

Научно-практическая конференция с международным участием
«Редактирование генома: теория и практика»



Практические аспекты редактирования геномов промышленно значимых микроорганизмов

Н.В. Стойнова
АО НИИ Аджиномото-Генетика (АГРИ)

21 ноября 2023 г

Предыстория

Стэнли Коэн и Герберт Бойер (1973) впервые продемонстрировали возможность введения в бактериальную клетку искусственно сконструированной чужеродной ДНК

Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70(11):3240–44

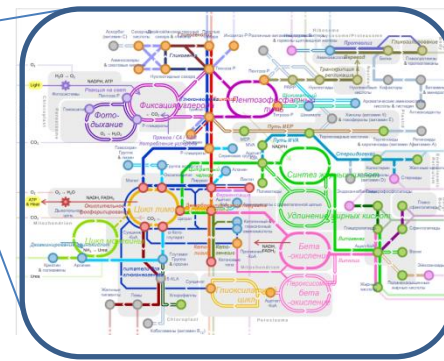


инсулин
соматотропин

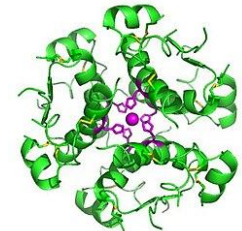
Robert A. Swanson
Herbert Boyer

1976 (0) – нв (> 1000), с 2009 г как часть (>46 млрд \$) Hoffmann-La Roche

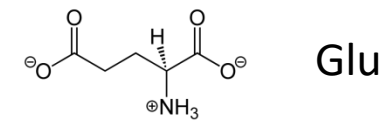
80-е годы: бурное развитие технологий рекомбинантных ДНК



VS

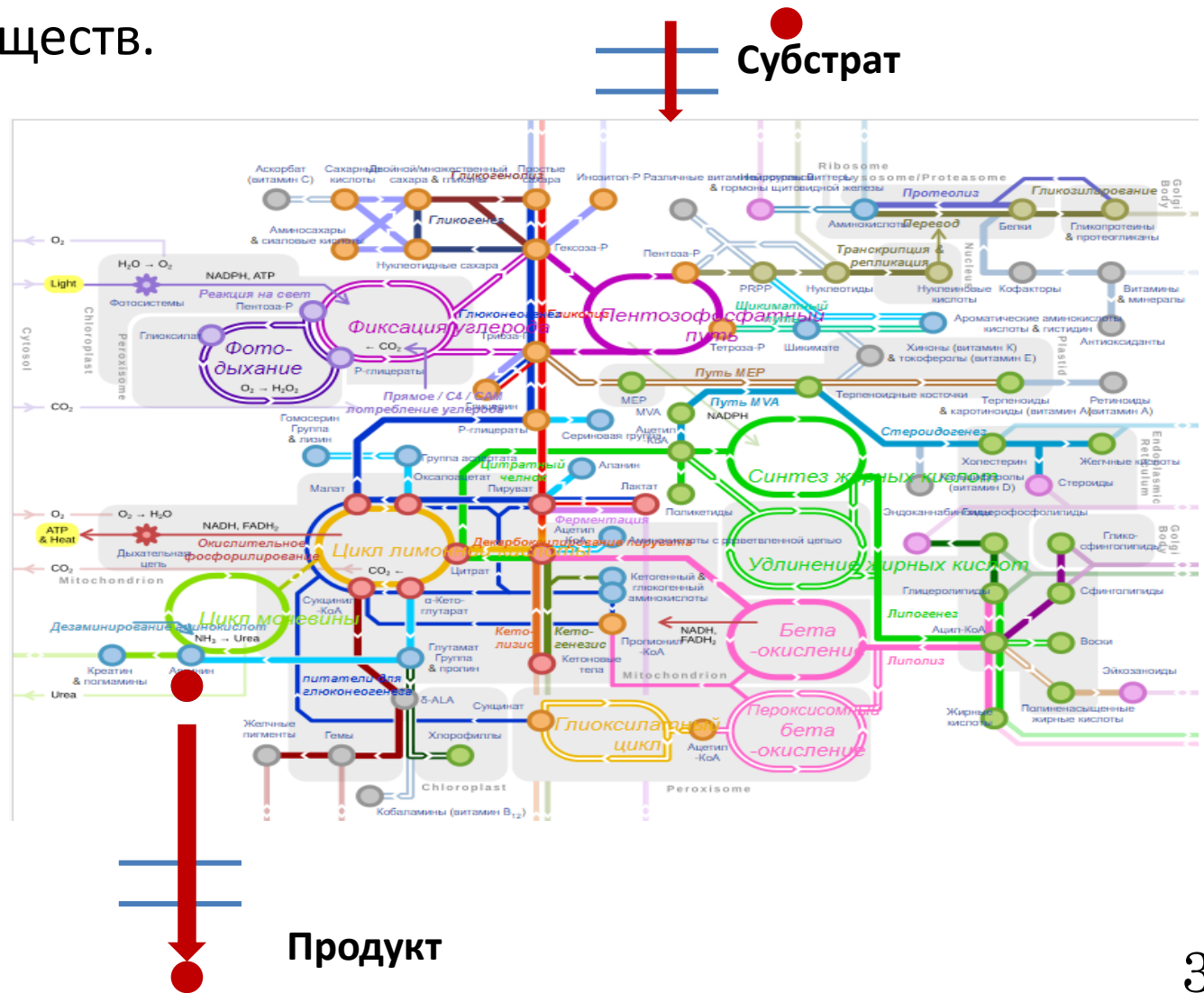


Инсулин человека



Сверхпродукция низкомолекулярного метаболита требует координированного изменения уровня синтеза в клетке целого ряда белков.

Систематическое накопление знаний о клеточном метаболизме как совокупности биохимических реакций (термодинамических, кинетических характеристиках, регуляторных элементах и т.д.) открывало возможности для микробного синтеза самых разнообразных веществ.



Некоторые общеупотребительные базы данных, где собирается и хранится информация о метаболических путях клеток разных организмов и составляющих эти пути биохимических реакциях, ферментах и их свойствах:

[The BioCyc database \(biocyc.org\)](https://biocyc.org) collection is an assortment of organism specific Pathway/Genome Databases (PGDBs) that provide reference to genome and metabolic pathway information for thousands of organisms. As of June 2021, there were over 17,800 databases within BioCyc. SRI International, based in Menlo Park, California, maintains the BioCyc database family.

[BRENDA \(The Comprehensive Enzyme Information System\)](https://www.brenda-enzymes.org/) is an [information system](https://www.brenda-enzymes.org/) representing one of the most comprehensive enzyme repositories. It is an electronic resource that comprises molecular and biochemical information information on enzymes. BRENDA contains enzyme-specific data manually extracted from primary scientific literature and additional data derived from automatic information retrieval methods such as text mining. 8300 [EC numbers](https://www.brenda-enzymes.org/), 260,000 enzyme ligands, four text-mining repositories FRENDA (Full Reference ENzyme DATA), AMENDA (Automatic Mining of ENzyme DATA), DRENDA (Disease-Related ENzyme information DATABASE) and KENDA (Kinetic ENzyme DATA) were introduced. <http://www.brenda-enzymes.org/>

Системный взгляд на метаболические пути и подходы к их оптимальному функционированию с целью создания производственных процессов для микробного синтеза целевых веществ.

Что же такое метаболическая инженерия?

Greg Stephanopoulos (MIT):

Metabolic engineering is the directed improvement of product formation or cellular properties through the modification of specific biochemical reactions or introduction of new ones with the use of recombinant DNA technology.

Stephanopoulos G., Vallino J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. Science, 1991, 252 (5013):1668-75

Stephanopoulos G., Aristodou A., Nielsen J. 1998. Metabolic engineering: Principles and Methodologies.

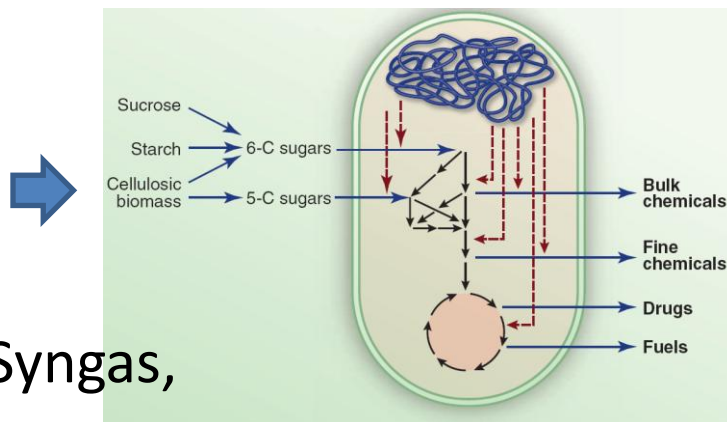
Jay Bailey (CalTech):

Metabolic engineering is the improvement of cellular activities by manipulation of enzymatic, transport, and regulatory functions of the cell with the use of recombinant DNA technology.

J. Bailey. Toward a science of metabolic engineering. Science. 1991 Jun 21;252(5013):1668-75.

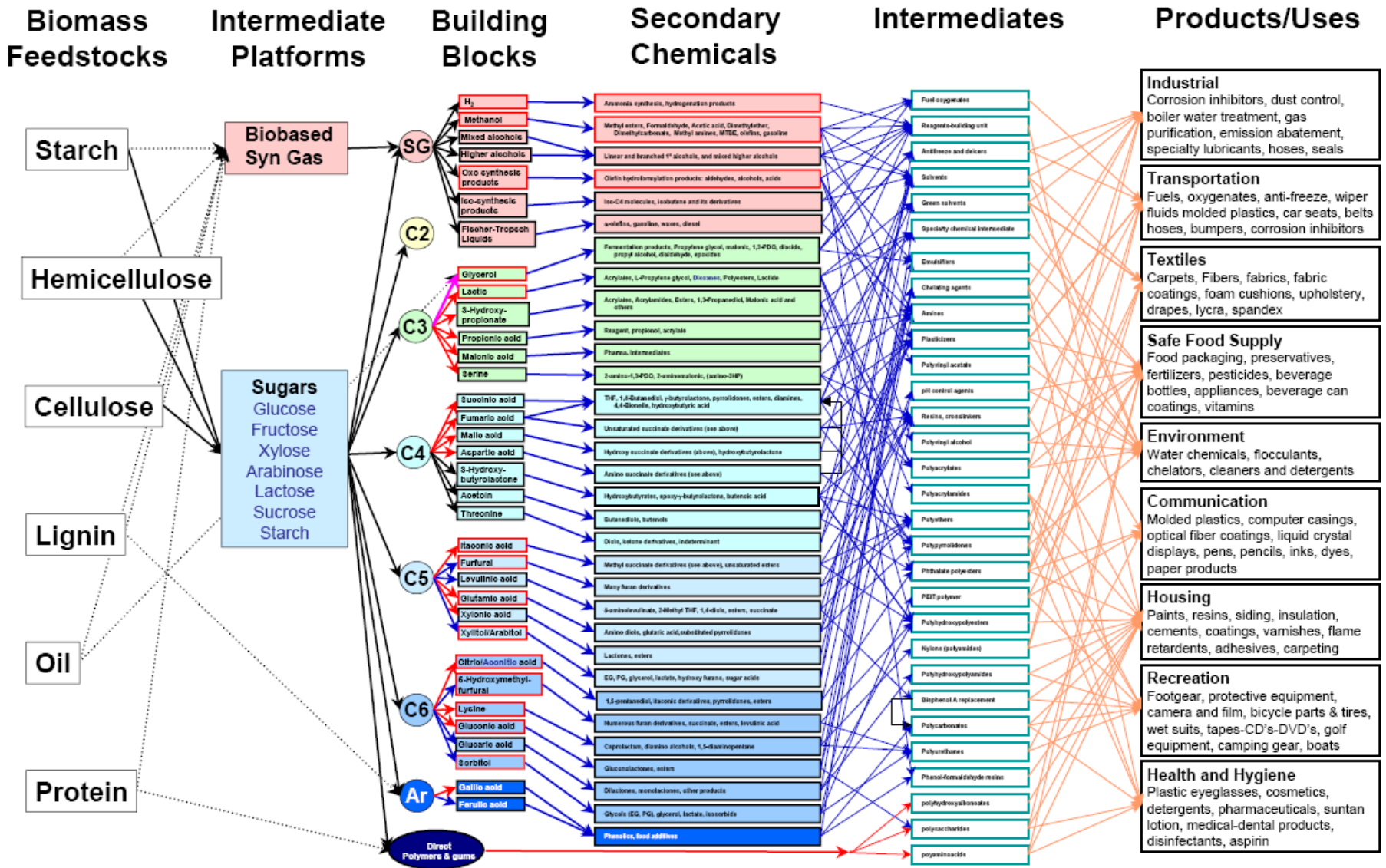
«Метаболическая инженерия – это направленное улучшение процесса биосинтеза практически важного целевого продукта и свойств метаболизма организма как целостной системы путем модификации специфических биохимических реакций и их регуляции или создания новых метаболических путей с использованием технологии рекомбинантных ДНК и других молекулярно-биологических и биохимических методов».

