеграции маркированных линейных кассет $attL_{\phi 80}$ - kan - $attR_{\phi 80}$ с флангами 40 пн, гомологичных целевому локусу хромосомы, происходила их рекомбинация с введенными ранее кассетами из-за присутствия на их флангах $attL_{\phi 80}$ и $attR_{\phi 80}$ в составе более протяженных участков исходной кассеты (463 пн и 388 пн).

Чтобы последовательно вводить несколько $B_{\phi 80}$ сайтов с помощью λ Red-интеграции непосредственно в продуцент, было решено провести некоторую модификацию ранее разработанной стратегии Dual In/Out. Каждый раз при внесении будущей точки $\phi 80$ -Int-зависимой интеграции CRIM плазмиды, первоначально в выбранную область бактериальной хромосомы осуществлялась Red-зависимая интеграция линейного фрагмента ДНК следующей структуры – $\lambda attR$ - $attL_{\phi 80}$ - kan - $attR_{\phi 80}$, т.е. содержащего дополнительный сайт R_{λ} перед сайтом $L_{\phi 80}$. После $\phi 80$ -Xis/Int-зависимого удаления введенного Km^R -маркера это позволяет получить в составе хромосомы точку последующей $\phi 80$ -Int-зависимой интеграции CRIM плазмиды в виде $\lambda attR$ - $attB_{\phi 80}$ вместо стандартного $attB_{\phi 80}$. Тогда, при интеграции CRIM плазмид в модифицированный сайт интеграции вновь образующийся рекомбинантный сайт $attL_{\phi 80}$ оказывается окруженным прямым повтором двух сайтов $\lambda attR$, т.е., – $\lambda attR_1$ - $attL_{\phi 80}$ - $\lambda attR_2$, одним ($\lambda attR_1$) – ранее введенным в хромосому при образовании точки интеграции, и вторым ($\lambda attR_2$) – из структуры вновь введенной CRIM плазмиды.

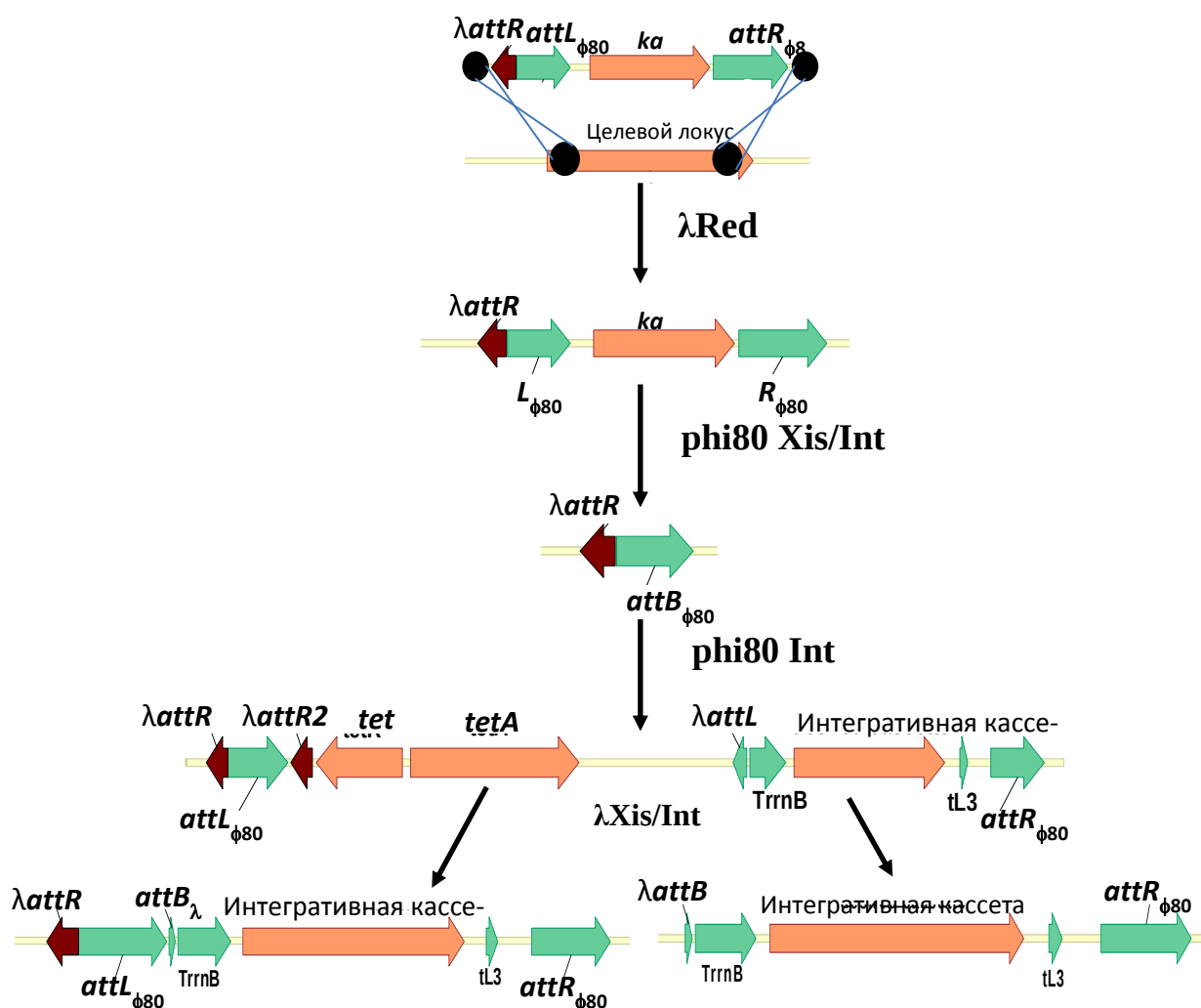


Рисунок 22 - Модифицированный метод Dual In/Out

В этом случае при экспрессии в клетках генов *xis-int* фага λ и удаления векторной части CRIM плазмиды, равновероятна рекомбинация между единственным рекомбиногенным сайтом $\lambda attL$ и одним из двух имеющихся в хромосоме сайтов $\lambda attR_1$ или $\lambda attR_2$. В результате этих событий образуются интересующие нас рекомбинанты, утратившие векторную часть плазмиды и сайт $attL_{\phi 80}$ (при рекомбинации по сайту $\lambda attR_1$) или из хромосомы удаляется только векторная часть плазмиды (при рекомбинации по сайту $\lambda attR_2$) (Рисунок 22.), соответственно. Отметим, что хотя предварительное удаление $R_{\lambda 2}$ из состава интегративного вектора делает безальтернативным результат финальной рекомбинации, на практике при использовании интегративных плазмид, содержащих $\lambda attR_2$, желаемые варианты образуются с частотой 50%

и легко могут быть отобраны с помощью PCR. Поэтому в данном эксперименте мы использовали ранее сконструированные CRIM плазмиды. Для будущих экспериментов сайт $\lambda attR_2$ был удален из вектора pАН162- $\lambda attL$ -Tc^R- $\lambda attR$.

4.2.1.2. Использование модифицированного метода Dual In/Out для конструирования штамма IR5-3Δ

С помощью модифицированного метода Dual In/Out CRIM плазмиды pАН162-Km-P_{tac}-KDyI, pАН162-P_{phoC}-mvaES и pАН162-P_{tac}-mvk^{mpd} были последовательно интегрированы в локусы *ampC*, *ampH* и *crt*, соответственно, каждый раз за счет функционирования интегразы $\phi 80$ -Int с последующим удалением векторной части CRIM плазмиды с помощью λ -Xis/Int и отбором вариантов, утративших *attL* _{$\phi 80$} . Затем в ген *gcd* с помощью Red-зависимой интеграции линейного фрагмента $\lambda attR$ -*attL* _{$\phi 80$} -*kan*-*attR* _{$\phi 80$} с последующим $\phi 80$ -Xis/Int-зависимым удалением маркера была введена “точка интеграции” ($\lambda attR$ -*attB* _{$\phi 80$}). Полученный штамм был назван IR5-Δ*gcd*. Аналогично была получена еще одна интеграция линейного фрагмента с одновременной делецией генов *ampC2*. Как и ожидалось, присутствие в геноме ранее интегрированных *R* _{$\phi 80$} , но в отсутствие соответствующих *attL* _{$\phi 80$} , не снижало частоту λ Red-интеграции в целевые локусы хромосомы за счет «ошибочной интеграции» в ранее введенные кассеты. Полученный устойчивый к канамицину штамм, несущий $\lambda attR$ -*attL* _{$\phi 80$} -*kan*-*attR* _{$\phi 80$} в локусе *ampC2*, был назван IR5-2Δ.

На последнем этапе мы решили проверить возможность одновременного удаления сразу двух маркеров антибиотической устойчивости из генома *P. ananatis* с использованием плазмиды-помощника pАН129-*cat*. Т.к. специфически направленная λ Red-интеграция кассеты, фланкированной *R* _{λ} -*L* _{$\phi 80$} и *R* _{$\phi 80$} , в целевой локус хромосомы штамма, уже несущего $\lambda attR$ -*attL* _{$\phi 80$} -*kan*-*attR* _{$\phi 80$} , была невозможна, хромосомная модификация Δ*bla*:: $\lambda attR$ -*attL* _{$\phi 80$} -*tetAR*-*attR* _{$\phi 80$} была сконструирована в штамме SC17(0) дикого типа, как опи-

сано в разделе “Материалы и методы”, и перенесена в штамм IR5-2Δ методом электропорации геномной ДНК. Описанная выше стандартная процедура $\phi 80$ -Xis/Int-зависимого удаления маркера была применена для одновременного удаления генов канамициновой и тетрациклиновой устойчивости из полученного штамма, в результате чего был получен штамм IR5-3Δ. Частота отбора клонов, чувствительных к обоим антибиотикам, составила в этом эксперименте около 1%. Учитывая, что общее число клонов в таких экспериментах превосходит 10^4 , представляется возможным излечение штаммов даже от трех маркеров антибиотической устойчивости одновременно, что может существенно ускорить их конструирование.

С другой стороны, полученный результат показывает, при $\phi 80$ -Xis/Int-зависимом удалении маркера антибиотической устойчивости из “точки интеграции” с достаточно высокой вероятностью могут утрачиваться ранее введенные экспрессионные кассеты, если они фланкированы сайтами $attL_{\phi 80}$ и $attR_{\phi 80}$. Проведенная нами модификация метода Dual In/Out, обеспечивающая удаление $attL_{\phi 80}$ из состава интегрированной генетической кассеты, позволяет предотвратить такие нежелательные события.

4.2.1.3. Подтверждение зависимости уровня экспрессии гена от его локализации в геноме *P. anantis*

Введенные в хромосому штамма IR5-3Δ сайты $\lambda attR-attB_{\phi 80}$ были расположены на разном расстоянии от точки начала репликации хромосомы (Рисунок 23). Мы не могли исключать, что продуцирующая способность штамма зависит не только от числа копий того или иного гена, но и от их расположения в хромосоме. Для *E. coli* хорошо известно, что в логарифмической фазе роста локусы хромосомы, расположенные вблизи начала репликации, присутствуют в клетках в большем числе копий, чем локусы, расположенные на противоположной стороне хромосомы за счет присутствия разветвленной Θ структуры частично реплицированной кольцевой бактериаль-

ной хромосомы (Minaeva et al., 2008). Интегративная кассета может подвергаться сквозной транскрипции с хромосомы, хотя для снижения влияния этого эффекта в используемой для интеграции конструкции был предусмотрен терминатор, предотвращающий эту сквозную транскрипцию (Minaeva et al., 2008). Зная соотношение времени репликации C ко времени удвоения τ , для *E. coli* может быть рассчитан уровень экспрессии гена E в зависимости от его положения на хромосоме относительно начала репликации p по формуле $E = E_0 \cdot 2^{-p \cdot C / \tau}$, где E_0 – уровень экспрессии при p_0 , т.е. в *oriC* (Bloch et al., 2012). Рисунок 23 иллюстрирует расположение локусов, использованных в данной работе, относительно начала репликации хромосомы. Локус *crt* не указан на рисунке, т.к. расположен на мегаплазмиде pEA320, являющейся частью генома *P. ananatis* AJ13355.

