ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»

На правах рукописи

ГОРШКОВА НАТАЛЬЯ ВАСИЛЬЕВНА

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ИНТЕГРАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК В ХРОМОСОМУ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ И КОРИНЕБАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ ТРАНСПОЗИЦИИ ФАГА MU

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук 03.01.03 - молекулярная биология

Научный руководитель: Профессор, доктор биологических наук Машко Сергей Владимирович

Москва 2018

оглавление

ВВЕДЕНИЕ
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ11
1. Corynebacterium glutamicum - важный объект биотехнологического
производства11
1.1.Общая характеристика Corynebacterium glutamicum11
1.2. Центральный метаболизм углерода и пути биосинтеза основных
продуктов биотехнологии13
1.3. Современные подходы рационального дизайна продуцентов
C. glutamicum18
1.4. Основные продукты, получаемые с использованием C. glutamicum,
и перспективы использования этого микроорганизма в биотехнологии25
1.5. Генетические методы для метаболической инженерии
C. glutamicum
2. Бактериофаг Ми – транспозон
2.1. Необходимые для транспозиции ДНК элементы фага Ми
2.2. Белки, принимающие участие в репликативной транспозиции
бактериофага Ми41
2.3. Реконструкция моделей транспозосом45
2.4. Стадии репликативной транспозиции фага Mu46
2.5. Механизм нерепликативной транспозиции фага Ми
2.6. Бактериофаг Mu – инструмент генной инженерии
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
1. Бактериальные штаммы, плазмиды и условия культивирования
2. Олигонуклеотиды
3. Стандартные генно-инженерные методики
4. Электротрансформация клеток <i>C. glutamicum</i> 64
5. Электротрансформация клеток <i>M. methylotrophus</i> AS1 (<i>M. extorquens</i> AM1)64
6. Интеграция mini-Mu транспозона в хромосому C.glutamicum
7. Интеграцияmini-Митранспозонавхромосому <i>М. methylotrophus</i> AS1

(M. extorquens AM1)66
8. Внутрихромосомальная амплификация mini-Mu (LER) единицы в клетках
C. glutamicum
9. Внутрихромосомальная амплификация mini-Mu(LER) единицы в клетках
M. methylotrophusAS166
10. Вырезание ДНК фрагмента, заключенного между lox сайтами, из
mini-Mu единиц, интегрированных в геном C. glutamicum
11. Вырезание ДНК фрагмента, заключенного между lox сайтами, из
тini-Mu единиц, интегрированных в геном <i>M. methylotrophus</i> AS167
12. Гибридизация по Саузерну
13. Измерение относительной флуоресценции
14. Определение точек интеграции mini-Mu транспозона в хромосоме
<i>C. glutamicum</i>
15. «Shotgun» клонирование интегрированных в хромосому C. glutamicum
копий mini-Mu единиц69
16. Конструирование рекомбинантных плазмид70
16.1. Конструирования хелперной плазмиды pVK9- <i>lacI</i> ^Q -P _{tac} -MuAB70
16.2. Конструирования хелперной плазмиды pVK-P _{dap} -MuAB70
16.3. Конструирование интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(LR)-YK71
16.4 Конструирование интегративных плазмид pAH-mini-Mu(LER)-YK,
pAH-mini-Mu(LÈR)-YK73
16.5. Конструирование интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-GK73
16.6. Конструирования плазмиды pCM110-Gm ^R
16.7. Конструирование хелперной плазмиды рТ-Р _{<i>lac</i>} - <i>cre</i>
16.8. Конструирование хелперной плазмиды р06-Р _{<i>dapA</i>} -cre
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ
1. Адаптация системы транспозиции бактериофага Ми для интеграции
рекомбинантной ДНК в хромосому <i>C. glutamicum</i> ATCC 13869
1.1. Компоненты Ми-зависимой системы интеграции/ амплификации/
фиксации генов в хромосоме <i>C. glutamicum</i> АТСС 13869
1.2. Транспозиция mini-Mu(LER) единицы с интегративной плазмиды,