C6 and C12 sugars,
Lignocellulose
Biomass,
Glycerine,
C1 – CO₂, Methane, Syngas,
Methanol, etc

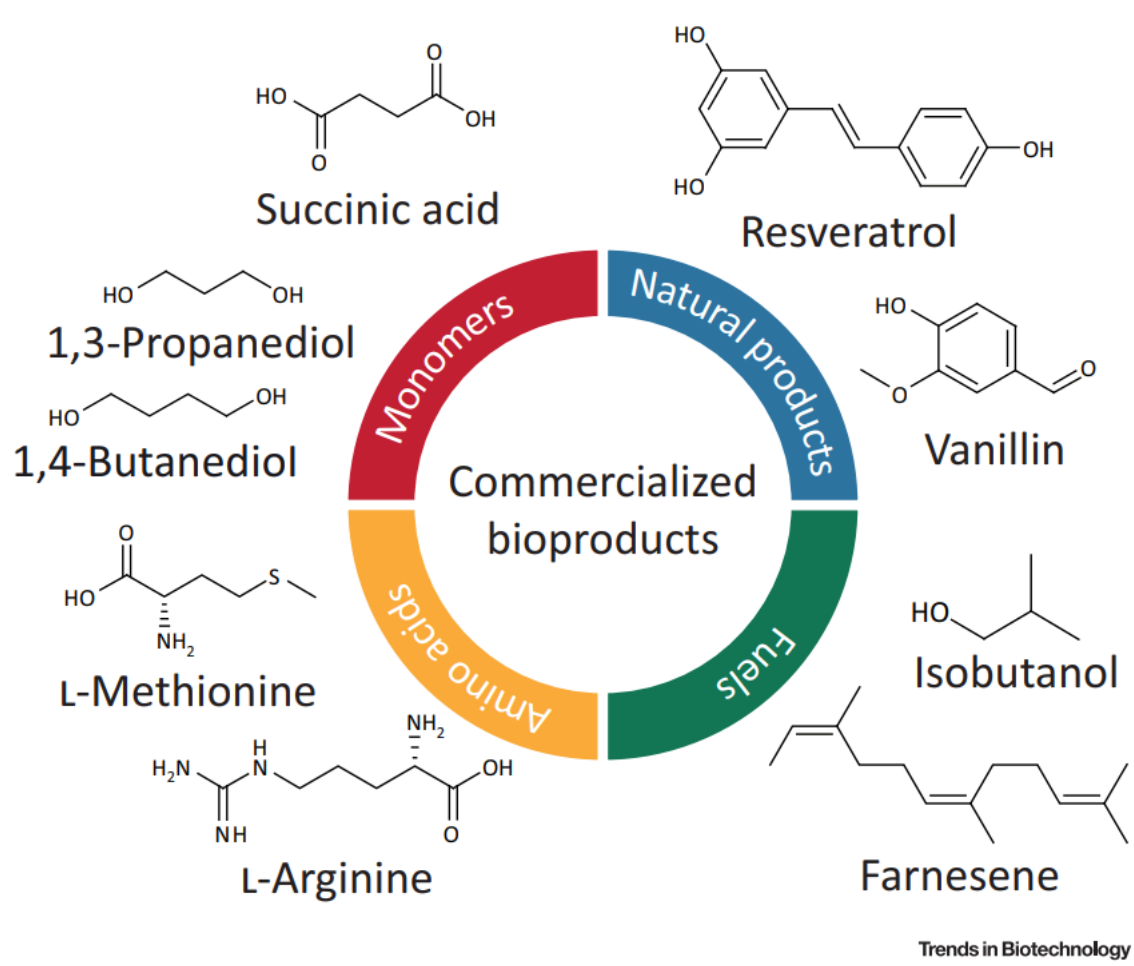


Bulk chemicals
Fine chemicals
Biofuel

Метаболическая инженерия – что она может?

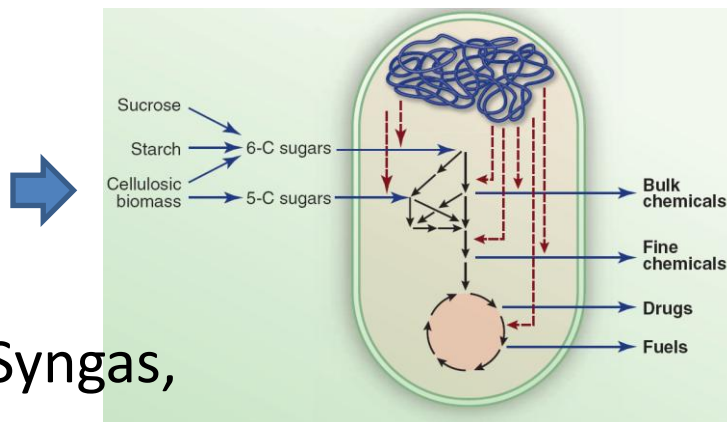


Наиболее значимые примеры биопродуктов, внедренных в промышленное производство в мире



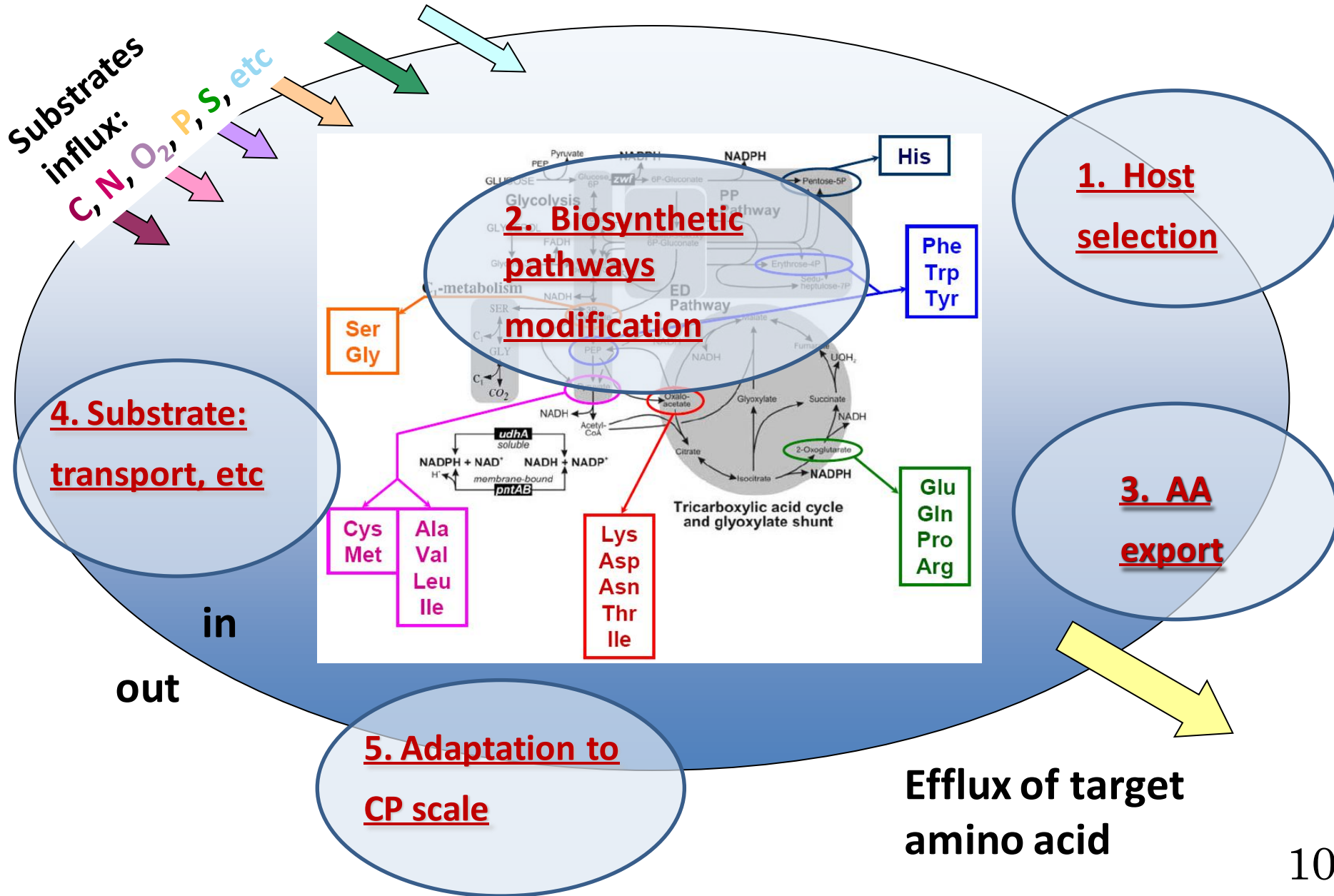
«Метаболическая инженерия – это направленное улучшение процесса биосинтеза практически важного целевого продукта и свойств метаболизма организма как целостной системы путем модификации специфических биохимических реакций и их регуляции или создания новых метаболических путей с использованием технологии рекомбинантных ДНК и других молекулярно-биологических и биохимических методов».

C6 and C12 sugars,
Lignocellulose
Biomass,
Glycerine,
C1 – CO₂, Methane, Syngas,
Methanol, etc



Bulk chemicals
Fine chemicals
Biofuel

Some aspects of amino acid-producing strains breeding



Что нам будет необходимо для реализации процесса микробного синтеза?

1. Развитие методов редактирования генома, синтетической биологии.



2. Широкое использование математических подходов для выработки стратегии получения штамма-производителя, моделирования экспериментов и анализа.

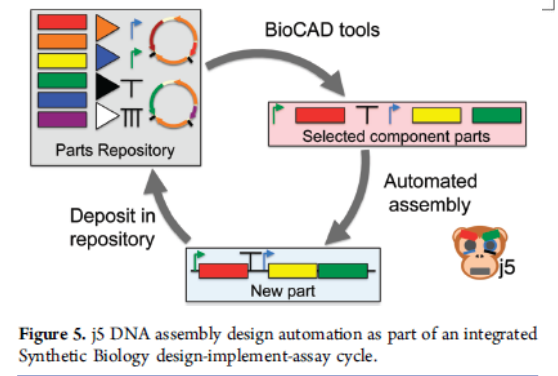
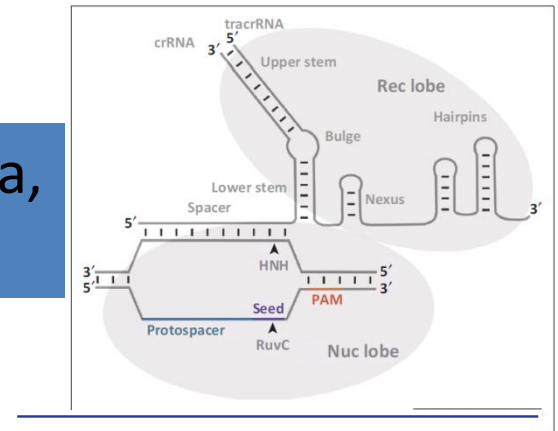
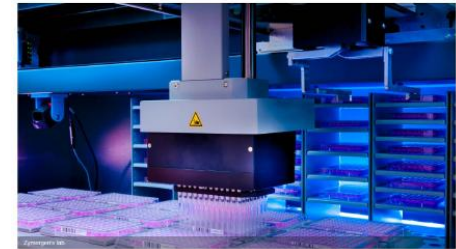


Figure 5. j5 DNA assembly design automation as part of an integrated Synthetic Biology design-implement-assay cycle.

3. Высокопроизводительные методы анализа и скрининга. Микрофлюидные технологии. Клеточный сортинг. Биосенсоры.

Robots And Microbes: Zymergen Raises \$44 Million From Big VCs



Микроорганизмы – платформы (chassis), используемые в метаболической инженерии:

- Corynebacterium glutamicum*
- Escherichia coli*
- Bacillus amyloliquefaciens*
- Pantoea ananatis*
- Saccharomyces cerevisiae*

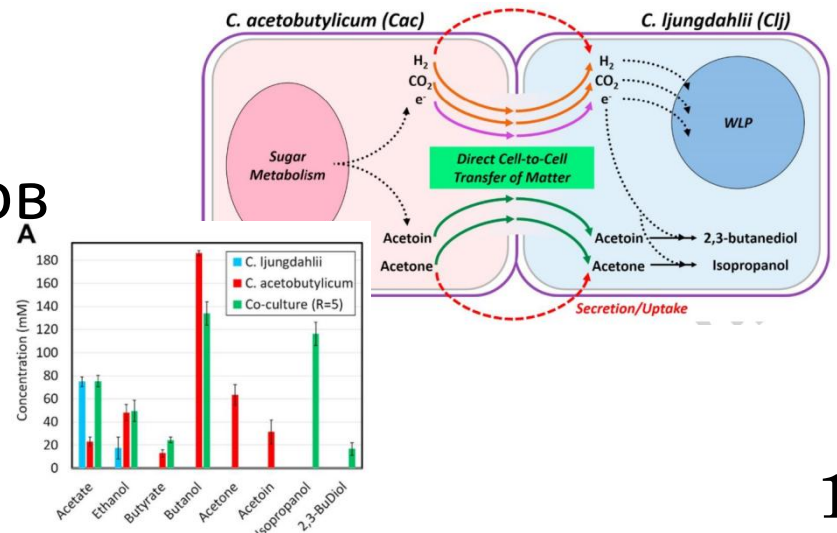
Экстремофилы: *Halomonas spp*, *Deinococcus spp*

Рост при pH 12 и высоких концентрациях солей, до 20% NaCl, на ~65% снижает затраты на культивирование по сравнению с традиционным использованием *E. coli*

Ye J et al (2018) Biotechnol J, 13(5):e1800074.