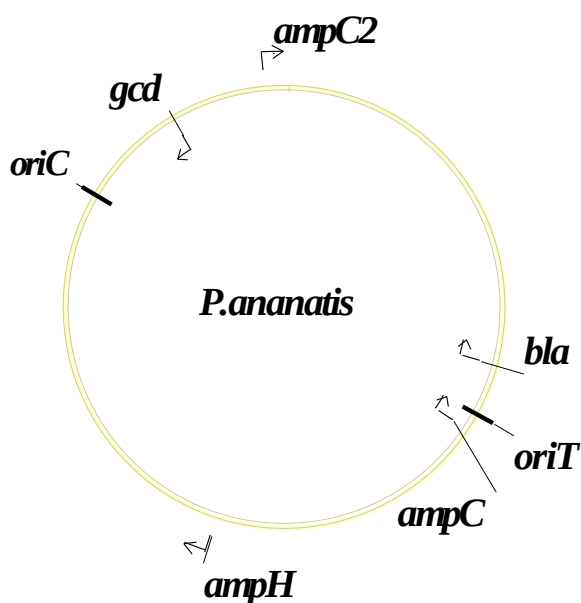


Рисунок 23 - Схема расположения локусов в хромосоме *P. ananatis*.

Для подтверждения зависимости уровня экспрессии гена от его локализации в геноме *P. ananatis* была проведена интеграция плазмиды pAH162- P_{tac} -FDH, несущей ген NAD-зависимой форматдегидрогеназы из *Candida boidinii* под контролем P_{tac} промотора, в указанные локусы и измерена форматдегидрогеназная активность по описанному ранее протоколу (Schüte et al., 1976). Уровни экспрессии гена форматдегидрогеназы, интегрированного в локусы

bla и *ampC*, расположенные рядом с терминатором репликации, совпадали в пределах погрешности 36 ± 4 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ и 33 ± 5 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹, соответственно, а в случае локуса *ampH* экспрессия возрастала в 1.3 раза до 48 ± 3 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹. Используя данные значения, было рассчитано соотношение $C/\tau = 1.5$, что совпадает с ранее опубликованным значением для *E. coli* (Bloch et al., 2012). Такой же, как в *ampH*, уровень экспрессии наблюдался при интеграции в плазмиду pEA320 и составил 46 ± 2 нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹. Вероятно, эта плазида присутствует в клетках в одной-двух копиях. Для локуса *gcd*, расположенного вблизи старта репликации, можно было ожидать еще большее увеличение активности кассет в него интегрированных.

Таким образом, соотношение экспрессии генов в *P. ananatis* могло меняться в зависимости от их взаимного расположения в хромосоме. Соответственно, продуцирующая способность штаммов, несущих одно и то же число копий интегративных кассет, но по-разному расположенных в геноме, могла быть разной. Поэтому в нашем эксперименте мы сравнили продуцирующую способность штаммов, различавшихся не только числом копий интегративных кассет, но и их локализацией в хромосоме.

4.2.1.4. Предварительное определение лимитирующей активности MVA пути в модельном штамме

Наличие дополнительной “точки интеграции” позволяет легко получить набор изогенных штаммов несущих дополнительную копию той или иной экспрессионной кассеты в заданной точке хромосомы. Сравнив продуцирующую способность таких штаммов, можно определить “узкое место” метаболического пути.

В одной из недавних работ проводился расчет лимитирующей активности для гетерологичного MVA пути на основании известных кинетических параметров ферментов (Dalwadi et al., 2018). Проведенные в данной работе расчеты показали, что для увеличения выхода конечного продукта необхо-

димо одновременное увеличение активностей гидроксиметилглутарил-КоА синтазы и гидроксиметилглутарил-КоА редуктазы, что, в нашем случае, соответствует амплификации генов *mvaES*.

Эти расчеты хорошо согласуются с нашими данными по продукции изопрена штаммами, полученными при интеграции вторых копий генов *mvaES*, *mvaS* и *mvk^{mpd}* в штамм IR5- Δ *gcd* (Рисунок 24). Введение дополнительных копий *mvk^{mpd}* и *mvaS* не только не увеличило, но даже несколько снизило продукцию, что может быть связано с ингибированием ферментов мевалонатного пути каким-либо из его фосфорилированных интермедиатов или гидроксиметилглутарил-КоА. Увеличение продукции наблюдалось лишь при интеграции *mvaES* оперона.

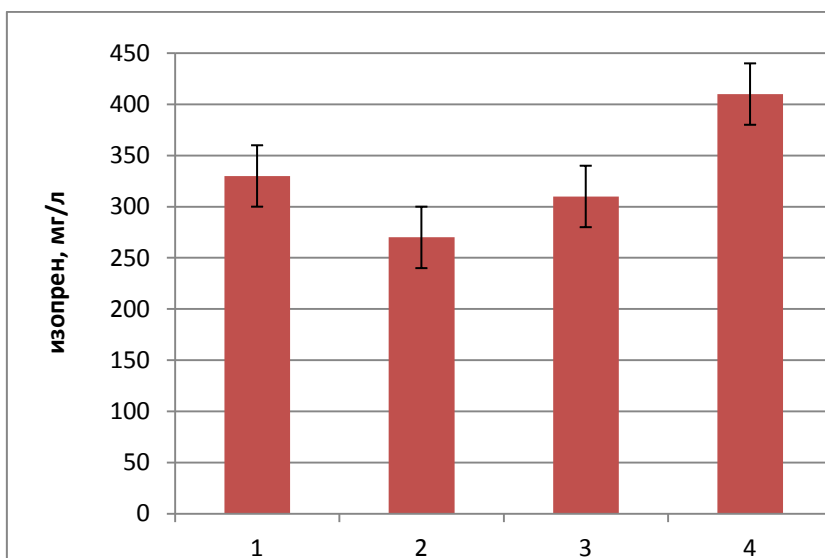


Рисунок 24 - Накопление изопрена штаммами с дополнительной копией одной из кассет P_{tac} -*mvk^{mpd}*, P_{phoC} -*mvaS* или P_{phoC} -*mvaES*

Штаммы были трансформированы мультикопийной плазмидой pSTV- P_{tac} - ϕ 10-*ispS*(M) (Hayashi et al., 2013). Культивирование проводили в среде 1. Приведены усредненные данные для четырех плазмидных клонов каждого штамма.

1 – IR5- Δ *gcd*

2 – IR5- Δ *gcd*:: P_{tac} -*mvk^{mpd}*

3 – IR5- Δ *gcd*:: P_{phoC} -*mvaS*

4 – IR5- Δ *gcd*:: P_{phoC} -*mvaES*

4.2.1.5. Получение набора штаммов, содержащих дополнительные копии генов MVA пути, за один раунд интеграции

Штамм IR5-3 Δ был трансформирован смесью трех плазмид (0,5 мкг каждой плазмиды): pАН162- P_{phoC} -*mvaES* и pАН162- P_{tac} -*mvk^{mpd}*, несущей мар-

кер тетрациклиновой устойчивости, и рАН162- P_{tac} -KDyI, маркированной геном *kan*. Использование индивидуальных маркеров для всех кассет позволило бы осуществлять прямую селекцию интересующих нас сочетаний кассет по антибиотической устойчивости интегрантов. С другой стороны, если целью работы является проверка всех возможных вариантов, логично использовать один маркер устойчивости. Исходя из результатов выше описанного опыта, можно было ожидать, что в нашем случае увеличенную продукцию будут давать клоны, несущие хотя бы одну дополнительную копию *mvaES*.

В нашем опыте среди 10^9 выживших после электропорации клеток $4,5 \times 10^5$ клонов выросли на чашках с добавлением канамицина, 10^6 клонов выросли на чашках с добавлением тетрациклина и $1,5 \times 10^4$ клонов на чашках с обоими антибиотиками (частота интеграции 3×10^{-4} , 10^{-3} и 10^{-5} , соответственно). Среди устойчивых к канамицину клонов 10% клонов оказались устойчивыми к тетрациклину. В наших условиях эксперимента частота электропорации, определенная на основании частоты электропорации автономно-реплицирующейся плазмиды, составляет 10^{-2} . Следовательно, интеграция каждой дополнительной кассеты происходит с частотой не меньшей чем 10^{-1} . Можно ожидать, что в данных условиях эксперимента возможна интеграция 5-6 плазмид одновременно. Такой подход возможно использовать с немаркированными кассетами для введения одновременно всех генов биосинтетического пути природного метаболита в штамм ауксотроф по нему, с восстановлением прототрофности. В нашем случае было бы целесообразно введение *de novo* всех генов мевалонатного пути на отдельных векторах в штамм с инактивированным природным немевалонатным путем (Charon et al., 2000). Можно добиться оптимизации соотношения уровня экспрессии генов, вводимого биосинтетического пути, созданием комбинаторной библиотеки, используя смесь плазмид с различными промоторами.

Для клонов, выросших на обоих антибиотиках, был проведен ПЦР анализ (см. “Материалы и методы”). Среди 95 проверенных клонов были ото-

браны 18 интегрантов, несущих вставки во всех трех локусах *gcd*, *ampC2* и *bla*. Детальный анализ тройных интегрантов показал, какая именно плазмида интегрирована в каждый локус. Среди тройных интегрантов, были отобраны 6 групп клонов имевших разный генотип (Таблица 10).

4.2.2. Отбор клонов с оптимальным сочетанием числа копий генов MVA пути с увеличенной продукцией изопрена

Для оценки продуцирующей способности штаммы были трансформированы плазмидой pHSG398- P_{tac} - $\phi 10$ -*ispS(M)*, содержащей ген изопренсинтазы из *Mucuna bracteata*. Поскольку как было установлено ранее (Hayashi et al., 2013), изопренсинтаза малоактивный фермент, то для получения видимой продукции изопрена требуется введение соответствующего структурного гена многокопийной плазмиде, под контролем высокоактивного промотора P_{tac} и при образовании эффективного участка связывания рибосом (RBS) на основе этой области из гена *10* бактериофага T7 (Olins & Rangwala, 1989; Studier et al., 1990). Культивирование проводилось в виалах для газовой хроматографии в соответствии с протоколом, описанном в разделе «Материалы и методы». Полученные результаты приведены в таблице 10. Как и ожидалось, в этом эксперименте более высокой (по сравнению с родительским штаммом) продуцирующей способностью, обладали интегранты, содержащие дополнительную копию *mvaES*. Напротив, в штаммах с двумя дополнительными копиями *mvk^{mpd}* наблюдалось снижение продукции. Наилучший результат был получен для штамма с двумя дополнительными копиями KDuI и одной дополнительной копией *mvaES*. Хотя в этом опыте нам удалось отобрать и проверить только 6 из 27 возможных вариантов штаммов, было достигнуто увеличение продукции изопрена на 30%, что подтверждает потенциальные возможности выбранного подхода.

Таблица 10 - Накопление изопрена производными штамма IR5-3Δ, содержащими дополнительные копии экспрессионных кассет

Производные штаммы IR5-3Δ-S были трансформированы мультикопийной плазмидой pHSG398-P_{tac}-φ10-*ispS(M)*. Культивирование проводили в среде 2. Приведены усредненные данные для пяти плазмидных клонов каждого штамма.

Номер штамма	Локус			Изопрен, мг/л
	<i>bla</i>	<i>ampC2</i>	<i>gcd</i>	
IR5-3Δ-S	-	-	-	215 ± 15
1	KDyI	<i>mvk</i>	<i>mvk</i>	170 ± 15
2	<i>mvk</i>	KDyI	<i>mvk</i>	180 ± 30
3	<i>mvk</i>	<i>mvk</i>	KDyI	190 ± 30
4	-	-	<i>mvaES</i>	240 ± 30
5	<i>mvk</i>	KDyI	<i>mvaES</i>	220 ± 40
6	<i>mvk</i>	<i>mvaES</i>	KDyI	260 ± 30
7	KDyI	<i>mvaES</i>	KDyI	280 ± 30

Таким образом, эффективность электропорации клеток *P. ananatis* и частота интеграции, обеспечиваемая плазмидой-помощником pAH123-cat, оказались достаточными для одновременной интеграции трех плазмид, несущих только два разных маркера антибиотической устойчивости. Очевидно, использование индивидуального маркера для каждой интегративной плазмиды, могло бы обеспечить более простой и эффективный отбор таких интегрантов. Нельзя исключать, что при использовании штамма-реципиента с большим числом сайтов *attB*_{φ80}, возможна одновременная интеграция и большего числа плазмид. В нашем модельном эксперименте конечный продукт находился в газообразном состоянии, что делало невозможным использование современных высокопроизводительных систем культивирования. Накопление изопрена измерялось методом газовой хроматографии. Все это накладывало жесткие ограничения на число анализируемых клонов. В общем случае, роботизация процесса с использованием биосенсоров на конечный продукт в сочетании с предложенным генно-инженерным подходом может стать высокоэффективным средством оптимизации экспрессии генов целевого биосинтетического пути.