2.5. Внутримолекулярная ми-зависимая амплификация ппп-миединиц различного состава в хромосоме *C. glutamicum* ATCC 13869......96

3. Стратегия интеграция/амплификация/фиксация различных mini-Mu(LER)	
единиц в хромосоме <i>C. glutamicum</i> АТСС 13869	100
4. Универсальность метода Mu-зависимой транспозиции для C. glutamicum.	
Новый интегративный вектор	102
5. Метилотрофы – перспективный объект биотехнологии	105
5.1. Система интеграции/амплификации mini-Mu элементов в хромосоме	

5.2. Реализация стратегии интеграции/амплификации/фиксации различных mini-Mu(LER) единиц в геноме *M. methylotrophus* AS1......108 5.3. Адаптация системы транспозиции бактериофага Mu для интеграции

Methylophilus methylotrophus AS1, разработанная ранее.....107

рекомбинантной ДНК в хромосому <i>M. extorquens</i> AM1	111
ВЫВОДЫ	114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	116
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	117
БЛАГОДАРНОСТИ	134

введение

Актуальность темы исследования.

С момента обнаружения в супернатанте культуры почвенной бактерии *Corynebacterium glutamicum* аминокислоты L-глутамата [*Kinoshita et al., 1957*] интерес к *C. glutamicum* как потенциальному продуценту аминокислот, а затем и других биологически активных соединений постоянно растет. На сегодняшний день *C. glutamicum* является одним из наиболее важных промышленно-значимых объектов в производстве основной массы L-аминокислот, таких как глутамат ~3,0млн т/год (произведено в 2014 г [*Wendisch et al.,* 2016]), лизин >1,5 и триптофан <0,05 млн т/год [*Becker and Wittmann,* 2012]. *Corynebacterium glutamicum* используется также для производства и некоторых других аминокислот, нуклеотидов, биотоплива, рекомбинантных белков [*Becker and Wittmann,* 2012]. Экспрессия кластеров гетерологичных генов в *C. glutamicum* позволило создать новые для данного организма метаболические пути, что привело к продукции разнообразных веществ, таких как Dпантотената, диаминов, органических кислот и различных спиртов [*Zahoor et al.,* 2012].

Так как успешное биотехнологическое применение *Corynebacterium* glutamicum стало очевидным, в промышленном производстве существует постоянная необходимость в штаммах с улучшенными продуцирующими свойствами. Совершенствование новых штаммов идет в направлении увеличения коэффициента конверсии углерода исходного сырья, продуктивности, устойчивости штаммапродуцента к стрессу и способности использовать более широкий спектр промышленного сырья. Поэтому разработка быстрых и эффективных методов для получения генетически-модифицированных штаммов актуально и сегодня.

Первые сообщения по конструированию инструментов для осуществления генетических манипуляций в *Corynebacterium glutamicum* появились в 1984 году [*Katsumata et al., 1984; Ozaki et al., 1984*], с которых научные исследования, направленные на создание широкого спектра генетических методов для последующего дизайна продуцирующих штаммов, стали активно развиваться. Полный сиквенс *C. glutamicum* генома был опубликован в открытой печати [*Ohnishi et al., 2002; Tauch et* *al., 2002a*], что позволило найти дополнительные возможности, позволяющие улучшить продукцию методами генетической инженерии. За последние десятки лет было сконструировано множество векторов для молекулярного клонирования и осуществления других генетических манипуляций в *C. glutamicum* [*Kirchner and Tauch, 2003*].

Увеличение активности генов пути биосинтеза конечного продукта, как правило, является обязательным этапом в процессе конструирования высокопродуктивных штаммов. Одним из простейших решений этой задачи является клонирование целевых генов на автономно поддерживающуюся в *C. glutamicum* мультикопийную плазмиду или интеграция их в хромосому в нескольких копиях. Поскольку существующие в большинстве развитых стран законодательные ограничения запрещают использование плазмид при создании промышленных продуцентов биологически активных веществ, то приоритетное значение имеет дальнейшее развитие методов конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов.