Искусственные синтрофные ассоциации микроорганизмов

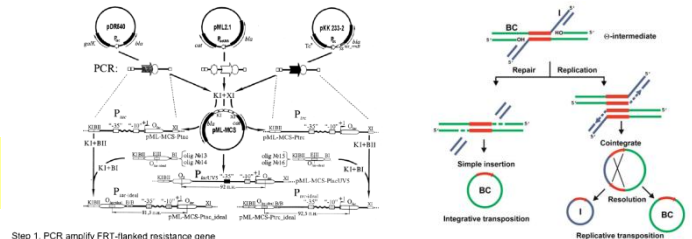
Charubin and Papoutsakis, Metab. Eng., <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.10.006>



Некоторые методы геномного редактирования

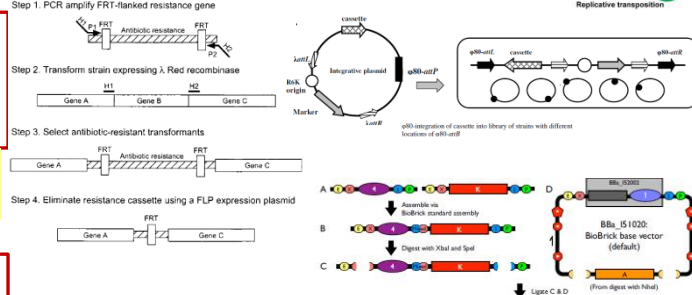
**Cloning genes in multi-copy plasmids;
Mu-driven random integration/amplification**

Gene 1981, 13:37-46; Gene 1991, 97:259-266



**Red/RecET-driven Recombineering;
Targeted site-specific integration/amplification**

PNAS 2000, 97:6640-6645; BMC Biotechnol 2008, 8:63



**Automation design from BioBricks;
Targeted genes/genomes synthesis and cloning**

Nat Biotechnol 2008, 26:787-793; BMC J Biol Eng 2008, 2:5

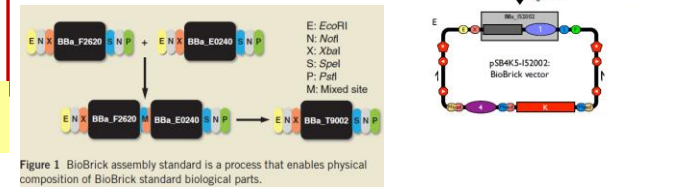


Figure 1 BioBrick assembly standard is a process that enables physical composition of BioBrick standard biological parts.

ePathBrick: a synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in E. coli

ACS Synth Biol 2012 Jul 20;1(7):256-66

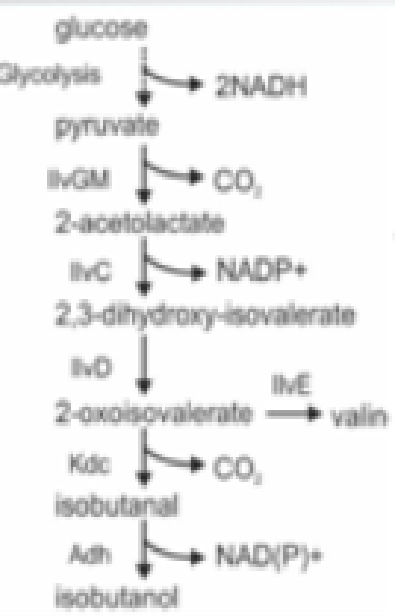
Synthetic biology platform of CoryneBrick vectors for gene expression in Corynebacterium glutamicum and its application to xylose utilization

Appl Microbiol Biotechnol. 2014 Jul;98(13):5991-6002

Генно-инженерные подходы для направленного изменения метаболических путей

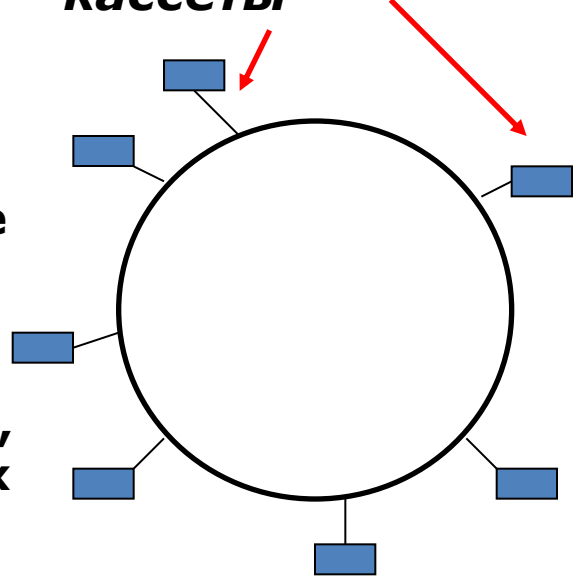
Требования к штаммам, используемым в крупномасштабном культивировании: отсутствие плазмид, генов устойчивости к антибиотикам, предоставление полной информации обо всех геномных модификациях.

Генно-инженерный инструментарий должен отвечать этим требованиям (*E. coli*, *M. methylotrophus*, *C. glutamicum*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *P. ananatis*, etc), а также требованиям FTO (free-to-operate).



Задачи: контролируемое усиление экспрессии генов, кодирующих ферменты целевого биосинтеза или центрального метаболизма, ослабление нежелательных путей, модификация транспорта целевых соединений.

экспрессионные кассеты



Хромосома штамма-продуцента

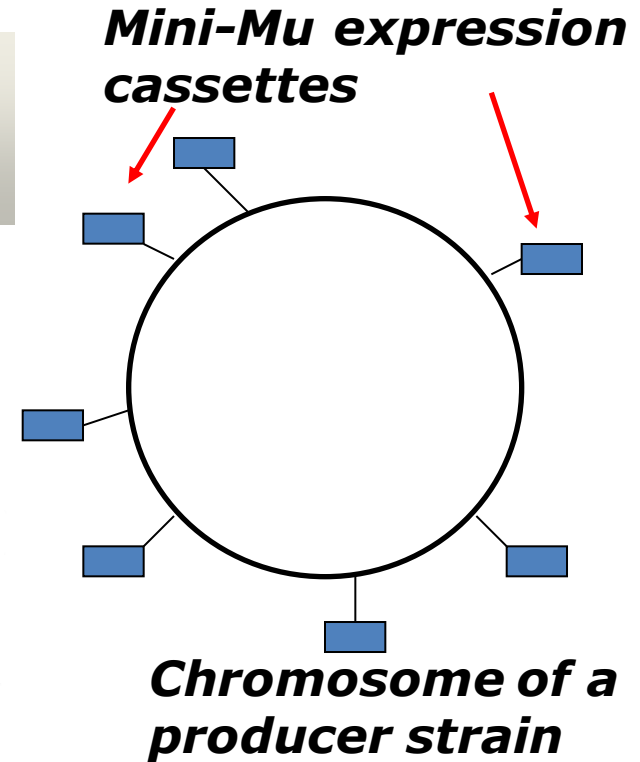
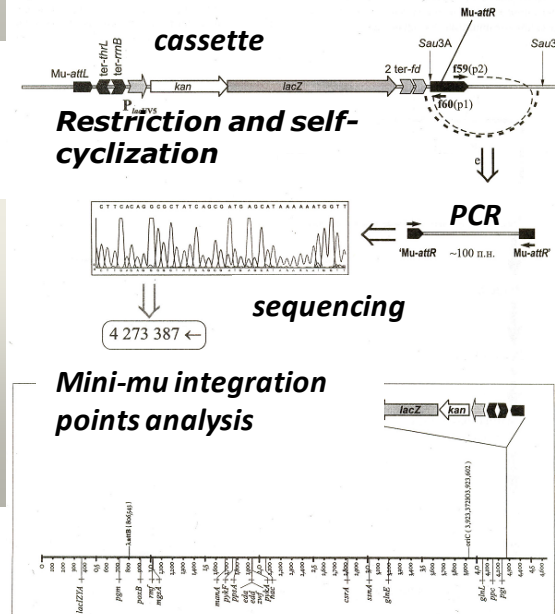
Метаболический путь

Mini-Mu–based random integration for construction of plasmid-less and marker-less AA-producing strains with completely known chromosomal structure

On the basis of phage-transposon Mu, an effective dual-component integration system for editing of Gram-negative bacteria genomes was developed.

Transposition and integrative modules are separated that allows effective random insertions of desired DNA fragments into a chromosome and their further amplification.

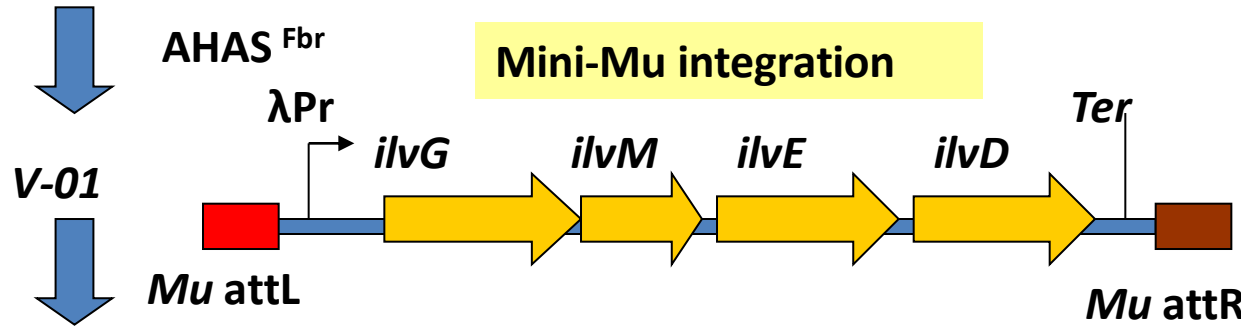
The procedure is followed by CGS or inversed-PCR analysis (Zimenkov et al, 2004) to find out the integration points.



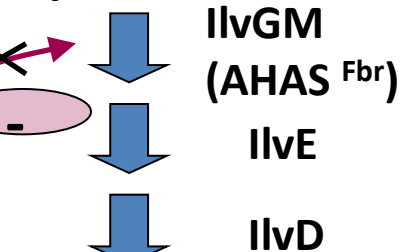
Genome of the final stable plasmid-less multi-integrand may contain transposition-mediated chromosomal rearrangements.

Example: Mini-Mu-based integration for *E. coli* chromosome editing to produce L-valine

E. coli K12



Pyruvate



L-Val

V-2 (4 copies *mini-Mu::Pr-ilvGMED*)

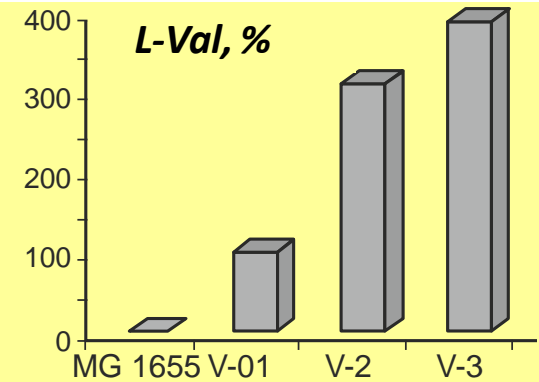
Mini-Mu amplification

V-3 (7 copies *mini-Mu::Pr-ilvGMED*)

Step-by-step increasing of Val accumulation level

Dual-component integration system allows to amplify pre-existed mini-Mu cassettes.

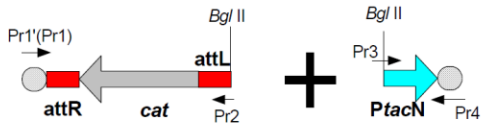
Genome of the final stable plasmid-less multi-integrant may contain transposition-mediated chromosomal rearrangements.



Strains

Optimization of genes expression in chromosome

PCR-amplification



Restriction, ligation,
PCR-amplification

Randomization of -35 of
the hybrid promoter Ptac

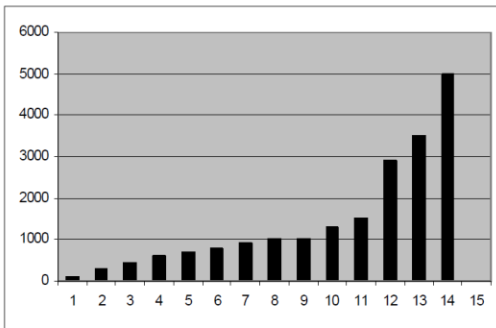
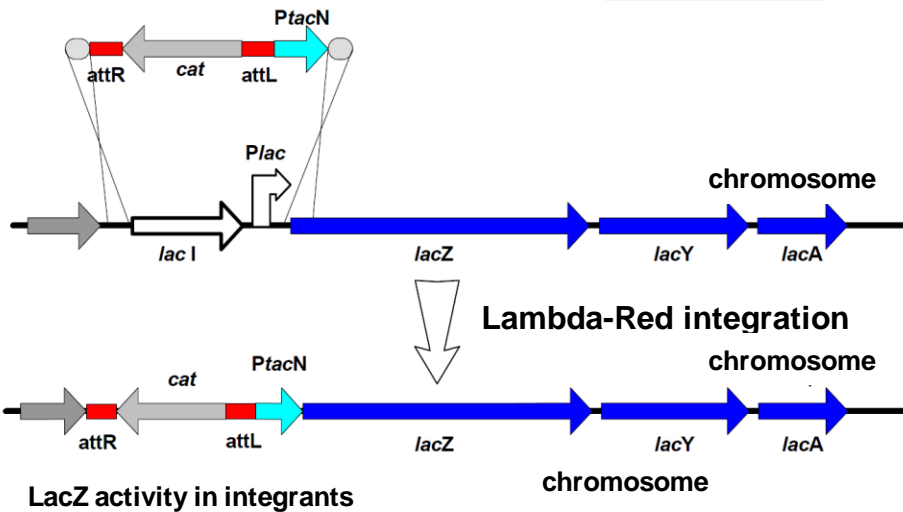
| | |
|-------|--------|
| Ptac | TTGACA |
| PtacN | TNNNNA |

“Recombineering”-based approaches (dsDNA, ssDNA) for chromosome editing:

- targeted (deletions, precise modifications of regulatory and/or structural parts of genes)

Based on pioneer works of D. Court’s Lab, B. Wanner’s Lab, etc.