ВЫВОДЫ

1. Клонированы и охарактеризованы новые рекомбинантные мевалонаткиназы из архей, не подверженные ретроингибированию. Показано, что кинетические параметры (K_m) мевалонаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola* характеризуют новые ферменты как значительно более эффективные по сравнению с ранее известной, устойчивой к ретроингибированию мевалонаткиназой из *M. mazei*.
2. Продемонстрировано преимущество мевалонаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola* для обеспечения повышенной продукции изопрена.
3. Разработан новый метод сбалансированного усиления экспрессии генов целевого биосинтетического пути за счёт их случайной, но сайт-специфической интеграции в составе смеси CRIM-плазмид в подготовленные локусы бактериальной хромосомы с последующей селекцией лучших вариантов по продукции целевого соединения. С помощью этого подхода накопление изопрена штаммом-продуцентом увеличено на 30%.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

трис – трис(гидроксиметил)аминометан;

Ар – ампициллин;

Сm – хлорамфеникол;

Кm – канамицин;

Тс – тетрациклин;

АТР - аденозин-5'-трифосфат;

СоА - коэнзим А;

DMAPP – диметилаллилпирофосфат;

IPP – изопентенилпирофосфат;

FPP – фарнезилпирофосфат;

GPP - геранилпирофосфат;

DPM – дифосфомевалонат;

DXP - 1-дезоксид-ксилулозо-5-фосфат;

DXR - DXP-редуктоизомераза;

DXS - 1-дезоксид-ксилулозо-5-фосфатсинтаза;

HMB-PP - (E)-4-гидрокси-3-метилбутен-2-илпирофосфат;

IspE - 4-цитидил-5'-дифосфо-2-С-метил-D-эритритолкиназа;

IspF - MEcPP-синтаза;

IspG - HMB-PP-синтазы;

IspD - 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат цитидилтрансферазы;

MEcPP - 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфат;

MEP - метил-D-эритритол-4-фосфат;

IDI - изопентенилпирофосфат-изомераза;

MEP-путь - метил-D-эритритол-4-фосфат-зависимый путь синтеза IPP;

MVA путь - мевалонат-зависимый (классический) путь синтеза IPP;

MVK - мевалонаткиназа;

MDD – мевалонатдифосфатдекарбоксилаза;
PMK – фосфомевалонаткиназа;
RBS – последовательность Шайна-Дальгарно;
HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота;
PEP – фосфоенолпируват;
dNTP – дезоксинуклеотид;
NADP/ NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленный/ восстановленный;
NAD/ NADH - никотинамидадениндинуклеотид, окисленный/ восстановленный.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, Stephanopoulos G.** Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm.* 2008;5(2):167-190.
2. **Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G.** Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science.* 2010;330(6000):70-74.
3. **Albrecht M, Sandmann G.** Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Physiol.* 1994;105(2):529-534.
4. **Alper H, Jin YS, Moxley JF, Stephanopoulos G.** Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2005;7(3):155-164.
5. **Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G.** Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat Biotechnol.* 2005;23(5):612-616.
6. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(17):3389-3402.
7. **Alvear M, Jabalquinto AM, Eyzaguirre J, Cardemil E.** Purification and characterization of avian liver mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Biochemistry.* 1982;21(19):4646-4650.
8. **Andreassi JL 2nd, Bilder PW, Vetting MW, Roderick SL, Leyh TS.** Crystal structure of the *Streptococcus pneumoniae* mevalonate kinase in complex with diphosphomevalonate. *Protein Sci.* 2007;16(5):983-989.
9. **Andreassi JL 2nd, Dabovic K, Leyh TS.** *Streptococcus pneumoniae* isoprenoid biosynthesis is downregulated by diphosphomevalonate: an anti-microbial target. *Biochemistry.* 2004; 43(51):16461-16466.
10. **Andreassi JL 2nd, Leyh TS.** Molecular functions of conserved aspects of the GHMP kinase family. *Biochemistry.* 2004;43(46):14594-14601.
11. **Andreassi JL 2nd, Vetting MW, Bilder PW, Roderick SL, Leyh TS.** Structure of the ternary complex of phosphomevalonate kinase: the enzyme and its family. *Biochemistry.* 2009;48(27):6461-6468.
12. **Andreeva IG, Golubeva LI, Kuvaeva TM, Gak ER, Katashkina JI, Mashko SV.** Identification of *Pantoea ananatis* gene encoding membrane pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase and

- pqqABCDEF operon essential for PQQ biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011;318(1):55-60.
13. **Anstrom DM, Kallio K, Remington SJ.** Structure of the *Escherichia coli* malate synthase G:pyruvate:acetyl-coenzyme A abortive ternary complex at 1.95 Å resolution. *Protein Sci.* 2003;12(9):1822-1832.
 14. **Anthony JR, Anthony LC, Nowroozi F, Kwon G, Newman JD, Keasling JD.** Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. *Metabolic Engineering.* 2009;11:13-19.
 15. **Azami Y, Hattori A, Nishimura H, Kawaide H, Yoshimura et al.** (R)-mevalonate-3-phosphate is an intermediate of the mevalonate pathway in *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem.* 2014;289:15957–15967.
 16. **Banerjee A, Wu Y, Banerjee R, Li Y, Yan H, Sharkey TD.** Feedback inhibition of deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase regulates the methylerythritol 4-phosphate pathway. *J Biol Chem.* 2013;288(23):16926-16936.
 17. **Barta ML, Skaff DA, McWhorter WJ, Herdendorf TJ, Miziorko HM, Geisbrecht BV.** Crystal structures of *Staphylococcus epidermidis* mevalonate diphosphate decarboxylase bound to inhibitory analogs reveal new insight into substrate binding and catalysis. *J Biol Chem.* 2011;286(27):23900-10.
 18. **Barta ML, McWhorter WJ, Miziorko HM, Geisbrecht BV.** Structural basis for nucleotide binding and reaction catalysis in mevalonate diphosphate decarboxylase. *Biochemistry.* 2012;51 (28):5611–5621.
 19. **Bazaes S, Beytía E, Jabalquinto AM, Solís de Ovando F, Gómez I, Eyzaguirre J.** Pig liver phosphomevalone kinase. 1. Purification and properties. *Biochemistry.* 1980;19(11):2300-4.
 20. **Bazaes, S, Beytia, E, Jabalquinto, A.M, Solis de Ovando, F, Gomez, I.** Pig liver phosphomevalonate kinase. 2. Participation of cysteinyl and lysyl groups in catalysis. *Biochemistry.* 1980;19: 2305-2310.
 21. **Beck ZQ, Cervin MA, Nielsen AT, Peres CM.** Compositions and methods of PGL for the increased production of isoprene. 2013; US Patent 845,523,6B2
 22. **Bergès T, Guyonnet D, Karst F.** The *Saccharomyces cerevisiae* mevalonate diphosphate decarboxylase is essential for viability, and a single Leu-to-Pro mutation in a conserved sequence leads to thermosensitivity. *J Bacteriol.* 1997;179(15):4664-4670.
 23. **Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, Peruch F.** Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie.* 2012;94(8):1621-1634.
 24. **Beytia E, Dorsey JK, Marr J, Cleland WW, Porter JW.** Purification and mechanism of action of hog liver mevalonic kinase. *J Biol Chem.* 1970 ;245(20):5450-5458.

25. **Bischoff KM, Rodwell VW.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of *Haloferax volcanii*: role of histidine 398 and attenuation of activity by introduction of negative charge at position 404. *Protein Sci.* 1997;6:156-161.
26. **Bischoff KM, Rodwell VW.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Haloferax volcanii*: Purification, characterization and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1996;178:19-23.
27. **Bloch K, Chaykin S, Phillips Ah, De Waard A.** Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J Biol Chem.* 1959;234:2595-2604.
28. **Bochar DA, Brown J.R, Doolittle WF, Klenk HP, Lam W, Schenk ME, Stauffacher CV, Rodwell VW.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Sulfolobus solfataricus*: DNA sequence, phylogeny, expression in *Escherichia coli* of the *hmgA* gene, and purification and kinetic properties of the gene product. *J. Bacteriol.* 1997;179:3632-3638.
29. **Bonanno JB, Edo C, Eswar N, Pieper U, Romanowski MJ, Ilyin V, Gerchman SE, Kycia H, Studier FW, Sali A, Burley SK.** Structural genomics of enzymes involved in sterol/isoprenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(23):12896-12901.
30. **Bork P, Sander C, Valencia A.** Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.* 1993;2(1):31-40.
31. **Boucher Y, Doolittle WF.** The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol.* 2000;37(4):703-716.
32. **Boucher Y, Huber H, L'Haridon S, Stetter KO, Doolittle WF.** Bacterial origin for the isoprenoid biosynthesis enzyme HMG-CoA reductase of the archaeal orders *Thermoplasmatales* and *Archaeoglobales*. *Mol Biol Evol.* 2001;18(7):1378-1388.
33. **Breitling R, Laubner D, Clizbe D, Adamski J, Krisans SK.** Isopentenyl-diphosphate isomerases in human and mouse: evolutionary analysis of a mammalian gene duplication. *J Mol Evol.* 2003;57(3):282-291.
34. **Brüggemann N, Schnitzler JP.** Relationship of isopentenyl diphosphate (IDP) isomerase activity to isoprene emission of oak leaves. *Tree Physiol.* 2002;22(14):1011-1018.
35. **Byres E, Alphey MS, Smith TK, Hunter WN.** Crystal structures of *Trypanosoma brucei* and *Staphylococcus aureus* mevalonate diphosphate decarboxylase inform on the determinants of specificity and reactivity. *J Mol Biol.* 2007;371(2):540-553.
36. **Calveras J, Thibodeaux CJ, Mansoorabadi SO, Liu HW.** Stereochemical studies of the type II isopentenyl diphosphate-dimethylallyl diphosphate isomerase implicate the FMN coenzyme in substrate protonation. *Chembiochem.* 2012;13(1):42-46.
37. **Campobasso N, Patel M, Wilding IE, Kallender H, Rosenberg M, Gwynn MN.** *Staphylococcus aureus* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA

- synthase: crystal structure and mechanism. *J Biol Chem.* 2004;279(43):44883-44888.
38. **Campos N, Rodríguez-Concepción M, Sauret-Güeto S, Gallego F, Lois LM, Boronat A.** *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate: a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J.* 2001;353(1):59-67.
 39. **Cankar K, van Houwelingen A, Bosch D, Sonke T, Bouwmeester H, Beekwilder J.** A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Lett.* 2011;585(1):178-182.
 40. **Carbonell T, Freire E.** Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. *Biochemistry.* 2005;44:11741-11748.
 41. **Cardemil E, Jabalquinto A.M.** Mevalonate 5-pyrophosphate decarboxylase from chicken liver. *Methods Enzymol.* 1985;110:86-92.
 42. **Carrigan CN, Poulter CD.** Zinc is an essential cofactor for type I isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *J Am Chem Soc.* 2003;125(30):9008-9009.
 43. **Cervin M, Whited GM, Chotani GK, Valle F, Fioresi C, Sanford KJ, McAuliffe JC, Ferher FJ, Puhala AS, Miasnikov A, and Aldor IS.** Compositions and methods for producing isoprene. 2009. *International Publication Number* WO2009/076676 A2.
 44. **Chambliss KL, Slaughter CA, Schreiner R, Hoffmann GF, Gibson KM.** Molecular cloning of human phosphomevalonate kinase and identification of a consensus peroxisomal targeting sequence. *J Biol Chem.* 1996;271(29):17330-17334.
 45. **Chang Q, Yan XX, Gu SY, Liu JF, Liang DC.** Crystal structure of human phosphomevalonate kinase at 1.8 Å resolution. *Proteins.* 2008;73(1):254-258.
 46. **Charon L, Hoeffler JF, Pale-Grosdemange C, Lois LM, Campos N, Boronat A, Rohmer M.** Deuterium-labelled isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol as tools for the elucidation of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J.* 2000;346(3):737-742.
 47. **Chen B, Tian J, Zhang J, Wang K, Liu L, Yang B, Bao L, Liu H.** Triterpenes and meroterpenes from *Ganoderma lucidum* with inhibitory activity against HMGs reductase, aldose reductase and α -glucosidase. *Fitoterapia.* 2017;120:6-16.
 48. **Chen GZ, Foster L, Bennet J.L** Purification and characterization of 3-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase of *Schistosoma mansoni*: Regulation of parasite enzyme activity differs from mammalian host. *Exp. Parasitol.* 1991;73:82-92.
 49. **Chen H, Liu C, Li M, Zhang H, Xian M, Liu H.** Directed evolution of mevalonate kinase in *Escherichia coli* by random mutagenesis for improved lycopene. *RSC Advances.* 2018; 8(27):15021-15028.