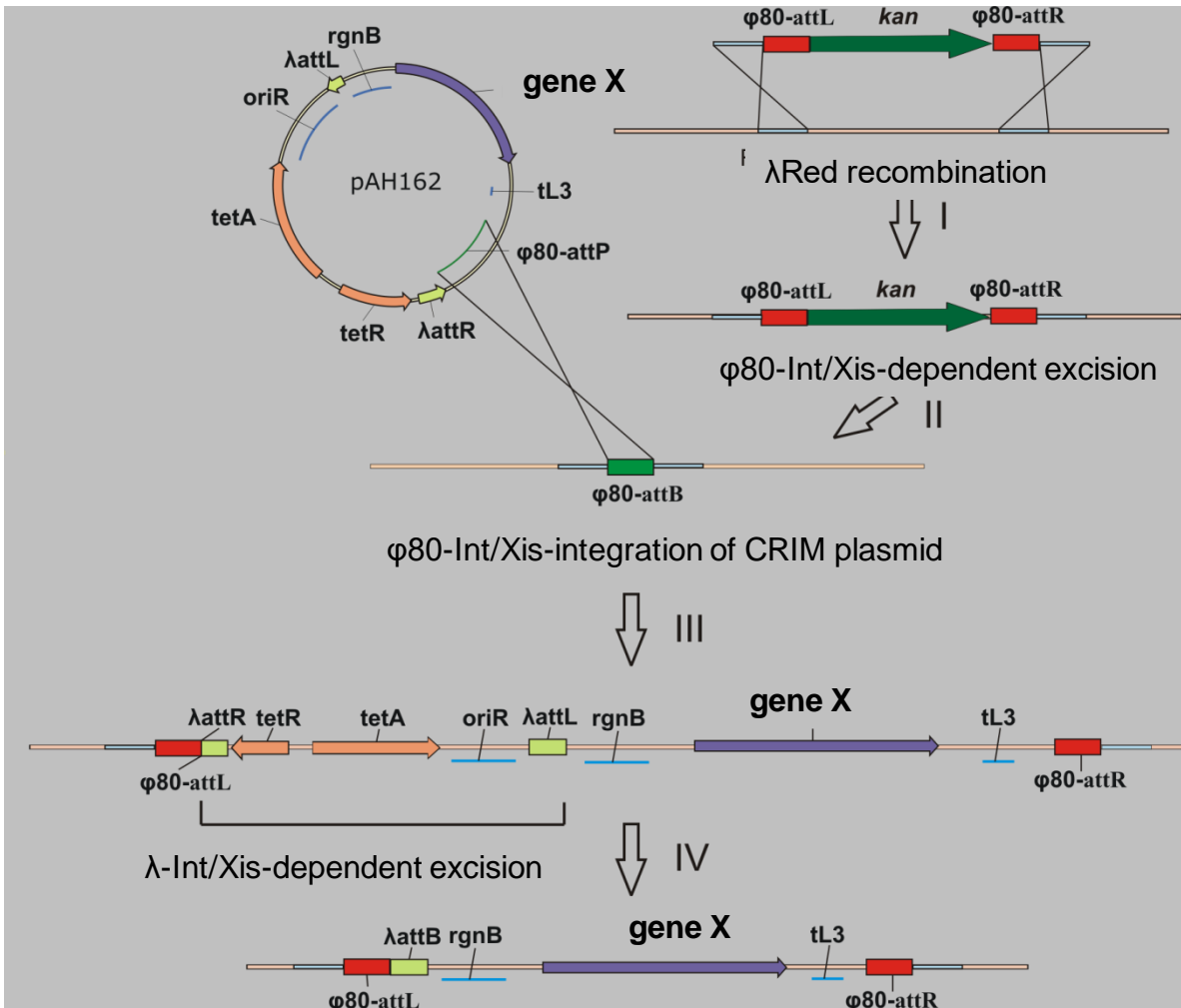
- “multiplex” recombineering methods– MAGE, TRMR, CRMAGE (CRISPR/Cas9-optimized MAGE) .



← Ptac - 10000 ед.Миллера
Miller units

Katashkina J.I., PhD theses, 2006

Site-specific chromosomal integration mediated by bacteriophages recombination systems:

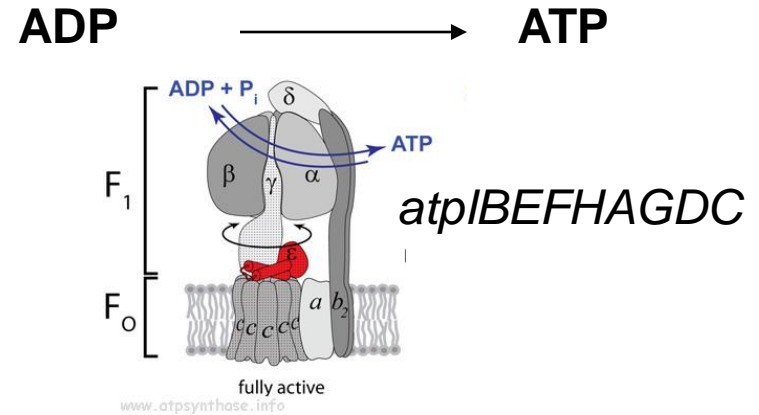
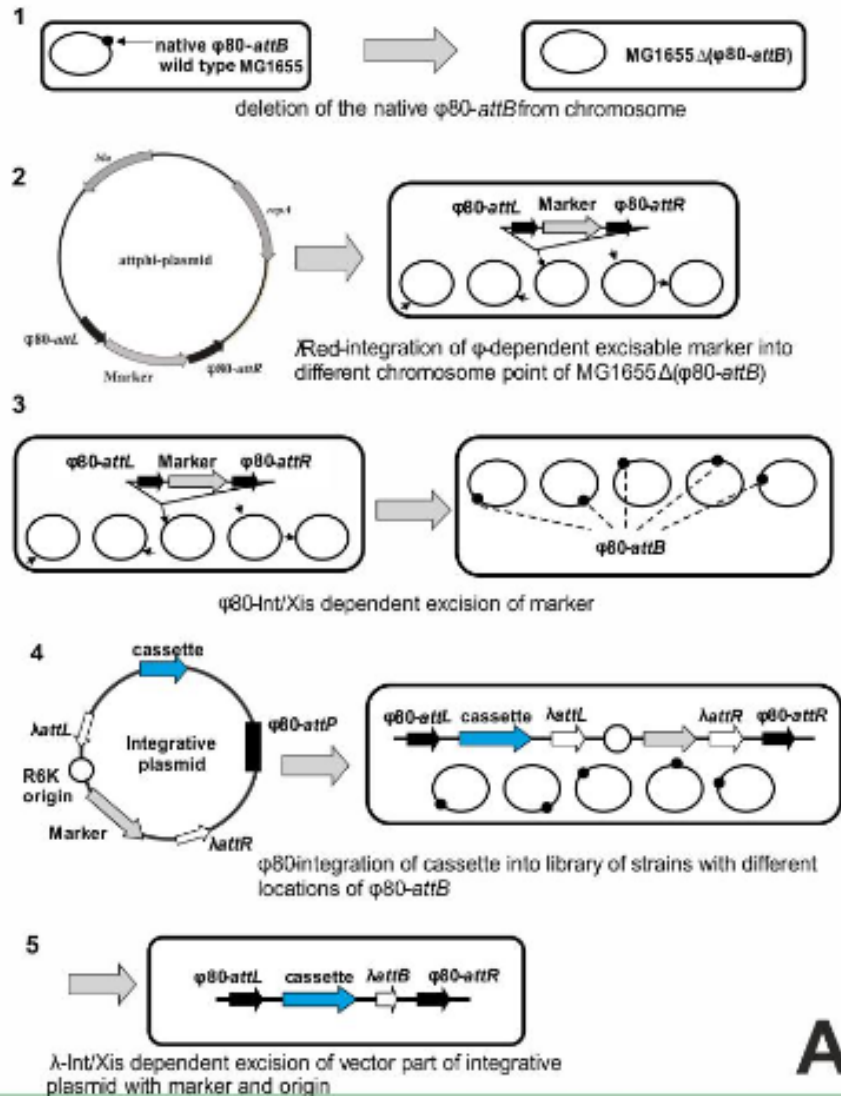


Dual-In/Out method

Library of ϕ 80-attB “integration platforms” for locus-specific insertion of target genes was constructed (more than 20 platforms).

E. coli,
C. glutamicum,
P. ananatis

PCR-free cloning and targeted integration of any long DNA fragment



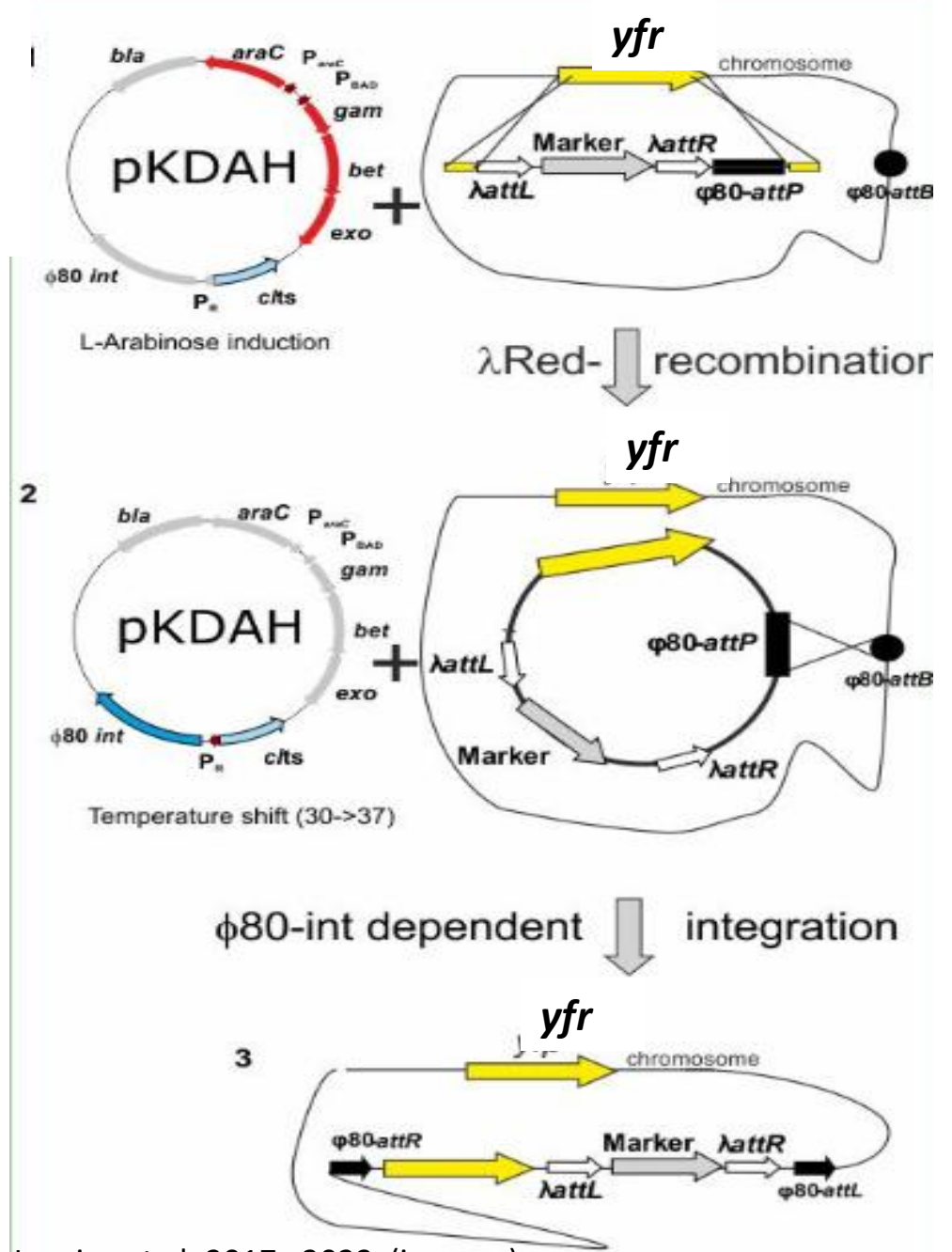
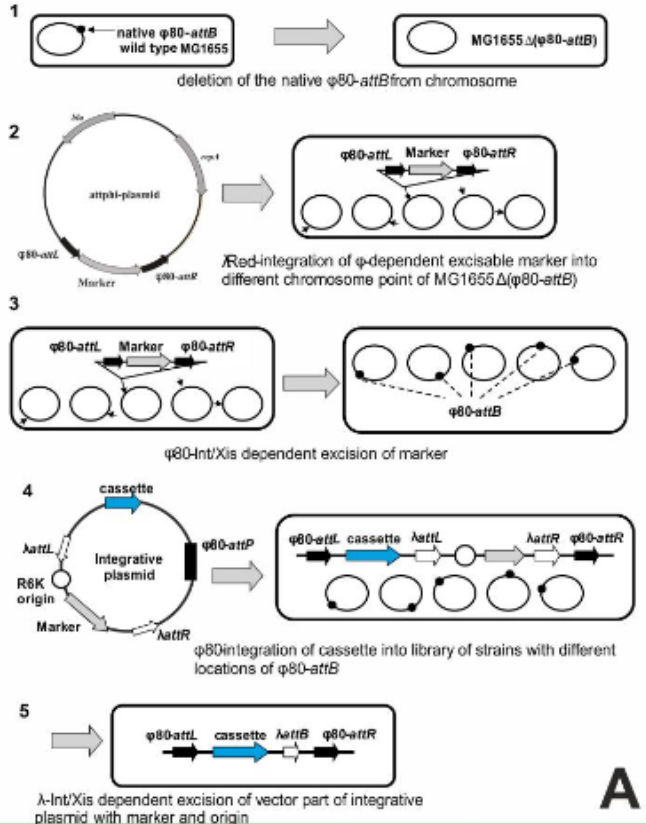
Ublinskaya et al, (2012) Journal of Microbiological Methods, 89, 167-173

in vitro cloning,
I-SceI-based
further developed in

Hook et al, (2016) Journal of Microbiological Methods, 130, 83-91.

in vivo cloning

PCR-free cloning and targeted integration of any long DNA fragment

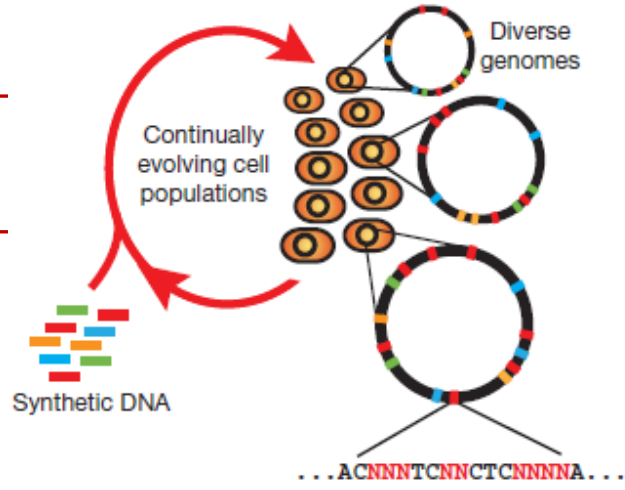
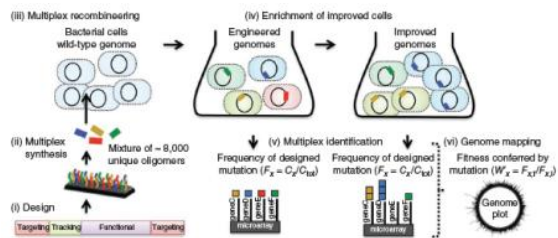