50. **Chiew YE, O'Sullivan WJ, Lee CS.** Studies on pig liver mevalonate-5-diphosphate decarboxylase. *Biochim Biophys Acta*. 1987;916(3):271-278.
51. **Cho YK, Ríos SE, Kim JJ, Miziorko HM.** Investigation of invariant serine/threonine residues in mevalonate kinase. Tests of the functional significance of a proposed substrate binding motif and a site implicated in human inherited disease. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12573-12578.
52. **Chu X, Li D.** Cloning, expression, and purification of His-tagged rat mevalonate kinase. *Protein Expr Purif*. 2003;27(1):165-170.
53. **Chu X, Li D.** Expression, purification, and characterization of His20 mutants of rat mevalonate kinase. *Protein Expr. Purif*. 2003;32:75-82.
54. **Chu X, Liu X, Yau M, Leung YC, Li D.** Expression and purification of Arg196 and Lys272 mutants of mevalonate kinase from *Methanococcus jannaschii*. *Protein Expr Purif*. 2003;30(2):210-218.
55. **Chu X, Yu W, Wu L, Liu X, Li N, Li D.** Effect of a disulfide bond on mevalonate kinase. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007;1774:1571-1581.
56. **Chun KY, Vinarov DA, Zajicek J, Miziorko HM.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. A role for glutamate 95 in general acid/base catalysis of C-C bond formation. *J Biol Chem*. 2000;275(24):17946-17953.
57. **Clinkenbeard KD, Sugiyama T, Lane M.D.** Cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase from chicken liver. *Methods Enzymol*. 1975;35 B:167-173.
58. **Clinkenbeard KD, Reed WD, Mooney RA, Lane MD.** Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. Separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A generating systems for cholesterologenesis and ketogenesis. *J Biol Chem*. 1975;250(8):3108-3116.
59. **Clinkenbeard KD, Sugiyama T, Moss J, Reed WD, Lane MD.** Molecular and catalytic properties of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase from avian liver. *J Biol Chem*. 1973;248(7):2275-2284.
60. **Clizbe DB, Owens ML, Masuda KR, Shackelford JE, Krisans SK.** IDI2, a second isopentenyl diphosphate isomerase in mammals. *J Biol Chem*. 2007;282(9):6668-6676.
61. **Concepcion JL, Gonzalez-Pakanowska D, Urbina JA.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: Subcellular localization and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys*. 1998;352:114-120.
62. **Coppens I, Courtoy PJ.** The mevalonate pathway in parasitic protozoa and helminths. *Exp Parasitol*. 1996;82(1):76-85.
63. **Cornforth JW, Phillips GT, Messner B, Eggerer H.** Substrate stereochemistry of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *Eur J Biochem*. 1974;42(2):591-604.
64. **Cornforth RH, Fletcher K, Hellig H, Popjak G.** Stereospecificity of enzymic reactions involving mevalonic acid. *Nature*. 1960;185:923-924.

65. **Dalwadi MP, Garavaglia M, Webb JP, King JR, Minton NP.** Applying asymptotic methods to synthetic biology: Modelling the reaction kinetics of the mevalonate pathway. *J Theor Biol.* 2018;439:39-49.
66. **Darnay BG, Wang Y, Rodwell VW.** Identification of the catalytically important histidine of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem.* 1992;267(21):15064-15070.
67. **de Ruyck J, Durisotti V, Oudjama Y, Wouters J.** Structural role for Tyr-104 in *Escherichia coli* isopentenyl-diphosphate isomerase: site-directed mutagenesis, enzymology, and protein crystallography. *J Biol Chem.* 2006;281(26):17864-17869.
68. **de Ruyck J, Pouyez J, Rothman SC, Poulter D, Wouters J.** Crystal structure of type 2 isopentenyl diphosphate isomerase from *Thermus thermophilus* in complex with inorganic pyrophosphate. *Biochemistry.* 2008;47(35):9051-9053.
69. **Dellas N, Thomas ST, Manning G, Noel JP.** Discovery of a metabolic alternative to the classical mevalonate pathway. *Elife* 2013;2:e00672.
70. **Dhe-Paganon S, Magrath J, Abeles RH.** Mechanism of mevalonate pyrophosphate decarboxylase: evidence for a carbocationic transition state. *Biochemistry.* 1994;33(45):13355-13362.
71. **Dinesh N, Pallerla DSR, Kaur PK, Babu NK, Singh S.** Exploring *Leishmania donovani* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) as a potential drug target by biochemical, biophysical and inhibition studies. *Microb. Pathog.* 2014;66:14-23.
72. **Doun SS, Burgner JW 2nd, Briggs SD, Rodwell VW.** *Enterococcus faecalis* phosphomevalonate kinase. *Protein Sci.* 2005;14(5):1134-1139.
73. **Duarte DP, Ferreira ÉR, Lima FM, Batista F, De Groote M, Horjales E, Miletto LC, Bahia D.** Molecular Characterization of *Trypanosoma evansi* Mevalonate Kinase (TeMVK). *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:223.
74. **Duncombe GR, Frerman FE.** Molecular and catalytic properties of the acetoacetyl-coenzyme A thiolase of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976;176:159-170.
75. **Durbecq V, Sainz G, Oudjama Y, Clantin B, Bompard-Gilles C, Tricot C, Caillet J, Stalon V, Droogmans L, Villeret V.** Crystal structure of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *EMBO J.* 2001;20(7):1530-1537.
76. **Durr IF, Rudney H.** The reduction of beta-hydroxy-beta-methyl-glutaryl coenzyme A to mevalonic acid. *J Biol Chem.* 1960;235:2572-2578.
77. **Ekiel I, Smith IC, Sprott GD.** Mevalonic acid is partially synthesized from amino acids in *Halobacterium cutirubrum*: a C¹³ nuclear magnetic resonance study. *J Bacteriol.* 1986;166:559-564.
78. **El-Jack M, Mackenzie A, Bramley PM.** The photoregulation of carotenoid biosynthesis in *Aspergillus giganteus* mut. *alba*. *Planta.* 1988;174(1):59-66.

- 79.**Emory SA, Belasco JG.** The ompA 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *J Bacteriol.* 1990;172(8):4472-4481.
- 80.**Endo A, Kuroda M, Tanzawa K** Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 1976;72(2):323-326.
- 81.**Eyzaguirre J, Valdebenito D,** Cardemil E. Pig liver phosphomevalonate kinase: kinetic mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 2006;454(2):189-96.
- 82.**Farmer WR, Liao JC.** Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat Biotechnol.* 2000;18(5):533-537.
- 83.**Farmer WR, Liao JC.** Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 2001;17(1):57-61.
- 84.**Fathepure BZ.** Isolation and characterization of an aceticlastic methanogen from a biogas digester. *FEMS Microbiology Letters.* 1983;19: 151-156.
- 85.**Ferguson Jj Jr,** Rudney H. The biosynthesis of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A in yeast. I. Identification and purification of the hydroxymethylglutaryl coenzymecondensing enzyme. *J Biol Chem.* 1959;234(5):1072-1075.
- 86.**Ferreira ÉR, Horjales E, Bonfim-Melo A, Cortez C, da Silva CV, De Groote M, Sobreira TJ, Cruz MC, Lima FM, Cordero EM, Yoshida N, da Silveira JF, Mortara RA, Bahia D.** Unique behavior of *Trypanosoma cruzi* mevalonate kinase: A conserved glycosomal enzyme involved in host cell invasion and signaling. *Sci Rep.* 2016;6:24610.
- 87.**Ferry JG.** How to make a living by exhaling methane. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:453-473.
- 88.**Flügge UI, Gao W.** Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes. *Plant Biol (Stuttg).* 2005;7(1):91-97.
- 89.**Fox AR, Soto G, Mozzicafreddo M, Garcia AN, Cuccioloni M, Angeletti M, Salerno JC, Ayub ND.** Understanding the function of bacterial and eukaryotic thiolases II by integrating evolutionary and functional approaches. *Gene.* 2014;533(1):5-10.
- 90.**Frimpong K, Rodwell VW.** Catalysis by Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Proposed roles of histidine 865, glutamate 558, and aspartate 766. *J Biol Chem.* 1994;269(15):11478-11483.
- 91.**Fu Z, Voynova NE, Herdendorf TJ, Miziorko HM, Kim JJ.** Biochemical and structural basis for feedback inhibition of mevalonate kinase and isoprenoid metabolism. *Biochemistry.* 2008; 47(12): 3715-3724.
- 92.**Fu Z, Wang M, Potter D, Miziorko HM,** Kim JJ. The structure of a binary complex between a mammalian mevalonate kinase and ATP: insights into the reaction mechanism and human inherited disease. *J Biol Chem.* 2002;277(20):18134-18142.

93. **Fu Z, Runquist JA, Montgomery C, Miziorko HM, Kim JJ.** Functional insights into human HMG-CoA lyase from structures of Acyl-CoA-containing ternary complexes. *J Biol Chem.* 2010;285(34):26341-26349.
94. **Garcia DE, Keasling JD.** Kinetics of phosphomevalonate kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 2014;9:e87112.
95. **Gehring U, Harris JI.** The active site cysteines of thiolase. *Eur J Biochem.* 1970;16(3):492-498.
96. **George KW, Thompson MG, Kim J, Baidoo EEK, Wang G, Benites VT, Petzold CJ, Chan LJG, Yilmaz S, Turhanen P, Adams PD, Keasling JD, Lee TS.** Integrated analysis of isopentenyl pyrophosphate (IPP) toxicity in isoprenoid-producing *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2018;47:60-72.
97. **Gesto DS, Cerqueira NM, Ramos MJ, Fernandes PA.** Discovery of new druggable sites in the anti-cholesterol target HMG-CoA reductase by computational alanine scanning mutagenesis. *J Mol Model.* 2014;20(4):2178.
98. **Gharehbeglou M, Arjmand G, Haeri MR, Khazeni M.** Nonselective mevalonate kinase inhibitor as a novel class of antibacterial agents. *Cholesterol* 2015;2015:147601.
99. **Gill JF Jr, Beach MJ, Rodwell VW.** Mevalonate utilization in *Pseudomonas* sp. M. Purification and characterization of an inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem.* 1985;260(16):9393-9398.
100. **Goncharenko AV, Ershov YV, Salina EG, Wiesner J, Vostroknutova GN, Sandanov AA, Kaprelyants AS, Ostrovsky DN.** The role of 2-C-methylerythritol-2,4-cyclopyrophosphate in the resuscitation of the “nonculturable” forms of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology.* 2007; 76:147-152.
101. **Goodfellow RD, Barnes FJ.** Mevalonate kinase from the larva of the fleshfly, *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem.* 1971;1:271-282.
102. **Gray JC, Kekwick RGO.** Mevalonate kinase in green leaves and etiolated cotyledons of the french bean *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. J.* 1973;133:335-347.
103. **Greenspan MD, Yudkovitz JB, Lo CY, Chen JS, Alberts AW, Hunt VM, Chang MN, Yang SS, Thompson KL, Chiang YC, et al.** Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A synthase by L-659,699. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(21):7488-7492.
104. **Gresh N, Audiffren N, Piquemal JP, de Ruyck J, Ledecq M, Wouters J.** Analysis of the interactions taking place in the recognition site of a bimetallic Mg(II)-Zn(II) enzyme, isopentenyl diphosphate isomerase. a parallel quantum-chemical and polarizable molecular mechanics study. *J Phys Chem B.* 2010;114(14):4884-4895.
105. **Grieshaber NA, Fischer ER, Mead DJ, Dooley CA, Hackstadt T.** Chlamydial histone-DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:7451–7456.

106. **Gustafson CE, Kaul S, Ishiguro EE.** Identification of the *Escherichia coli* *lytB* gene, which is involved in penicillin tolerance and control of the stringent response. *J Bacteriol.* 1993; 175:1203–1205.
107. **Hahn FM, Hurlburt AP, Poulter CD.** *Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase. *J Bacteriol.* 1999;181(15):4499-4504.
108. **Hara Y, Kadotani N, Izui H, Katashkina JI, Kuvaeva TM, Andreeva IG, Golubeva LI, Malko DB, Makeev VJ, Mashko SV, Kozlov YI.** The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ13355, an organism with great biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 93:331-341.
109. **Hayashi Y, Harada M, Takaoka S, Fukushima Y, Yokoyama K, Nishio Y, Tajima Y, Mihara Y, Nakata K.** Isoprene synthase and polynucleotide encoding same, and method for producing isoprene monomer. 2013. WO2013179722A1.
110. **Heaps NA, Poulter CD.** Type-2 isopentenyl diphosphate isomerase: evidence for a stepwise mechanism. *J Am Chem Soc.* 2011;133(47):19017-19019.
111. **Hedl M, Rodwell VW.** *Enterococcus faecalis* mevalonate kinase. *Protein Sci.* 2004;13:687-693.
112. **Hedl M, Sutherlin A, Wilding E.I, Mazzulla M, McDevitt D, Lane P, Burgner JW, Lehnbeuter KR, Stauffacher CV, Gwynn MN, Rodwell VW.** *Enterococcus faecalis* acetoacetyl-coenzyme A thiolase/3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, a dual-function protein of isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 2002;184:2116-2122.
113. **Herdendorf TJ, Miziorko HM.** Functional evaluation of conserved basic residues in human phosphomevalonate kinase. *Biochemistry.* 2007;46(42):11780-11788.
114. **Herdendorf TJ, Miziorko HM.** Phosphomevalonate kinase: functional investigation of the recombinant human enzyme. *Biochemistry.* 2006;45(10):3235-3242.
115. **Hinson DD, Chambliss KL, Hoffmann GF, Krisans S, Keller RK, Gibson KM.** Identification of an active site alanine in mevalonate kinase through characterization of a novel mutation in mevalonate kinase deficiency. *J Biol Chem.* 1997;272(42):26756-26760.
116. **Hinson DD, Chambliss KL, Toth MJ, Tanaka RD, Gibson KM.** Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J Lipid Res.* 1997;38(11):2216-2223.
117. **Holloway PW.** Isopentenylpyrophosphate isomerase. The Enzymes, 3rd Ed. (Boyer, P. D. , ed.) 1972;6:565-572.
118. **Hoshino T, Eguchi T.** Functional analysis of type 1 isopentenyl diphosphate isomerase from *Halobacterium* sp. NRC-1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71(10):2588-2591.