Igonina et al, 2017, 2023 (in press)

Мультиплексное геномное редактирование

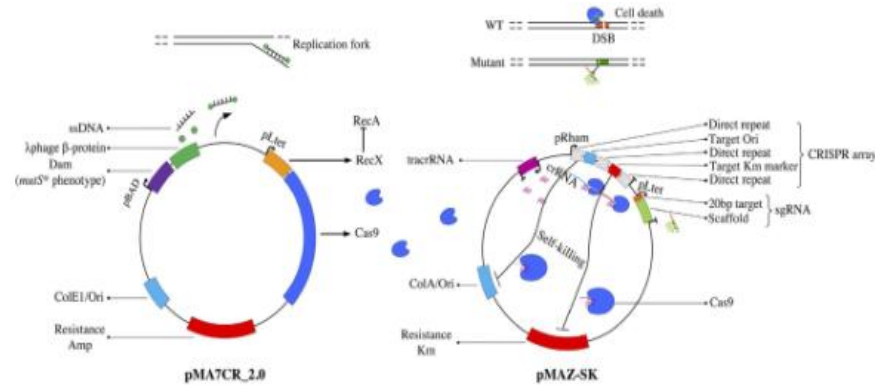
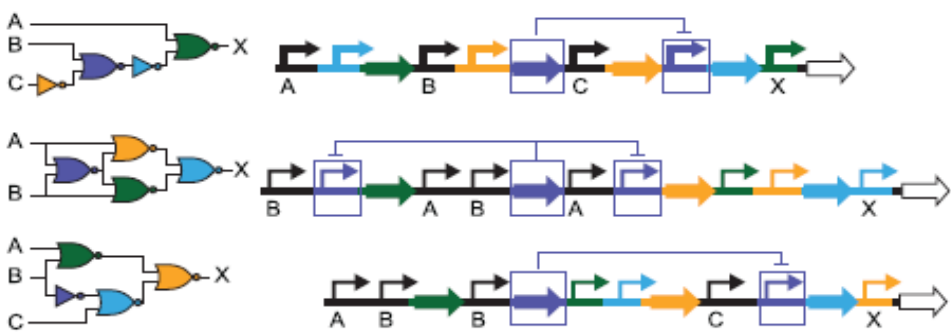
**Multiplex automated genome engineering (MAGE);
Trackable multiplex recombineering (TRMP)**

Nature 2009, 460:894-898; Nat Biotechnol 2010, 28:856-862



CRISPR optimized MAGE recombineering (CRMAGE); Genetic circuit design automation

Sci Rep 2016, 6:19452; Science 2016, 352:aac7341

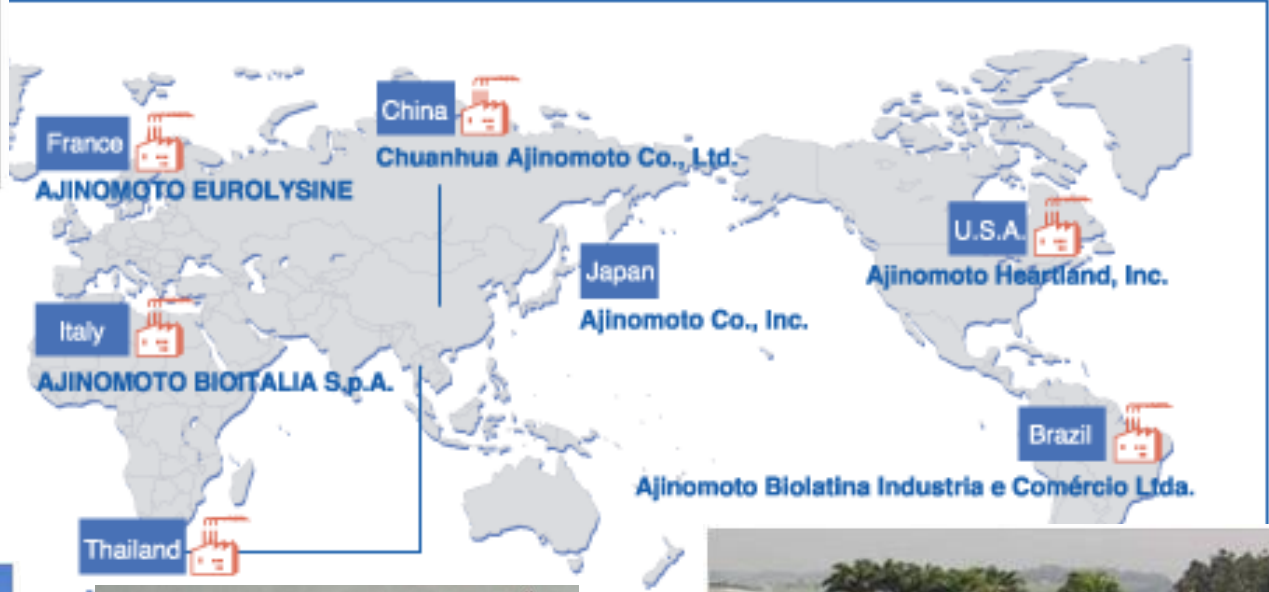


Пример: микробиологическое производство аминокислот и нуклеозидов, Ajinomoto group

Amiens Plant of AJINOMOTO EUROLYSINE S.A.S.



AJINOMOTO group



Kamphaeng Phet II Factory of Ajinomoto Co., (Thailand)

Eat Well, Live Well.
AJINOMOTO.

AJINOMOTO CO., INC.
1F-3, KYOBASHI 1-CHOME, CHUO-KU,
TOKYO 104-8316, JAPAN

Amino acids production by the Ajinomoto Groups using Microbial Strains based on the ZAO AGRI's results (in 2009)

| Amino acids | Total Markets (t) | Production by the Ajinomoto Groups (t) |
|---|-------------------|--|
| Feed-Use Amino Acids Lys, Thr, Trp | 1,500,000 | 400,000 |
| Pharmaceutical-use, food-use Amino Acids (Arg, Leu, Val, Ile, His, Ser, Phe etc.) | 41,000 | 18,000 |



Ajinomoto Biotatna Indústria e Comércio Ltda.

2012 год: Правительством РФ была утверждена «Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г (БИО2020)».

2013 год: «Дорожная карта развития биотехнологий и генетической инженерии»: увеличить производство биотехнологической продукции в 80 раз, рынка – в 30 раз, импортозамещение – до 80%, рост экспорта – в 20 раз.

2016 год: были подведены промежуточные итоги выполнения программы.

[Стратегическая программа исследований \(biotech2030.ru\)](http://biotech2030.ru)



Завод премиксов № 1 (Белгородская об-ть)
2020 год: 80 тыс тонн L-лизина



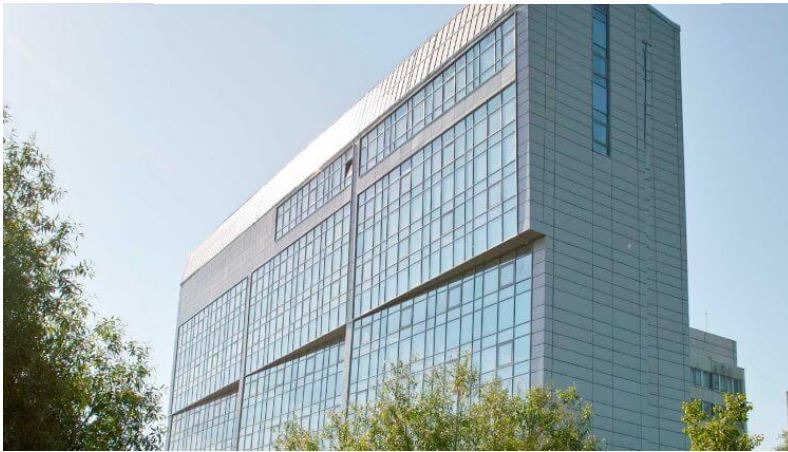
Мировой рынок биотехнологической продукции к 2025 г. достигнет 2 трлн. долл.; к 2030 году биотехнологии будут использоваться при получении 35% продукции химической промышленности, 50% сельскохозяйственного производства, 80% лекарственных препаратов. В целом, продукция биотехнологий будет составлять до 2.7% от ВВП развитых стран, а для развивающихся экономик, к которым относится и Россия, этот процент будет еще выше (данные Организации экономического сотрудничества и развития).

Acknowledgements

Всем коллегам в АГРИ и Research Institute for
Bioscience Products & Fine Chemicals