119. **Hoshino T, Nango E, Baba S, Eguchi T, Kumasaka T.** Crystallization and preliminary X-ray analysis of isopentenyl diphosphate isomerase from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2011;67(Pt 1):101-103.
120. **Houten SM, Wanders RJ, Waterham HR.** Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529(1-3):19-32.
121. **Huang KX, Scott AI, Bennett GN.** Overexpression, purification, and characterization of the thermostable mevalonate kinase from *Methanococcus jannaschii*. *Protein Expr Purif* 1999;17(1):33-40.
122. **Huang Q, Roessner CA, Croteau R, Scott AI.** Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorg Med Chem*. 2001;9(9):2237-2242.
123. **Hurtado-Guerrero R, Pena-Diaz J, Montalvetti A, Ruiz-Perez L.M, Gonzalez-Pacanowska D.** Kinetic properties and inhibition of *Trypanosoma cruzi* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. *FEBS Lett*. 2002;510:141-144.
124. **Huth W, Dierich C, von Oeynhausen V, Seubert W.** Multiple mitochondrial forms of acetoacetyl-CoA thiolase in rat liver: possible regulatory role in ketogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1974;56:1069-1077.
125. **Huth W, Jonas R, Wunderlich I, Seubert W.** On the mechanism of ketogenesis and its control. Purification, kinetic mechanism and regulation of different forms of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolases from ox liver. *Eur. J. Biochem*. 1975;59:475-489.
126. **Istvan ES, Deisenhofer J** Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001;292(5519):1160-1164.
127. **Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J.** Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J*. 2000;19(5):819-830.
128. **Iyengar R, Cardemil E, Frey PA.** Mevalonate-5-diphosphate decarboxylase: stereochemical course of ATP-dependent phosphorylation of mevalonate 5-diphosphate. *Biochemistry*. 1986;25(16):4693-4698.
129. **Izui H, Hara Y, Sato M, Akiyoshi N.** Method for producing L-glutamic acid. *United States Patent*. 2003, 6596517.
130. **Jabalquinto AM, Cardemil E.** Kinetic effects of ATP, divalent metal ions and pH on chicken liver mevalonate 5-diphosphate decarboxylase. *Biochim Biophys Acta*. 1987;916(2):172-178.
131. **Jabalquinto AM, Eyzaguirre J, Cardemil E.** Evidence of essential arginyl residues in chicken liver mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Arch Biochem Biophys*. 1983;225(1):338-343.
132. **Jain S, Caforio A, Driessen AJ.** Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Front Microbiol*. 2014;5:641.

133. **Jawaid S, Seidle H, Zhou WD, Abdirahman H, Abadeer M, Hix JH, van Hoek ML, Couch RD.** Kinetic Characterization and Phosphoregulation of the *Francisella tularensis* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (MEP Synthase). *PLoS One*. 2009; 4:e8288.
134. **Jin YS, Stephanopoulos G.** Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2007;9(4):337-347.
135. **Jung J, Lim JH, Kim SY, Im DK, Seok JY, Lee SV, Oh MK, Jung GY.** Precise precursor rebalancing for isoprenoids production by fine control of gapA expression in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2016;38:401-408.
136. **Kajiwarra S, Fraser PD, Kondo K, Misawa N.** Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J*. 1997;324 (Pt 2):421-426.
137. **Kanayama N, Himeda Y, Atomi H, Ueda M, Tanaka A.** Expression of acetoacetyl-CoA thiolase isoenzyme genes of n-alkane-assimilating yeast, *Candida tropicalis*: isoenzymes in two intracellular compartments are derived from the same genes. *J. Biochem*. 1997;122:616-621.
138. **Kaneda K, Kuzuyama T, Takagi M, Hayakawa Y, Seto H.** An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):932-937.
139. **Katashkina JI, Hara Y, Golubeva LI, Andreeva IG, Kuvaeva TM, Mashko SV.** Use of the λ Red-recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis*. *BMC Mol. Biol*. 2009;10: 34.
140. **Katsuki H, Bloch K.** Studies on the biosynthesis of ergosterol in yeast. Formation of methylated intermediates. *J Biol Chem* 1967;242(2):222-227.
141. **Kazieva E, Yamamoto Y, Tajima Y, Yokoyama K, Katashkina J, Nishio Y.** Characterization of feedback-resistant mevalonate kinases from the methanogenic archaeons *Methanosaeta concilii* and *Methanocella paludicola*. *Microbiology*. 2017;163(9):1283-1291.
142. **Kemp LE, Bond CS, Hunter WN.** Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphatesynthase: An essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:6591–6596.
143. **Keseler IM, Mackie A, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Bonavides-Martínez C, Fulcher C, Huerta AM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Muñiz-Rascado L, Ong Q, Paley S, Schröder I, Shearer AG, Subhraveti P, Travers M, Weerasinghe D, Weiss V, Collado-Vides J, Gunsalus RP, Paulsen I, Karp PD.** EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:605-612.

144. **Kiema TR, Harijan RK, Strozyk M, Fukao T, Alexson SE, Wierenga RK.** The crystal structure of human mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase (T1): insight into the reaction mechanism of its thiolase and thioesterase activities. *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2014;70:3212-3225.
145. **Kim DY, Bochar DA, Stauffacher CV, Rodwell VW.** Engineering of *Sulfolobus solfataricus* HMG-CoA reductase to a form whose activity is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemistry.* 2000;39:2269-2275.
146. **Kim SA, Copeland L.** Acetyl coenzyme A acetyltransferase of *Rhizobium* sp. (Cicer) strain CC 1192. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:3432-3437.
147. **Kittleman W, Thibodeaux CJ, Liu YN, Zhang H, Liu HW.** Characterization and mechanistic studies of type II isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry.* 2007;46:8401-8413.
148. **Kizer L, Pitera DJ, Pfleger BF, Keasling JD.** Application of functional genomics to pathway optimization for increased isoprenoid production. *Appl Environ Microb* 2008;74(10):3229–3241.
149. **Koon N, Squire CJ, Baker EN.** Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(22):8295-8300.
150. **Krepkiy D, Miziorko HM.** Identification of active site residues in mevalonate diphosphate decarboxylase: implications for a family of phosphotransferases. *Protein Sci.* 2004; 13(7):1875-1881.
151. **Krepkiy DV, Miziorko HM.** Investigation of the functional contributions of invariant serine residues in yeast mevalonate diphosphate decarboxylase. *Biochemistry.* 2005;44:2671-2677.
152. **Kreuz K, Kleinig H.** Synthesis of prenyl lipids in cells of spinach leaf. Compartmentation of enzymes for formation of isopentenyl diphosphate. *Eur J Biochem.* 1984;141(3):531-535.
153. **Kumari U, Vishwakarma RK, Sonawane P, Abbassi S, Khan BM.** Biochemical characterization of recombinant mevalonate kinase from *Bacopa monniera*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;72:776-783.
154. **Kuzuyama T.** Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66(8):1619-1627.
155. **Kuzuyama T, Seto H.** Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012;88(3):41-52.
156. **Lange BM., Rujan T, Martin W, Croteau R.** Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:13172–13177.

157. **Laupitz R, Hecht S, Amslinger S, Zepeck F, Kaiser J, Richter G, Schramek N, Steinbacher S, Huber R, Arigoni D, Bacher A, Eisenreich W, Rohdich F.** Biochemical characterization of *Bacillus subtilis* type II isopentenyl diphosphate isomerase, and phylogenetic distribution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Eur J Biochem.* 2004;271(13):2658-2669.
158. **Lawrence CM, Rodwell VW, Stauffacher CV** Crystal structure of *Pseudomonas mevalonii* HMG-CoA reductase at 3.0 angstrom resolution. *Science.* 1995;268(5218):1758-1762.
159. **Lefurgy ST, Rodriguez SB, Park CS, Cahill S, Silverman RB, Leyh TS.** Probing ligand-binding pockets of the mevalonate pathway enzymes from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.* 2010;285(27):20654-20663.
160. **Liscum L, Finer-Moore J, Stroud RM, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL.** Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1985;260(1):522-530.
161. **Lombard J, Moreira D.** Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol Biol Evol.* 2011;28(1):87-99.
162. **Lücker J, Schwab W, Franssen MC, Van Der Plas LH, Bouwmeester HJ, Verhoeven HA.** Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis: two-step production of (+)-trans-isopiperitenol by tobacco. *Plant J.* 2004;39(1):135-145.
163. **Lütke-Brinkhaus F, Liedvogel B, Kleinig H.** On the biosynthesis of ubiquinones in plant mitochondria. *Eur J Biochem.* 1984;141(3):537-541.
164. **Lynen F.** Biosynthetic pathways from acetate to natural products. *Pure Appl Chem* 1967;14(1):137-167.
165. **Ma SM, Garcia DE, Redding-Johanson AM, Friedland GD, Chan R, Batth TS, Chhabra SR.** Optimization of a heterologous mevalonate pathway through the use of variant HMG-CoA reductases. *Metabolic Engineering.* 2011;13:588-597.
166. **Macheroux P, Kappes B, Ealick SE.** Flavogenomics--a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *FEBS J.* 2011;278(15):2625-2634.
167. **Madhosingh C, Orr W.** Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase purification and properties of the enzyme from *Fusarium oxysporum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1978;523:283-296.
168. **Markley K, Smallan, E.** Mevalonic kinase in rabbit liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1961;47:327-335.
169. **Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD.** Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol.* 2003;21 (7):796–802.
170. **Martin VJ, Yoshikuni Y, Keasling JD.** The *in vivo* synthesis of plant sesquiterpenes by *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2001;75(5):497-503.

171. **Menahan L.A, Hron W.T, Hinkelman D.G, Miziorko H.M.** Interrelationships between 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, acetoacetyl-CoA and ketogenesis. *Eur. J. Biochem.* 1981;119:287-296.
172. **Michihara A, Akasaki K, Yamori Y, Tsuji H.** Purification and characterization of mouse mevalonate pyrophosphate decarboxylase. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;25:302-306.
173. **Michihara A, Sawamura M, Nara Y, Ikeda K, Yamori Y.** Purification and characterization of two mevalonate pyrophosphate decarboxylases from rat liver: a novel molecular species of 37 kDa. *J Biochem.* 1997 Sep;122(3):647-654.
174. **Middleton B, Tubbs PK.** An enzyme-bound intermediate in the biosynthesis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A. *Biochem J.* 1974 Jan;137(1):15-23.
175. **Middleton B.** The kinetic mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a synthase from baker's yeast. *Biochem. J.* 1972;126:35-47.
176. **Mihara Y., Rachi H., Nishio Y., Katashkina J, Kazieva ED, Andreeva IG.** Method of producing isoprene monomer. US2015275233(A1).
177. **Mildvan AS, Xia Z, Azurmendi HF, Saraswat V, Legler PM, Massiah MA, Gabelli SB, Bianchet MA, Kang LW, Amzel LM.** Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Arch Biochem Biophys.* 2005;433(1):129-143.
178. **Miller BR, Kung Y.** Structural insight into substrate and product binding in an archaeal mevalonate kinase. *PLoS One.* 2018;13(12):e0208419.
179. **Misra I, Miziorko HM.** Evidence for the interaction of avian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase histidine 264 with acetoacetyl-CoA. *Biochemistry.* 1996;35(29):9610-9616.
180. **Misra I, Narasimhan C, Miziorko HM.** Avian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. Characterization of a recombinant cholesterogenic isozyme and demonstration of the requirement for a sulfhydryl functionality in formation of the acetyl-enzyme reaction intermediate. *J Biol Chem.* 1993;268(16):12129-12135.
181. **Misra I, Wang C.Z, Miziorko H.M.** The influence of conserved aromatic residues in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *J. Biol. Chem.* 2003;12:12.
182. **Miziorko H.** Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch biochem biophys.* 2011; 505(2): 131–143.
183. **Miziorko HM, Behnke CE.** Active-site-directed inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase by 3-chloropropionyl coenzyme A. *Biochemistry.* 1985;24(13):3174-3179.
184. **Miziorko HM, Behnke CE.** Amino acid sequence of an active site peptide of avian liver mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *J Biol Chem.* 1985;260(25):13513-13516.