AGRI

АО НИИ Аджиномото-Генетика



**АО Аджиномото-Генетика
(АГРИ)**

Aj

AJINOMOTO



**Research Institute for
Bioscience Products & Fine
Chemicals**

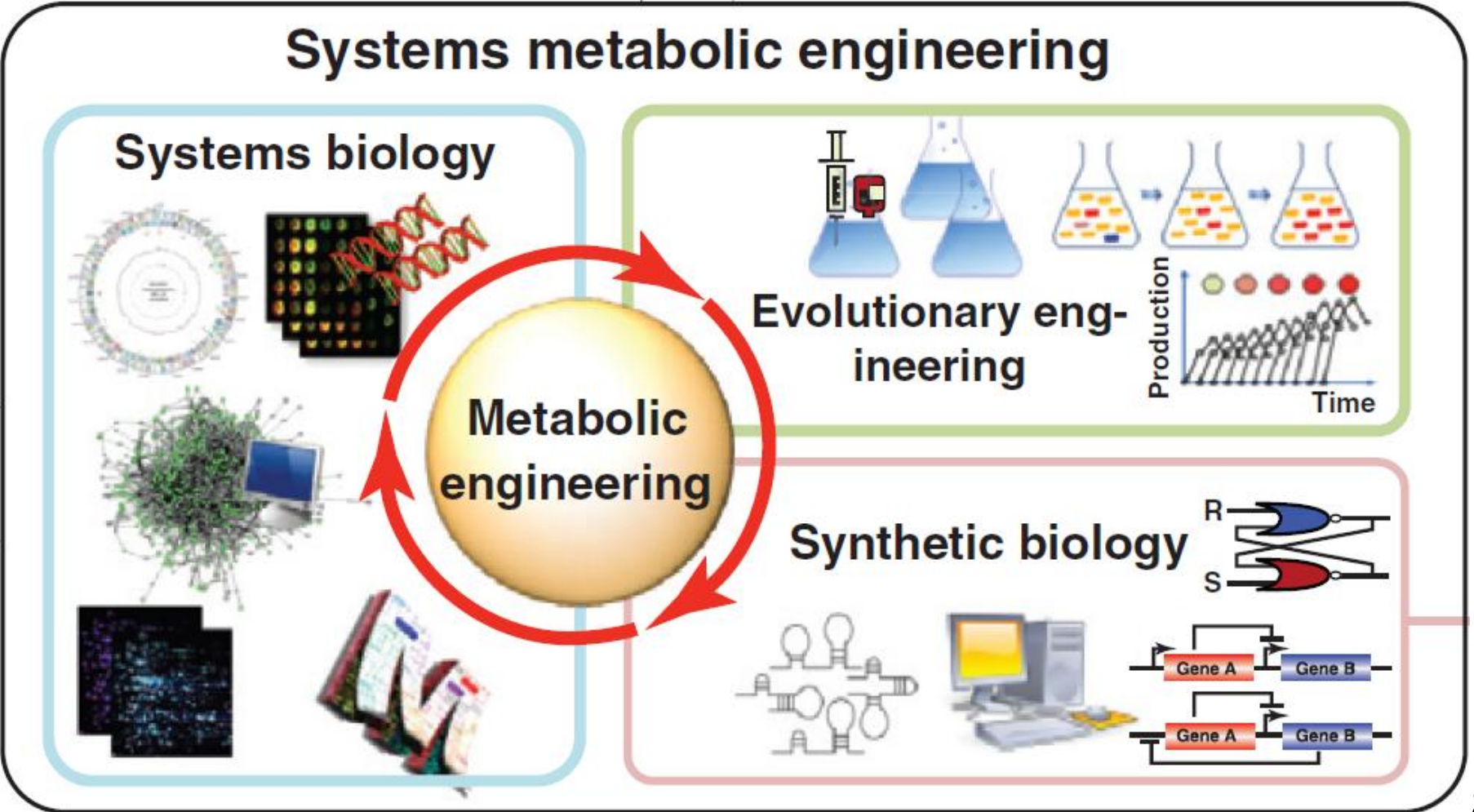
Appendix

Системная метаболическая инженерия

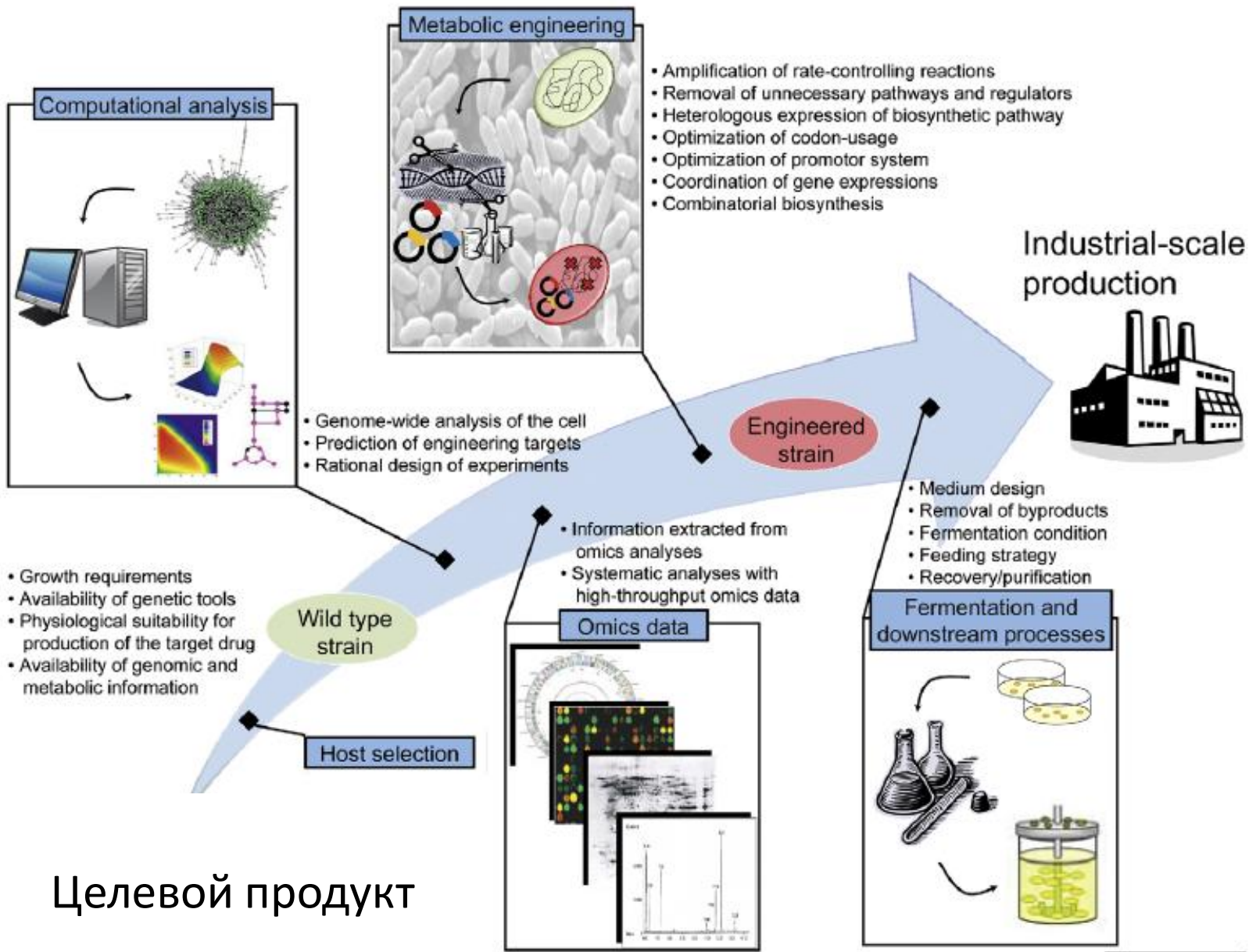
Systems metabolic engineering for chemicals and materials.

Lee JW, Kim TY, Jang YS, Choi S, Lee SY.

Trends Biotechnol. 2011 Aug;29(8):370-8.



Что нас ожидает на этом пути?



С чего начать?

Субстрат



Основные характеристики процесса:

Выход продукта

количество
продукта/количество
субстрата, mol/mol

Уровень накопления

Скорость накопления

1. Выбор оптимального метаболического пути. FBA (flux balance analysis). Ретробиосинтез.
2. Выбор микроорганизма.

Thirteen Years of Building Constraint-Based In Silico Models of *Escherichia coli*

Jennifer L. Reed and Bernhard Ø. Palsson*

Создание метаболической модели *in silico*

“Omics” Data

Genomics

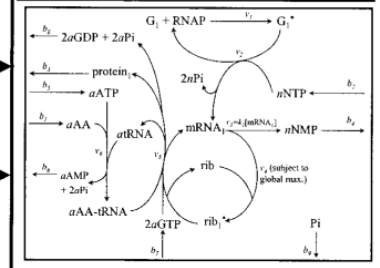
Transcriptomics

Proteomics

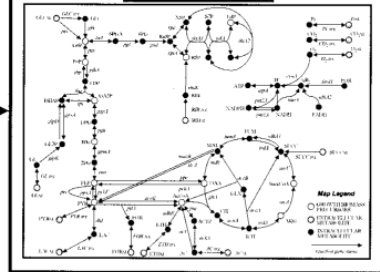
Metabolomics

Interactomics
Environment

Transcription & Translation



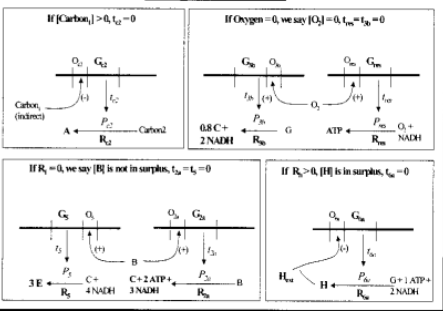
Metabolism



***E. coli* i2K**

Regulatory Actions

Regulation



Input Signals

TABLE 2. Flux balance models

| Model | Year(s) | No. of metabolic reactions | No. of metabolites |
|------------------------------------|-------------|----------------------------|--------------------|
| Majewski and Domach | 1990 | 14 | 17 |
| Varma and Palsson ^a | 1993–1995 | 146 | 118 |
| Pramanik and Keasling ^b | 1997–1998 | 300 (317) | 289 (305) |
| Edwards and Palsson | 2000 | 720 | 436 |
| Covert and Palsson ^c | 2002 | 113 | 77 |
| <u>Reed and Palsson</u> | <u>2003</u> | <u>929</u> | <u>626</u> |

Input

E. coli Metabolic Network iE660a
 739 reactions
 (<http://gcrg.ucsd.edu/organisms/ecoli.html>)

К настоящему времени: более 100 моделей для прокариот, более 50 для эукариот, около десятка для архей.

[OTHER ORGANISMS | Systems Biology Research Group \(ucsd.edu\)](http://OTHER_ORGANISMS_Systems_Biology_Research_Group.ucsd.edu)

Output

Предсказания выхода целевого соединения для дикого типа и при добавлении синтетических путей и введении нокаутующих мутаций

Методы селекции: традиционные подходы и новые перспективы

1. Получение мутаций в генах, кодирующих белки, наиболее существенные для сверхпродукции целевого вещества (ex. устойчивость к ретроингибированию, активация специфического транспорта, изменение регуляции и т.п.): с помощью традиционной селекции и белковой инженерии (SerA, AroG, LeuA, IlvA, HisG, IlvG, IlvH, IlvN, ThrA, TrpE, etc).

2. Адаптивная лабораторная эволюция (ALE) в сочетании с NGS.

3. Высокопроизводительные методы селекции (HTP, uHTP, микрофлюидные технологии). Биосенсоры.

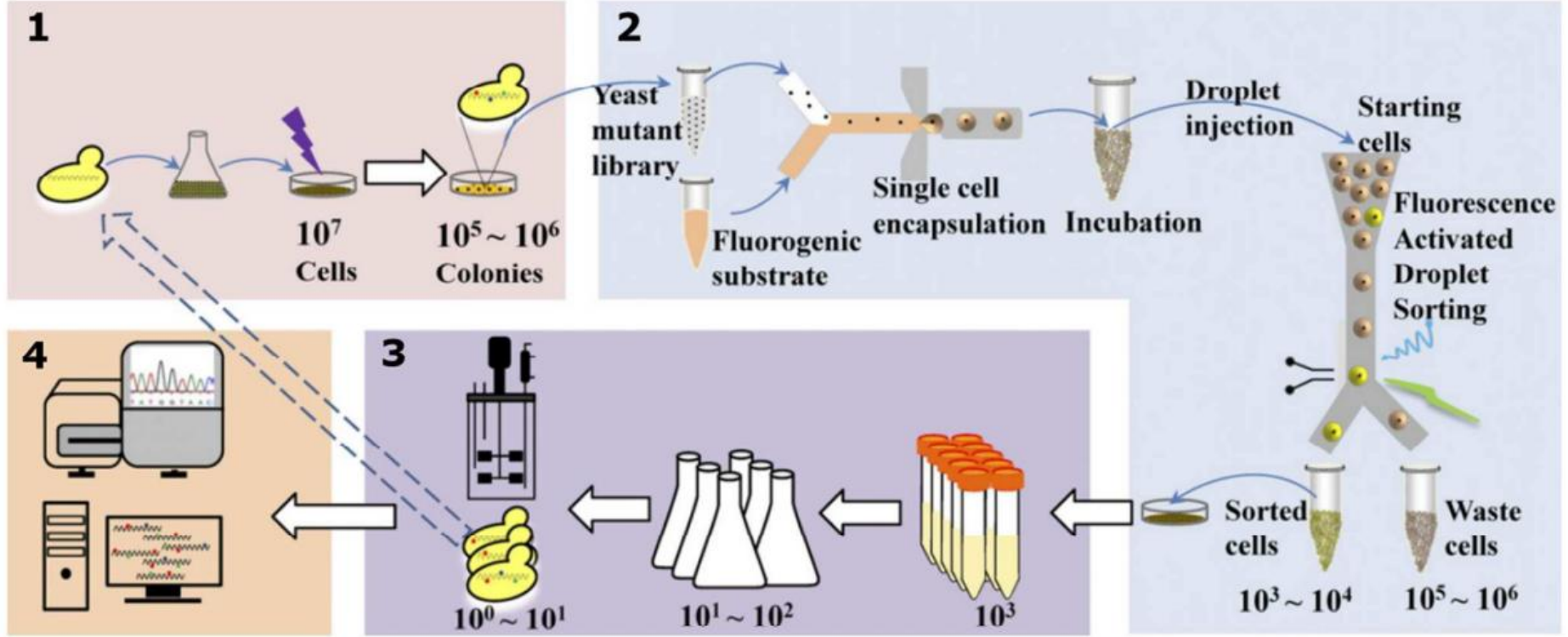
Высокопроизводительные методы селекции (НТР, иНТР, микрофлюидные технологии).



Биосенсоры.

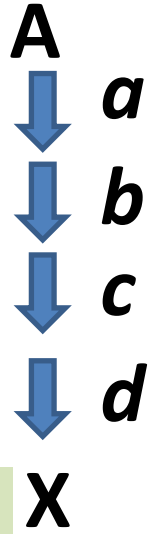
1. Селекция **non-GMO** штаммов.
2. Селекция **GMO** штаммов – анализ библиотек с целью поиска существенных для сверхпродукции генетических факторов.

Droplet-based microfluidics screening platform.

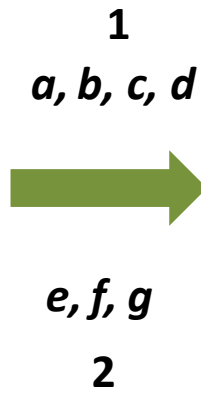


А если микроорганизм “не умеет” синтезировать интересующее вас вещество X?

1. Путь известен для других организмов



Химический синтез генов, гармонизированных для экспрессии в клетках хозяина.

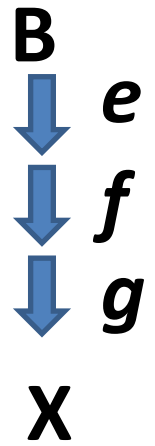


E. coli Metabolic Network iJE660a 739 reactions

Ретросинтез

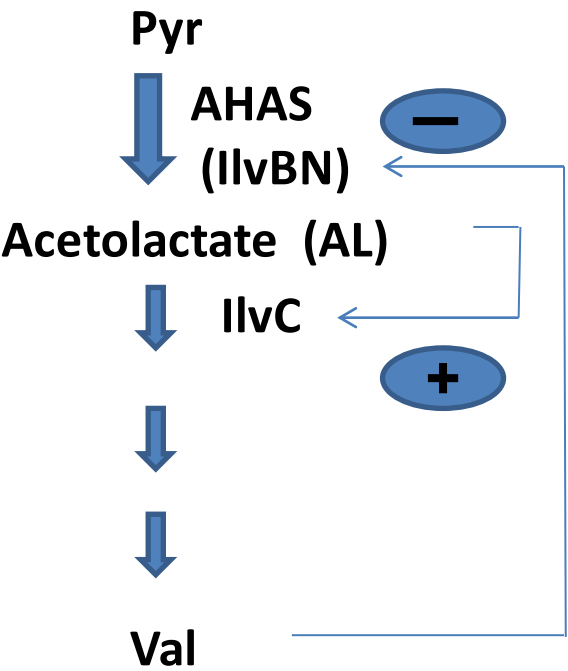
Ретробиосинтез (BNICE, RetroPath, etc)

Предсказание нового, ранее не существовавшего, метаболического пути.

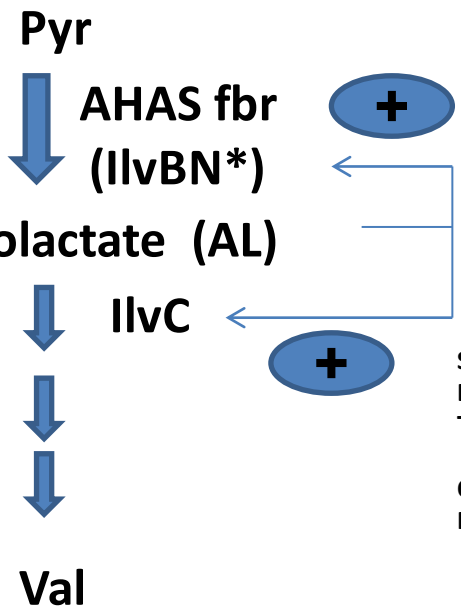


2. Путь неизвестен или является не оптимальным для выбранного хозяина

Metabolic regulation: artificial positive feedback loop in branched chain amino acids biosynthesis



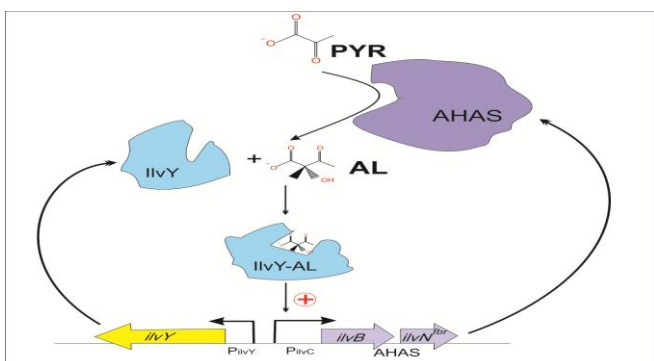
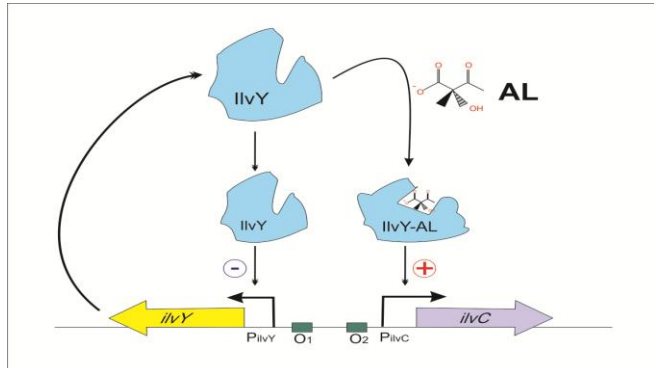
P_{ilvC}-ilvBN*



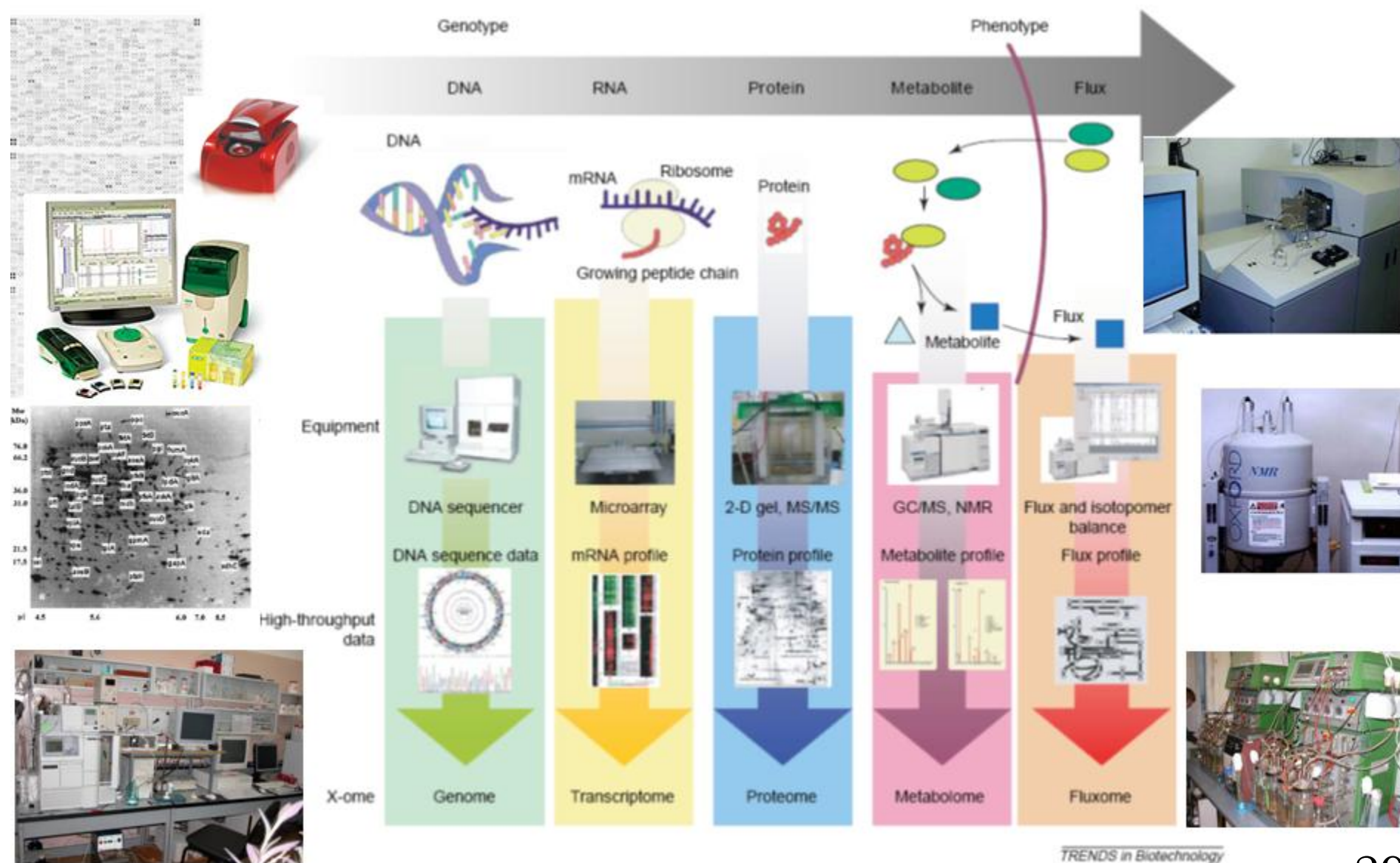
Sycheva et al (2015) AUTO-INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM, AND THE USE THEREOF FOR PRODUCING USEFUL METABOLITES USING A BACTERIUM OF THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE RU2549708, WO2013151174 (A1), etc

wild-type: negative regulation by final product

Artificial positive feedback module: metabolic intermediate (AL) triggers its own synthesis



Методы анализа: высокопроизводительные и не очень



Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering

Gregory Stephanopoulos

Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139

Received January 12, 1998; accepted March 5, 1998

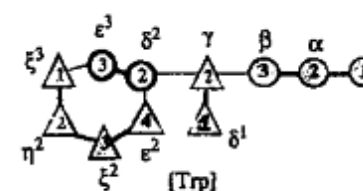
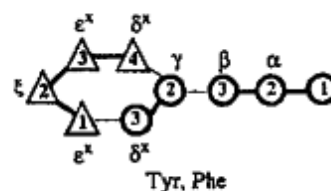
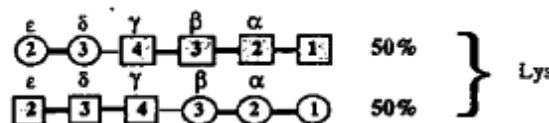
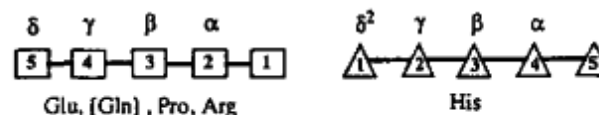
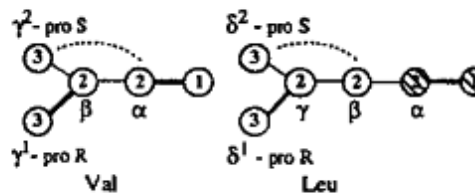
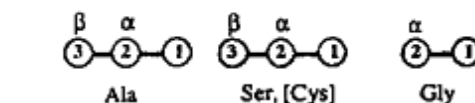
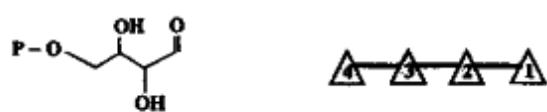
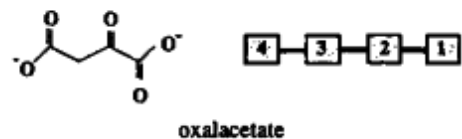
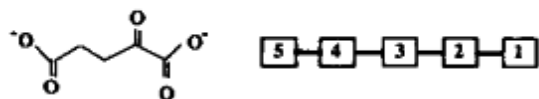
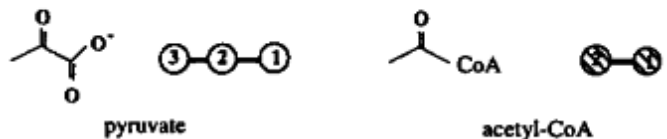
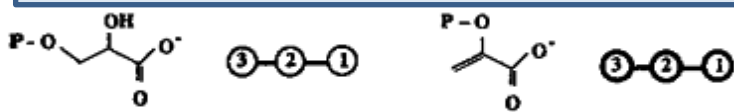
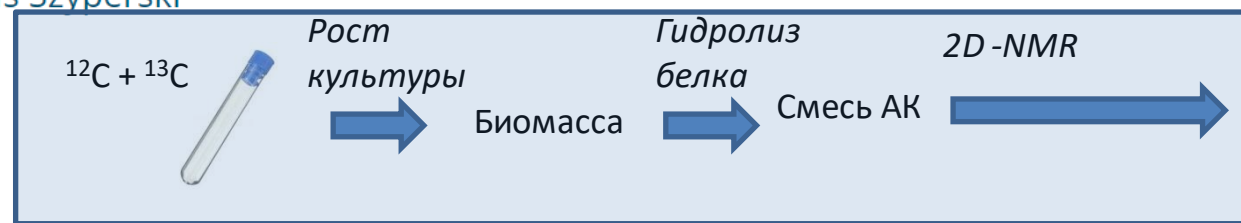
“The combination of analytical methods to quantify fluxes and their control with molecular biological techniques [...] is the essence of metabolic engineering.”

Biosynthetically Directed Fractional ^{13}C -labeling of Proteinogenic Amino Acids

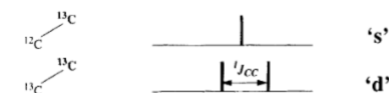
An Efficient Analytical Tool to Investigate Intermediary Metabolism

Eur. J. Biochem. 2-32, 433-448 (1995)

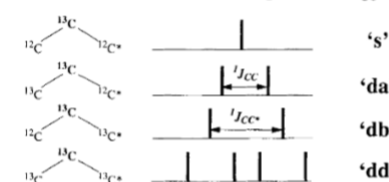
Thomas Szyperski



A terminal carbon atom



B carbon atom embedded in a C3-fragment with $^1J_{CC} \neq ^1J_{CC^*}$



C carbon atom embedded in a C3-fragment with equal $^1J_{CC}$

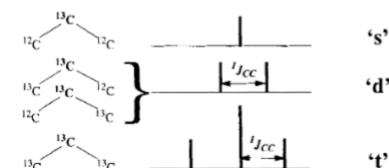



Fig. 1. Different types of ^{13}C -labeling patterns (left) and the corresponding multiplets as observed along ω_1 in $[^{13}\text{C},^1\text{H}]$ -COSY spectra (middle) recorded for biosynthetically directed fractionally ^{13}C -labeled amino acids. In the molecular fragments on the left, the bold letter

Metabolic flux analysis based on ^{13}C -labeling experiments and integration of the information with gene and protein expression patterns

Kazuyuki Shimizu ¹

NMR  GC-MS
2 mg 2 μg

^{13}C -MFA:
ограничения и
перспективы

nature
protocols

PROTOCOL

<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0204-0>

High-resolution ^{13}C metabolic flux analysis

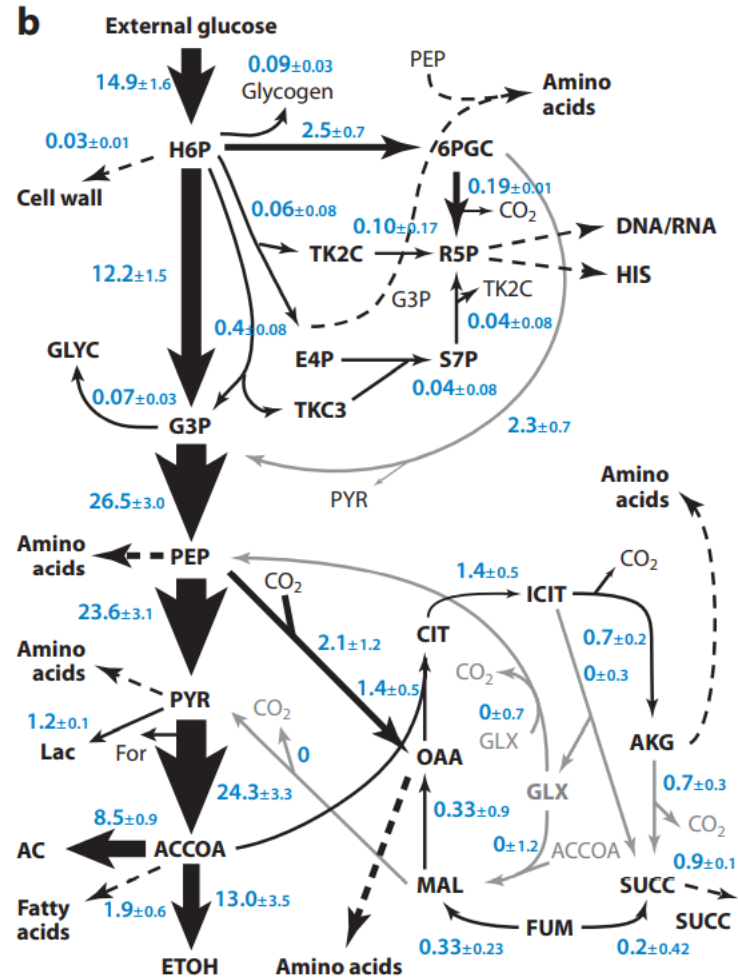
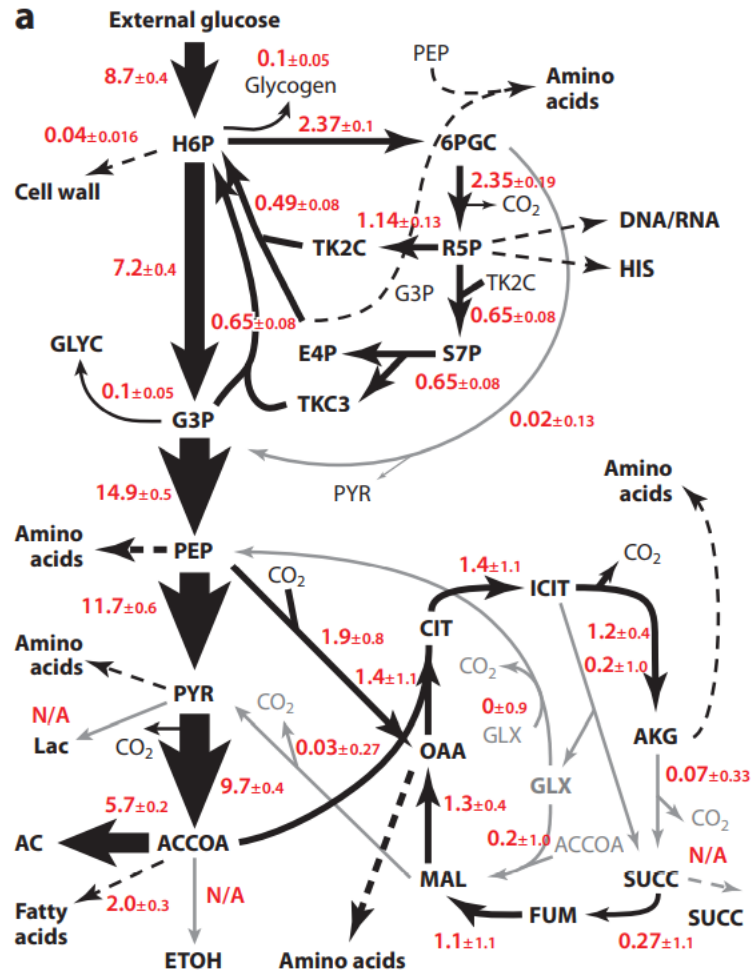
Christopher P. Long^{1,2} and Maciek R. Antoniewicz^{1*}