185. **Miziorko HM, Clinkenbeard KD, Reed WD, Lane MD.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. Evidence for an acetyl-S-enzyme intermediate and identification of a cysteinyl sulfhydryl as the site of acetylation. *J Biol Chem.* 1975;250(15):5768-5773.
186. **Miziorko HM, Lane MD.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. Participation of acetyl-S-enzyme and enzyme-S-hydroxymethylglutaryl-SCoA intermediates in the reaction. *J Biol Chem.* 1977;252(4):1414-1420.
187. **Modis Y, Wierenga RK.** Crystallographic analysis of the reaction pathway of *Zoogloea ramigera* biosynthetic thiolase. *J Mol Biol.* 2000;297(5):1171-1182.
188. **Montalvetti A, Pena-Diaz J, Hurtado R, Ruiz-Perez L.M, Gonzales-Pacanowska D.** Characterization and regulation of *Leishmania major* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Biochem. J.* 2000;349:27-34.
189. **Morrone D, Lowry L, Determan MK, Hershey DM, Xu M, Peters RJ.** Increasing diterpene yield with a modular metabolic engineering system in *E. coli*: comparison of MEV and MEP isoprenoid precursor pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(6):1893-1906.
190. **Nagai T, Unno H, Janczak MW, Yoshimura T, Poulter CD, Hemmi H.** Covalent modification of reduced flavin mononucleotide in type-2 isopentenyl diphosphate isomerase by active-site-directed inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(51):20461-20466.
191. **Nagegowda DA, Bach TJ, Chye ML.** *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA synthase 1: expression and characterization of recombinant wild-type and mutant enzymes. *Biochem. J.* 2004;383:517-527.
192. **Nave JF, d'Orchymont H, Ducep JB, Piriou F, Jung MJ.** Mechanism of the inhibition of cholesterol biosynthesis by 6-fluoromevalonate. *Biochem J.* 1985;227(1):247-254.
193. **Ni SS, Robinson H, Marsing GC, Bussiere DE, Kennedy MA.** Structure of 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase from *Shewanella oneidensis* at 1.6 angstrom: identification of farnesyl pyrophosphate trapped in a hydrophobic cavity. *Acta Crystallogr D.* 2004; 60:1949–1957.
194. **Nishimura T, Saito T, Tomita K.** Purification and properties of beta-ketothiolase from *Zoogloea ramigera* . *Arch. Microbiol.* 1978;116:21-27.
195. **Nyati P, Rivera-Perez C, Noriega F.G.** Negative feedbacks by isoprenoids on a mevalonate kinase expressed in the *Corpora allata* of mosquitoes. *PLoS ONE* 2015;10:e0143107.
196. **Ohto C, Muramatsu M, Obata S, Sakuradani E, Shimizu S.** Prenyl alcohol production by expression of exogenous isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase genes in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73(1):186-188.
197. **Okamura E, Tomita T, Sawa R, Nishiyama M, Kuzuyama T.** Unprecedented acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase

- superfamily involved in the mevalonate pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(25):11265-11270.
198. **Olins PO, Rangwala SH.** A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1989;264(29):16973-16976.
 199. **Olson AL, Cai S, Herdendorf TJ, Miziorko HM, Sem DS.** NMR dynamics investigation of ligand-induced changes of main and side-chain arginine N-H's in human phosphomevalonate kinase. *J Am Chem Soc.* 2010;132(7):2102-2103.
 200. **Olson AL, Yao H, Herdendorf TJ, Miziorko HM, Hannongbua S, Saparpakorn P, Cai S, Sem DS.** Substrate induced structural and dynamics changes in human phosphomevalonate kinase and implications for mechanism. *Proteins*. 2009;75(1):127-138.
 201. **Ostrovsky D, Diomina G, Lysak E, Matveeva E, Ogrel O, Trutko S.** Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains. *Arch Microbiol*. 1998; 171:69–72.
 202. **Oudjama Y, Durbecq V, Sainz G, Clantin B, Tricot C, Stalon V, Villeret V, Droogmans L.** Preliminary structural studies of *Escherichia coli* isopentenyl diphosphate isomerase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2001;57(2):287-288.
 203. **Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, Leavell MD, Tai A, Main A, Eng D, Polichuk DR, Teoh KH, Reed DW, Treynor T, Lenihan J, Fleck M, Bajad S, Dang G, Dengrove D, Diola D, Dorin G, Ellens KW, Fickes S, Galazzo J, Gaucher SP, Geistlinger T, Henry R, Hepp M, Horning T, Iqbal T, Jiang H, Kizer L, Lieu B, Melis D, Moss N, Regentin R, Secrest S, Tsuruta H, Vazquez R, Westblade LF, Xu L, Yu M, Zhang Y, Zhao L, Lievense J, Covello PS, Keasling JD, Reiling KK, Renninger NS, Newman JD.** High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*. 2013;496(7446):528-532.
 204. **Pak VV, Koo M, Kim M.J, Yang H.J, Yun L, Kwon D.Y.** Modeling an active conformation for linear peptides and design of a competitive inhibitor for HMG-CoA reductase. *J. Mol. Recognit*. 2008;21:224-232.
 205. **Palmer MA, Differding E, Gamboni R, Williams SF, Peoples OP, Walsh CT, Sinskey AJ, Masamune S.** Biosynthetic thiolase from *Zoogloea ramigera*. Evidence for a mechanism involving Cys-378 as the active site base. *J Biol Chem*. 1991;266(13):8369-8375.
 206. **Patel GB, Sprott DG.** *Methanosaeta concilii* gen. nov. sp. nov. (“*Methanothrix concilii*”) and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:79-82.
 207. **Paton VG, Shackelford JE, Krisans SK.** Cloning and subcellular localization of hamster and rat isopentenyl diphosphate dimethylallyl

- diphosphate isomerase. A PTS1 motif targets the enzyme to peroxisomes. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18945-18950.
208. **Pilloff D, Dabovic K, Romanowski MJ, Bonanno JB, Doherty M, Burley SK, Leyh TS.** The kinetic mechanism of phosphomevalonate kinase. *J Biol Chem.* 2003;278(7):4510-4515.
 209. **Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, Keasling JD.** Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering.* 2007; 9: 193-207.
 210. **Pojer F, Ferrer JL, Richard SB, Nagegowda DA, Chye ML, Bach TJ, Noel JP.** Structural basis for the design of potent and species-specific inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(31):11491-11496.
 211. **Polo M, de Bravo MG, Carbone C.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A reductase activity in liver of athymic mice with or without an implanted human carcinoma. *Comp. Biochem. Physiol. B* 1999;122:433-437.
 212. **Potrykus K, Cashel M.** (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62:35–51.
 213. **Potter D, Miziorko HM.** Identification of catalytic residues in human mevalonate kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(41):25449-25454.
 214. **Potter D, Wojnar JM, Narasimhan C, Miziorko HM.** Identification and functional characterization of an active-site lysine in mevalonate kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(9):5741-5746.
 215. **Primak YA, Du M, Miller MC, Wells DH, Nielsen AT et al.** Characterization of a feed-back resistant mevalonate kinase from the archaeon *Methanosarcina mazei*. *Appl Env Microbiol.* 2011;77(21):7772-7778.
 216. **Qiu Y, Gao J, Guo F, Qiao Y, Li D.** Mutation and inhibition studies of mevalonate 5-diphosphate decarboxylase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17(22):6164-6168.
 217. **Qiu Y, Li D.** Bifunctional inhibitors of mevalonate kinase and mevalonate 5-diphosphate decarboxylase. *Org Lett.* 2006;8(6):1013-1100.
 218. **Qiu Y, Li D.** Inhibition of mevalonate 5-diphosphate decarboxylase by fluorinated substrate analogs. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(7):1080-1087.
 219. **Ramos-Valdivia AC, van der Heijden R, Verpoorte R, Camara B.** Purification and characterization of two isoforms of isopentenyl-diphosphate isomerase from elicitor-treated *Cinchona robusta* cells. *Eur. J. Biochem.* 1997;249:161-170.
 220. **Reardon JE, Abeles RH.** Inhibition of cholesterol biosynthesis by fluorinated mevalonate analogues. *Biochemistry.* 1987;26(15):4717-4722.
 221. **Redding-Johanson AM, Batth TS, Chan R, Krupa R, Szmids H, Adams PD, Petzold CJ.** Targeted proteomics for metabolic pathway optimization: Application to terpene production. *Metabolic Engineering.* 2011; 13: 194-203.

222. **Reed WD, Clinkenbeard D, Lane MD.** Molecular and catalytic properties of mitochondrial (ketogenic) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase of liver. *J Biol Chem.* 1975;250(8):3117-3123.
223. **Reiling KK, Yoshikuni Y, Martin VJ, Newman J, Bohlmann J, Keasling JD.** Mono and diterpene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 2004;87(2):200-212.
224. **Richard SB, Ferrer JL, Bowman ME, Lillo AM, Tetzlaff CN, Cane DE, Noel JP.** Structure and mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase - An enzyme in the mevalonate-independent isoprenoid biosynthetic pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277:8667–8672.
225. **Rodríguez-Villalón A, Pérez-Gil J, Rodríguez-Concepción M.** Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. *J Biotechnol.* 2008;135(1):78-84.
226. **Rohmer M, Seemann M, Horbach S, BringerMeyer S, Sahm H.** Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J Am Chem Soc* 1996;118:2564–2566.
227. **Rokosz LL, Boulton DA, Butkiewicz EA, Sanyal G, Cueto MA, Lachance PA, Hermes JD.** Human cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase: expression, purification, and characterization of recombinant wild-type and Cys129 mutant enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 1994;312(1):1-13.
228. **Romanowski MJ, Bonanno JB, Burley SK.** Crystal structure of the *Streptococcus pneumoniae* phosphomevalonate kinase, a member of the GHMP kinase superfamily. *Proteins.* 2002;47(4):568-571.
229. **Rossoni L, Hall SJ, Eastham G, Licence P, Stephens G.** The Putative mevalonate diphosphate decarboxylase from *Picrophilus torridus* is in reality a mevalonate-3-kinase with high potential for bioproduction of isobutene. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(7):2625-2634.
230. **Rothman SC, Johnston JB, Lee S, Walker JR, Poulter CD.** Type II isopentenyl diphosphate isomerase: irreversible inactivation by covalent modification of flavin. *J Am Chem Soc.* 2008;130(14):4906-4913.
231. **Rude MA, Schirmer A.** New microbial fuels: a biotech perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12(3):274-281.
232. **Sagami H, Ogura K.** Multiple forms of isopentenyl pyrophosphate isomerase of avian liver. *J. Biochem.* 1983;94:975-979.
233. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406-425.
234. **Sakai S, Imachi H, Hanada S, Ohashi A, Harada H et al.** *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58(4): 929-936.