“The presented protocol can be completed in 4 days and quantifies metabolic fluxes with a standard deviation of less than 2%”

Metabolic Engineering: Past and Future

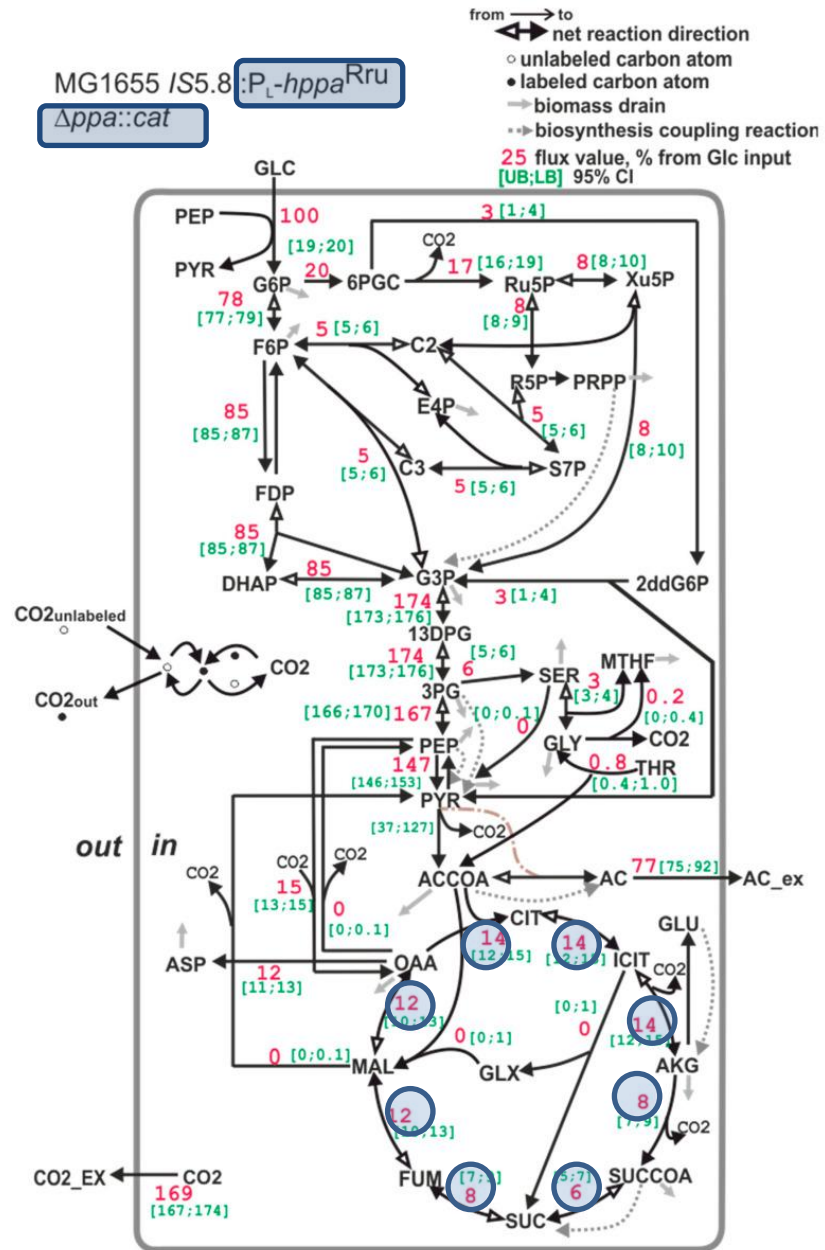
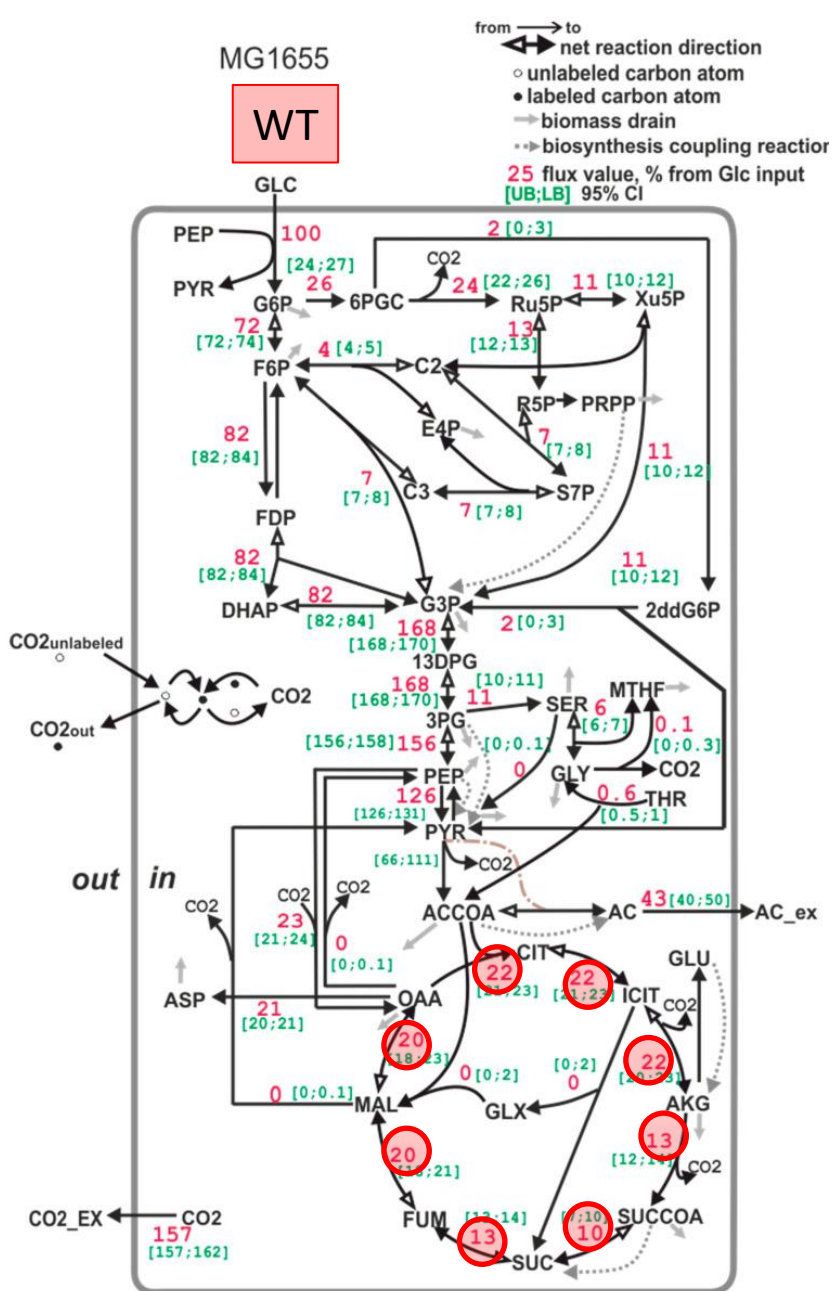
E. coli

Benjamin M. Woolston,* Steven Edgar,*
and Gregory Stephanopoulos

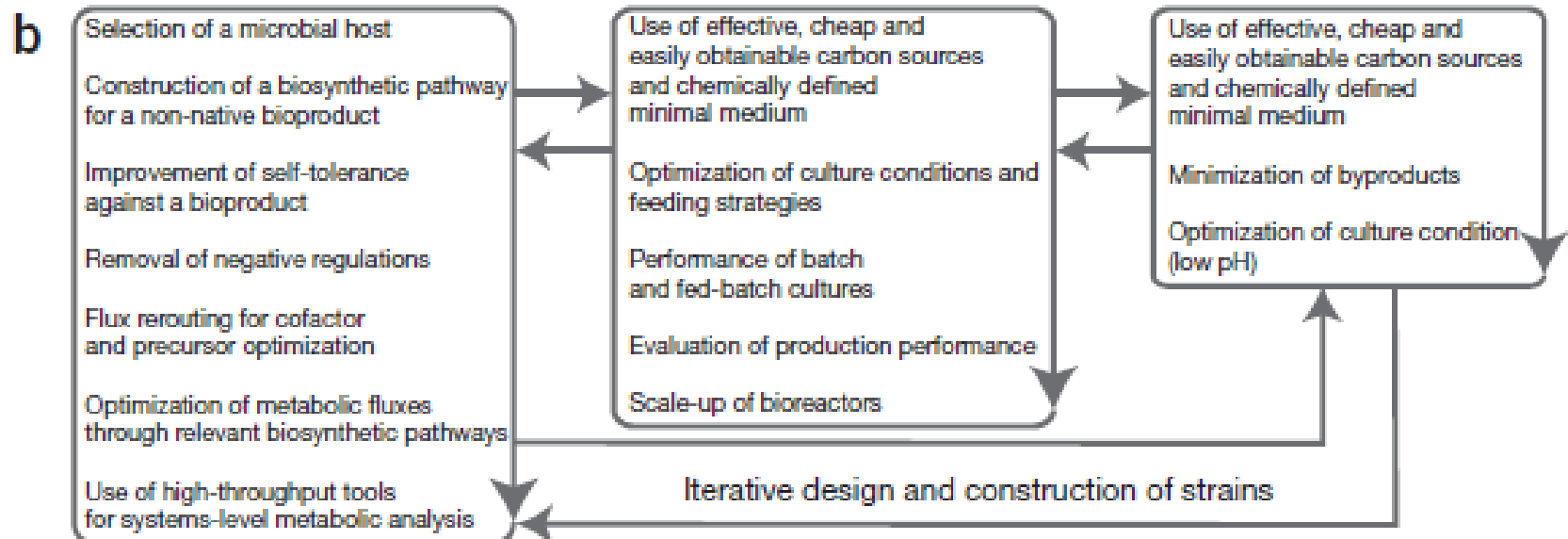
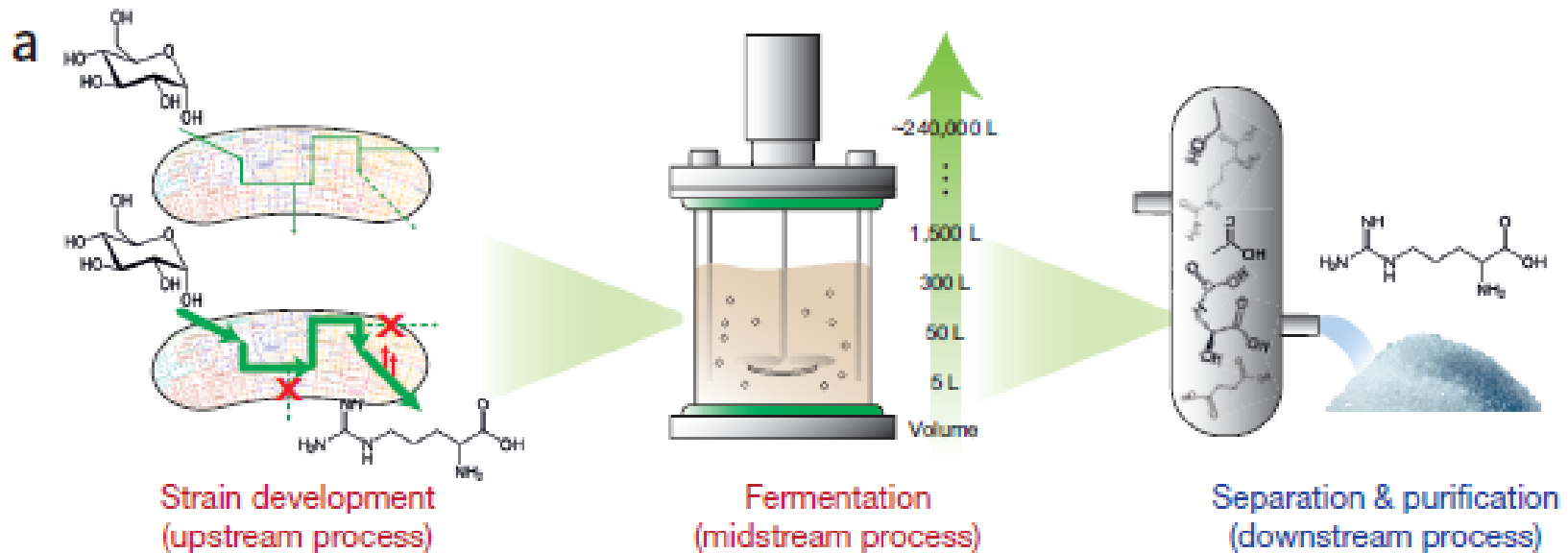


Aerobic

Anaerobic 33



Взаимосвязанные этапы процесса микробного синтеза



Пример реализации выбранной стратегии получения микробного продуцента целевого вещества