235. **Sakai S, Takaki Y, Shimamura S, Sekine M, Tajima T et al.** Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the order *Methanocellales*. *PLoS One*. 2011;6(7):e22898.
236. **Sambrook J, Russell D.W.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor* 2001; 1: 84-87, 116-118.
237. **Sauret-Güeto S, Ramos-Valdivia A, Ibáñez E, Boronat A, Rodríguez-Concepción M.** Identification of lethal mutations in *Escherichia coli* genes encoding enzymes of the methylerythritol phosphate pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307(2):408-415.
238. **Schafer BL, Bishop RW, Kratunis VJ, Kalinowski SS, Mosley ST, Gibson KM, Tanaka RD.** Molecular cloning of human mevalonate kinase and identification of a missense mutation in the genetic disease mevalonic aciduria. *J Biol Chem*. 1992;267(19):13229-13238.
239. **Shafqat N, Turnbull A, Zschocke J, Oppermann U, Yue WW.** Crystal structures of human HMG-CoA synthase isoforms provide insights into inherited ketogenesis disorders and inhibitor design. *J Mol Biol*. 2010;398(4):497-506.
240. **Schneiders MS, Houten SM, Turkenburg M, Wanders RJ, Waterham HR.** Manipulation of isoprenoid biosynthesis as a possible therapeutic option in mevalonate kinase deficiency. *Arthritis Rheum*. 2006;54(7):2306-2313.
241. **Schulte A.E, van der Heijden R, Verpoorte R.** Purification and characterization of mevalonate kinase from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Arch. Biochem. Biophys*. 2000;378:287-298.
242. **Schulte A.E, Van der Heijden R, Verpoorte R.** Purification and characterization of phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 52, 975-983 (1999)
243. **Schüte H, Flossdorf J, Sahm H, Kula MR.** Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur J Biochem*. 1976;62(1):151-160.
244. **Schwabe D, Huth W.** Immunochemical aspects, molecular and kinetic properties of multiple forms of acetyl-CoA acetyltransferase from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. 1979;575:112-120.
245. **Schwarz BH, Driver J, Peacock RB, Dembinski HE, Corson MH, Gordon SS, Watson JM.** Kinetic characterization of an oxidative, cooperative HMG-CoA reductase from *Burkholderia cenocepacia*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1844:457-464.
246. **Sen SE, Tomasello A, Grasso M, Denton R, Macor J, Beliveau C, Cusson M, Crowell DN.** Cloning, expression and characterization of lepidopteran isopentenyl diphosphate isomerase. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 2012;42:739-750.

247. **Sgraja T, Smith TK, Hunter WN.** Structure, substrate recognition and reactivity of *Leishmania major* mevalonate kinase. *BMC Struct Biol.* 2007;7:20.
248. **Shen HJ, Cheng BY, Zhang YM, Tang L, Li Z, Bu YF, Li XR, Tian GQ, Liu JZ.** Dynamic control of the mevalonate pathway expression for improved zeaxanthin production in *Escherichia coli* and comparative proteome analysis. *Metab Eng.* 2016;38:180-190.
249. **Shewry PR, Stobart AK.** Properties of castor bean mevalonic acid kinase. *Plant Sci. Lett.* 1973;1:473-477.
250. **Sipat AP.** Hydroxymethylglutaryl CoA reductase (NADPH) in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry.* 1982;21:2613-2618.
251. **Sivy TL, Fall R, Rosenstiel TN.** Evidence of isoprenoid precursor toxicity in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(12):2376-2383.
252. **Skilleter DN, Kekwick RG.** The enzymes forming isopentenyl pyrophosphate from 5-phosphomevalonate (mevalonate 5-phosphate) in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Biochem J.* 1971;124(2):407-417.
253. **Smit A, Mushegian A.** Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in Archaea: the lost pathway. *Genome Res* 2000;10(10):1468-1484.
254. **Smit A, Mushegian A.** Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in Archaea: the lost pathway. *Genome Res.* 2000;10(10):1468-1484.
255. **Soto G, Stritzler M, Lisi C, Alleva K, Pagano ME, Ardila F, Mozzicafreddo M, Cuccioloni M, Angeletti M, Ayub ND.** Acetoacetyl-CoA thiolase regulates the mevalonate pathway during abiotic stress adaptation. *J Exp Bot.* 2011;62(15):5699-711.
256. **Steussy CN, Robison AD, Tetrack AM, Knight JT, Rodwell VW, Stauffacher CV, Sutherlin AL.** A structural limitation on enzyme activity: the case of HMG-CoA synthase. *Biochemistry.* 2006;45(48):14407-14414.
257. **Steussy CN, Vartia AA, Burgner JW 2nd, Sutherlin A, Rodwell VW, Stauffacher CV.** X-ray crystal structures of HMG-CoA synthase from *Enterococcus faecalis* and a complex with its second substrate/inhibitor acetoacetyl-CoA. *Biochemistry.* 2005;44(43):14256-14267.
258. **Studier FW, Moffatt B.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986;189:113-130.
259. **Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W.** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 1990;185:60-89.
260. **Suarez D, Garcia-Peregrin E, Mayor F.** Mevalonate kinase from *Pinus pinaster* seedlings. *Phytochemistry.* 1974;13:1059-1063.

261. **Suarez D, Garcia-Peregrin E.** Properties and partial purification of mevalonate kinase from *Agave Americana*. *Phytochemistry*. 1977;16:661-665.
262. **Sun Z, Cunningham FX Jr, Gantt E.** Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(19):11482-11488.
263. **Sutherlin A, Hedl M, Sanchez-Neri B, Burgner JW 2nd, Stauffacher CV, Rodwell VW.** Enterococcus faecalis 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, an enzyme of isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J Bacteriol*. 2002;184(15):4065-4070.
264. **Suzuki F, Zahler WL, Emerich DW.** Acetoacetyl-CoA thiolase of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids: purification and properties; *Arch. Biochem. Biophys*. 1987;254:272-281.
265. **Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D et al.** STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:447-452.
266. **Tabernero L, Bochar DA, Rodwell VW, Stauffacher CV.** Substrate-induced closure of the flap domain in the ternary complex structures provides insights into the mechanism of catalysis by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7167-7171.
267. **Tabernero L, Rodwell VW, Stauffacher CV.** Crystal structure of a statin bound to a class II hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem*. 2003;278(22):19933-19938.
268. **Tajima Y, Nishio Y, Katashkina JY, Bylino OV.** Method of producing isoprene compound. 2016. WO2016084963(A1).
269. **Takumi K, Ziyatdinov MK, Samsonov V, Nonaka G.** Fermentative Production of Cysteine by *Pantoea ananatis*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2017; 83(5).
270. **Takahashi S, Kuzuyama T, Seto H.** Purification, characterization, and cloning of a eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a key enzyme involved in biosynthesis of terpenoids. *J. Bacteriol*. 1999;181:1256-1263.
271. **Tanaka RD, Lee LY, Schafer BL, Kratunis VJ, Mohler WA, Robinson GW, Mosley ST.** Molecular cloning of mevalonate kinase and regulation of its mRNA levels in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(8):2872-2876.
272. **Tchen TT.** Mevalonic kinase: purification and properties. *J Biol Chem*. 1958;233(5):1100-1103
273. **Theisen MJ, Misra I, Saadat D, Campobasso N, Miziorko HM, Harrison DH.** 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase intermediate

- complex observed in "real-time". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 ;101(47):16442-16447.
274. **Thibodeaux CJ, Chang WC, Liu HW.** Linear free energy relationships demonstrate a catalytic role for the flavin mononucleotide coenzyme of the type II isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *J Am Chem Soc*. 2010;132(29):9994-9996.
 275. **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25(24):4876-4882.
 276. **Thompson S, Mayerl F, Peoples OP, Masamune S, Sinskey AJ, Walsh CT** Mechanistic studies on beta-ketoacyl thiolase from *Zoogloea ramigera*: identification of the active-site nucleophile as Cys89, its mutation to Ser89, and kinetic and thermodynamic characterization of wild-type and mutant enzymes. *Biochemistry*. 1989 ;28(14):5735-5742.
 277. **Toth MJ, Huwyler L.** Molecular cloning and expression of the cDNAs encoding human and yeast mevalonate pyrophosphate decarboxylase. *J Biol Chem*. 1996;271(14):7895-8789.
 278. **Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, Lenihan JR, Horning T, Anthony LC, Regentin R, Keasling JD, Renninger NS, Newman JD.** High-level production of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2009;4(2):e4489.
 279. **Unno H, Yamashita S, Ikeda Y, Sekiguchi SY, Yoshida N, Yoshimura T, Kusunoki M, Nakayama T, Nishino T, Hemmi H.** New role of flavin as a general acid-base catalyst with no redox function in type 2 isopentenyl-diphosphate isomerase. *J Biol Chem*. 2009;284(14):9160-9167.
 280. **Vadali RV, Fu Y, Bennett GN, San KY.** Enhanced lycopene productivity by manipulation of carbon flow to isopentenyl diphosphate in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*. 2005;21(5):1558-1561.
 281. **Vannice J C, Skaff D A, Keightley A, Addo J K, Wyckoff G J.** Identification in *Haloferax volcanii* of phosphomevalonate decarboxylase and isopentenyl phosphate kinase as catalysts of the terminal enzymatic reactions in an archaeal alternate mevalonate pathway. *J Bacteriol*. 2014;196:1055–1063.
 282. **VanNice JC, Skaff DA, Wyckoff GJ, Miziorko HM.** Expression in *Haloferax volcanii* of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase facilitates isolation and characterization of the active form of a key enzyme required for polyisoprenoid cell membrane biosynthesis in halophilic archaea. *J. Bacteriol*. 2013;195:3854-3862.
 283. **Vickers CE, Bongers M, Liu Q, Delatte T, Bouwmeester H.** Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. *Plant Cell Environ*. 2014;37(8):1753-1775.
 284. **Vinokur JM, Korman TP, Cao Z, Bowie JU.** Evidence of a novel mevalonate pathway in archaea. *Biochemistry*. 2014;53(25):4161-4168.

285. **Vinokur JM, Korman TP, Sawaya MR, Collazo M, Cascio D, Bowie JU.** Structural analysis of mevalonate-3-kinase provides insight into the mechanisms of isoprenoid pathway decarboxylases. *Protein Sci.* 2015;24(2):212-220.
286. **Vishwakarma R, Rub R, Singh S, Sonawane P, Srivastava S, Kumari U, Santosh Kumar R, Khan B.** Molecular cloning, biochemical characterization, and differential expression of an acetyl-CoA C-acetyltransferase gene (AACT) of Brahmi (*Bacopa monniera*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 2013;31:547-557.
287. **Voynova NE, Rios SE, Miziorko HM.** *Staphylococcus aureus* mevalonate kinase: isolation and characterization of an enzyme of the isoprenoid biosynthetic pathway. *J Bacteriol.* 2004;186(1):61-67.
288. **Voynova NE, Fu Z, Battaile KP, Herdendorf TJ, Kim JJ, Miziorko HM.** Human mevalonate diphosphate decarboxylase: characterization, investigation of the mevalonate diphosphate binding site, and crystal structure. *Arch Biochem Biophys.* 2008 ;480(1):58-67.
289. **Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, Urakawa H, Pinel N et al.,** *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(19):8818-8823.
290. **Wang CZ, Misra I, Miziorko HM.** Utility of acetyldithio-CoA in detecting the influence of active site residues on substrate enolization by 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA synthase. *J Biol Chem.* 2004;279(39):40283-40288. **Weerasinghe S, Dassanayake R.** Simulation of structural and functional properties of mevalonate diphosphate decarboxylase (MVD). *J Mol Model.* 2010;16(3):489-498.
291. **Welte C, Deppenmeier U.** Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetylastic methanogens. *Biochemica et Biophysica Acta.* 2014;1837:1130-1147.
292. **Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, Eng D, Woollard FX, Regentin R, Horning T, Tsuruta H, Melis DJ, Owens A, Fickes S, Diola D, Benjamin KR, Keasling JD, Leavell MD, McPhee DJ, Renninger NS, Newman JD, Paddon CJ.** Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(3):E111-118.
293. **White SW, Zheng J, Zhang YM, Rock.** The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:791-831.
294. **Wiesenborn DP, Rudolph FB, Papoutsakis ET.** Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents *Appl. Environ. Microbiol.* 1988;54:2717-2722.
295. **Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, Iordanescu S, So CY, Rosenberg M, Gwynn MN.** Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl

- diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *J Bacteriol.* 2000;182(15):4319-4327.
296. **Wilding EI, Kim DY, Bryant AP, Gwynn MN, Lunsford RD, McDevitt D, Myers JE Jr, Rosenberg M, Sylvester D, Stauffacher CV, Rodwell VW.** Essentiality, expression, and characterization of the class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2000;182(18):5147-5152.
 297. **Williamson IP, Kekwick RGO.** The formation of 5-phosphomevalonate by mevalonate kinase in *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem. J.* 1965;96:862-871.
 298. **Withers ST, Gottlieb SS, Lieu B, Newman JD, Keasling JD.** Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(19):6277-6283.
 299. **Whited GM, Feher F, Benko DA, Sanford K.** TECHNOLOGY UPDATE: Development of a gas-phase bioprocess for isoprene-monomer production using metabolic pathway engineering. *Industrial Biotechnology.* 2010; 6(3):152-163.
 300. **Wouters J, Oudjama Y, Barkley SJ, Tricot C, Stalon V, Droogmans L, Poulter CD.** Catalytic mechanism of *Escherichia coli* isopentenyl diphosphate isomerase involves Cys-67, Glu-116, and Tyr-104 as suggested by crystal structures of complexes with transition state analogues and irreversible inhibitors. *J Biol Chem.* 2003;278(14):11903-1198.
 301. **Wouters J, Oudjama Y, Stalon V, Droogmans L, Poulter CD.** Crystal structure of the C67A mutant of isopentenyl diphosphate isomerase complexed with a mechanism-based irreversible inhibitor. *Proteins.* 2004;54(2):216-221.
 302. **Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R, Chappell.** Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *J.Nat Biotechnol.* 2006;24(11):1441-1447.
 303. **Yan GL, Wen KR, Duan CQ.** Enhancement of β -carotene production by over-expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol.* 2012;64(2):159-163.
 304. **Yang C, Gao X, Jiang Y, Sun B, Gao F, Yang S.** Synergy between methylerythritol phosphate pathway and mevalonate pathway for isoprene production in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2016;37:79-91.
 305. **Yang D, Shipman LW, Roessner CA, Scott AI, Sacchettini JC.** Structure of the *Methanococcus jannaschii* mevalonate kinase, a member of the GHMP kinase superfamily. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9462-9467.
 306. **Yoon SH, Kim JE, Lee SH, Park HM, Choi MS, Kim JY, Lee SH, Shin YC, Keasling JD, Kim SW.** Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea*

- agglomerans* and *Pantoea ananatis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;74(1):131-139.
307. **Yoon SH, Lee SH, Das A, Ryu HK, Jang HJ, Kim JY, Oh DK, Keasling JD, Kim SW.** Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of beta-carotene in *E. coli*. *J Biotechnol*. 2009;140(3-4):218-226.
 308. **Young NL, Saudek CD, Crawford SA, Zuckerbrod SL.** Recovery and activation from hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase from rat small intestine. *J. Lipid Res*. 1982;23:257-265.
 309. **Yuan LZ, Rouvière PE, Larossa RA, Suh W.** Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab Eng*. 2006;8(1):79-90.
 310. **Zehnder AJ, Huser BA, Brock TD, Wuhrmann K.** Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch Microbiol*. 1980;124(1):1-11.
 311. **Zhang C, Liu L, Xu H, Wei Z, Wang Y, Lin Y, Gong W.** Crystal structures of human IPP isomerase: new insights into the catalytic mechanism. *J Mol Biol*. 2007;366(5):1437-1446.
 312. **Zhao Y, Yang J, Qin B, Li Y, Sun Y, Su S, Xian M.** Biosynthesis of isoprene in *Escherichia coli* via methylerythritol phosphate (MEP) pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(6):1915-1922.
 313. **Zheng W, Sun F, Bartlam M, Li X, Li R, Rao Z.** The crystal structure of human isopentenyl diphosphate isomerase at 1.7 Å resolution reveals its catalytic mechanism in isoprenoid biosynthesis. *J Mol Biol*. 2007;366(5):1447-1458.
 314. **Zurbriggen A., Kirst H., Melis A.** Isoprene production via the mevalonic acid pathway in *Escherichia coli* (Bacteria). *Bioenerg. Res*. 2012

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит за плодотворную совместную работу Dr. Y. Nishio, Dr. Y. Tajima, Mr. H. Rachi, Ms. Y. Yamamoto и техническую поддержку Y. Kashima, T. Oki, к.б.н. А.Д. Киверо. Автор признателен также за оказание практической помощи на этапе выполнения данной работы, поддержку и дружескую атмосферу к.б.н. И.Г. Андреевой, к.б.н. Д.С. Стрельцовой, к.б.н. П.М. Соколову и мр. О.А. Былино. Также автор выражает глубокую благодарность д.б.н., профессору Лившицу В.А. и Dr. Y. Uehara за решение организационных вопросов.

Автор искренне признателен д.б.н., профессору Машко С.В. за доброе отношение и постоянную поддержку при выполнении данной работы. Автор благодарит к.б.н. Смирнова С. В. и к.б.н. Кирюхина М. Ю. за плодотворные дискуссии и чуткое руководство.

Особенную благодарность за наставничество и неоценимую поддержку в подготовке диссертации хочу выразить своему научному руководителю к.б.н., Ж.И. Каташкиной.

.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Фермент	Организм	1/c	K _m (мМ)	Комментарий	Литература	
Ацетоацетил-СоА тиаза	<i>H. sapiens</i>		0.25	pH 7.0, 25°C	(Kiema et al., 2014)	
	<i>R. norvegicus</i>		0.0062		(Huth et al., 1974)	
			0.03	isoenzyme A, 3.5 мМ NH4+	(Schwabe et al., 1979)	
	<i>Gallus gallus</i>		0.27	-	(Clinkenbeard et al., 1975) ¹	
	<i>Bos taurus</i>		0.091	pH 7.2	(Huth et al., 1975)	
	<i>Bacopa monnieri</i>		0.0258	pH 8.9, 25°C	(Vishwakarma et al., 2013)	
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		0.104	-	(Suzuki et al., 1987)	
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>		0.27	pH 7.4, 30°C	(Wiesenborn et al., 1988)	
	<i>Zoogloea ramigera</i>	2,1	0.33	-	(Nishimura et al., 1978)	
	<i>Rhizobium sp.</i>		0.38	from bacteroids	(Kim et al., 1997)	
			1.06	synthesis		
	<i>Escherichia coli</i>		0.47	pH 7.8	(Duncombe et al., 1976)	
	<i>E. faecalis</i>		0.6	pH 9.5	(Hedl et al., 2002)	
<i>Candida tropicalis</i>		0.69	pH 8.3 recombinant	(Kanayama et al., 1997)		
Гидрокси-3-метилглутарил-КоА синтаза	<i>Gallus gallus</i>		0.00035	liver	(Menahan et al., 1981)	
			0.005		(Reed et al., 1975)	
				0.012	recombinant	(Misra et al., 2003)
	<i>S. cerevisiae</i>		0.0004	pH 8.0	(Middleton et al., 1972)	
			0.0032	pH 8.9		
	<i>Haloferax volcanii</i>		0.0014	pH 8.0, 30°C	(VanNice et al., 2013)	
	<i>Brassica juncea</i>		0.043	pH 7.5, 30°C	(Nagegowda et al., 2004)	
<i>E. faecalis</i>		0.01	-	(Sutherlin et al., 2002)		
Гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктаза	<i>H. sapiens</i>	0,023	0.07	-	(Carbonell et al., 2005)	
	<i>R. norvegicus</i>		0.004	-	(Young et al., 1982)	
			0.068	-	(Pak et al., 2008)	
	<i>Mus musculus</i>		0.028	-	(Polo et al., 1999)	
	<i>Schistosoma mansoni</i>		0.003	-	(Chen et al., 1991)	
	<i>Trypanosoma cruzi</i>		0.013	pH 6.8, 25°C	(Hurtado-Guerrero et al., 2002)	
			0.028	-	(Rodríguez-Concepcion et al., 1998)	
	<i>Leishmania donovani</i>		0.0357	pH 7.2, 37°C	(Dinesh et al., 2014)	
	<i>Leishmania major</i>		0.04	-	(Montalvetti et al., 2000)	
	<i>H. brasiliensis</i>		0.056	-	(Sipat et al., 1982)	
	<i>Haloferax volcanii</i>		0.06	-	(Bischoff et al., 1996, 1997)	
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>		0.017	pH 5.5, 50°C	(Bochar et al., 1997)	
			0.045		(Kim et al., 2000)	
	<i>E. faecalis</i>		0.02	pH 6.5, 37°C	(Held et al, 2002)	
	<i>Streptomyces sp.</i>		0.008	-	(Takahashi et al., 1999)	
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>		0.078	-	(Schwarz et al., 2014)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>		0.021	-	(Madhosingh et al., 1978)	
	Мевалонаткина-за	<i>H. sapiens</i>		0.15	pH 7.0, 30°C	(Hinson et al., 1997)
				0.041	pH 7.5, 30°C	(Fu et al., 2008)
<i>Sus scrofa</i>			0.019	pig liver	(Houten et al., 2000)	
			0.069	recombinant		
<i>R. norvegicus</i>			0.27	liver	(Chu et al., 2003, 2007)	
		21,9	0.035	pH 7.5, 25°C,		
			0.288	pH 7, 30°C		(Potter et al., 1997)

	<i>O. cuniculus</i>		5.1	pH 7.0, 35°C	(Markley et al., 1961)
	<i>Agave americana</i>		0.05	pH 7.9, 37°C	(Suarez et al., 1977)
	<i>N. bullata</i>		0.62	-	(Goodfellow et al., 1971)
	<i>Aedes aegypti</i>		0.09	pH 7.5	(Nyati et al., 2015)
	<i>Bacopa monnieri</i>	143,8	0.332	pH 7.0, 30°C	(Kumari et al., 2015)
	<i>C. roseus</i>		0.076	pH 7.5, 30°C	(Schulte et al., 2000)
	<i>R. communis</i>		1.92	-	(Shewry et al., 1973)
	<i>Pinus pinaster</i>		0.08	pH 7.9, 37°C	(Suarez et al., 1974)
	<i>H. brasiliensis</i>		0.13	pH 7.5, 30°C	(Williamson et al., 1965)
	<i>P. vulgaris</i>		0.046	pH 7.0, 30°C	(Gray et al., 1973)
	<i>M. janaschii</i>	28,5	0.11	pH 7.5, 34°C	(Chu et al, 2007, 2003)
			0.069		(Houten et al, 2000)
	<i>M. mazei</i>	4,3	0.068	pH 7.6, 30°C, (R)-mevalonate	(Primak et al., 2011)
	<i>S. cerevisiae</i>		0.131		
	<i>S. pneumoniae</i>		0.236		
	<i>E. faecalis</i>		0.33	pH 10, 37°C	(Hedl et al., 2004)
	<i>S. aureus</i>		0.041	pH 7.5, 30°C	(Voynova et al., 2004)
Фосфомевалонаткиназа	<i>H. sapiens</i>		0.034	pH 7.0, 30°C	(Herdendorf et al., 2006; 2007)
	<i>Sus scrofa</i>		0.012	pH 7.5, 30°C	(Eyzaguirre et al., 2006)
		10,2	0.0082		(Bazaes et al., 1980(1))
			0.075		(Bazaes et al., 1980(2))
	<i>C. roseus</i>		0.35	pH 7.5, 30°C	(Schulte et al., 1999)
	<i>H. brasiliensis</i>		0.042	pH 7.2, 30°C	(Skilleter et al., 1971)
	<i>S. cerevisiae</i>		0.88	pH 7.2, 37°C	(Garcia et al., 2014)
			0.885	pH 7.2, 30°C	
Мевалонат 5-дифосфат-декарбоксилаза	<i>E. faecalis</i>		0.19		(Doun et al., 2005)
	<i>S. pneumoniae</i>		0.0042	pH 7, 25°C	(Pilloff et al., 2003)
	<i>H. sapiens</i>	4,5	0.0289	30°C	(Voynova et al., 2008)
	<i>Sus scrofa</i>		12.5	-	(Chiew et al., 1987)
	<i>R. norvegicus</i>		0.036	-	(Qiu et al., 2006; 2007)
			0.02	-	(Toth 1996)
			0.027	-	(Michihara et al., 1997)
			0.02	-	
	<i>Gallus gallus</i>		0.0141	-	(Alvear et al., 1982; Cardemil et al., 1985)
	<i>Mus musculus</i>		0.01	pH 7.2, 30°C	(Michihara et al., 2002)
Изопентилфосфат-изомераза	<i>S. cerevisiae</i>	4,9	0.123	pH 7.0, 30°C	(Krepkiy et al., 2004; 2005)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5,9	0.0091	pH 7.0, 30°C	(Barta et al., 2011)
	<i>S. pneumoniae</i>	5,6	0.0012	-	(Lefurgy et al., 2010)
	<i>Cinchona robusta</i>		0.001	isomerase II	(Ramos-Valdivia et al., 1997)
			0.0051	isomerase I	
	<i>Gallus gallus</i>		0.0013-0.0025	-	(Sagami et al., 1983)
	<i>Choristoneura fumiferana</i>		0.0033	pH 7.0, at 37°C	(Sen et al., 2012)
	<i>Escherichia coli</i>		0.0035	-	(Durbecq et al., 2001)
	<i>Sus scrofa</i>		0.004	pig liver	(Holloway et al., 1972)
	<i>S. aureus</i>	0.065	0.0048	NADPH, FMN, pH 7.0, 37°C, aerobic	(Kittleman et al., 2007)
		0.69	0.0168	anaerobic	
	<i>Sulfolobus shibatae</i>	29900	0,0074	NADPH, FMN, pH 6.0, 60°C	(Nagai et al., 2011)
	<i>Thermus thermophilus</i>	17.9	0.0056	NADPH, FMN pH 7.0, 37°C	(Rothman et al., 2007)
	<i>M. janaschii</i>	191	15.3	NADPH, FMN pH 7.0, 85°C	(Hoshino et al., 2006)

	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	1.6	0.064	NADPH, FMN	(Barkley et al., 2004)
--	---	-----	-------	------------	------------------------