В настоящее время различные подходы были разработаны с целью интеграции определенных фрагментов ДНК в хромосому *C. glutamicum*. Встраивание гетерологичной ДНК в хромосому *C. glutamicum* в основном осуществляется по механизму гомологичной рекомбинации в места, нарушение которых не влияет на жизнеспособность клетки с использованием специально сконструированных интегративных векторов. Для интеграции фрагментов рекомбинантной ДНК в специфические сайты *C. glutamicum* генома были разработаны интегративные вектора, содержащие необходимые ДНК последовательности коринефагов [*Le Marrec et al.*, 1994; *Moreau et al.*, 1999а,b]. Кроме того, мини-транспозоны осуществляют интеграцию фрагментов ДНК в случайные места на хромосоме с использованием «cut-and-past» механизма (miniTn31831,Tn5-based; Tn13655) [*Suzuki et al.*, 2006; *Tsuge et al.*, 2007].

Однако низкая эффективность встраивания гетерологичных генов из-за наличия мощной системы рестрикции в клетках *C. glutamicum*, а также ограниченное количество сайтов-мишеней, а, следовательно, интегрируемых в хромосому *C. glutamicum* копий целевых генов является недостатками всех вышеперечисленных методов. Кроме того, для осуществления последовательной интеграции нескольких копий одного или нескольких генов требуется существенно увеличенное время и, как

6

правило, усложнение процедуры. Поэтому дальнейшее улучшение генноинженерных инструментов является актуальной задачей на данном этапе.

В этой связи, нам представляется, что система интеграции-амплификации, базирующаяся на транспозиции бактериофага Mu *in vivo*, может оказаться для штаммов *C. glutamicum* методом, способным помочь преодолеть описанные трудности. Ведь, как известно, преимуществом системы интеграции генов с помощью Mu транспозиции, осуществляемой *in vivo*, является не только низкая ее специфичность к выбору точки интеграции, но и множественность процесса, а, следовательно, возможность отбора необходимого количества копий нужного гена сразу на первом этапе за счет независимой интеграции нескольких копий или внутрихромосомальной амлификации исходно интегрированной единственной копии.

Так, двухкомпонентная система транспозиции фага Mu оказалась весьма удобным эффективным генетическим инструментом для интеграции целевой ДНК в геном грамотрицательных бактерий, особенно для организмов, для которых еще не разработано мощного и универсального метода редактирования генома, аналогичного λ Red/RecET-зависимого метода Recombineering для *E. coli* и некоторых других грамотрицательных бактерий [*Datsenko and Wanner*, 2000; *Sawitzke et al.*, 2007].

Поэтому адаптация метода интеграции гетерологичных генов в хромомсому *C*. *glutamicum* с помощью транспозиции Mu *in vivo*, нам представлялось, может стать достаточно эффективным инструментом в дальнейшей работе при конструировании продуцентов на базе *C. glutamicum*.

Цель и задачи работы.

Целью настоящей диссертационной работы была разработка новых генноинженерных подходов модификации бактериального генома *C. glutamicum*, требуемой для конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов-продуцентов.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать возможность адаптации системы репликативной транспозиции бактериофага Ми для интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *C. glutamicum*, в том числе:

• осуществить конструирование хелперных плазмид, содержащих гены

7

факторов транспозиции MuA, MuB в составе вектора, способного к репликации в клетках *C. glutamicum*;

• исследовать возможность использования ранее сконструированной для *M. methylotrophus* AS1 интегративной плазмиды в качестве донора транспозиции целевых генов в хромосому *C. glutamicum*;

• изучить влияние энхансерной последовательности Е бактериофага Ми на эффективность интеграции и амплификации mini-Mu единицы в хромосоме *C*. *glutamicum*.

2. Разработать систему, позволяющую осуществить стабильную интеграцию и последующую амплификацию рекомбинантной ДНК в хромосоме бактерии быстро и с высокой эффективностью, с получением на конечном этапе безмаркерных рекомбинантных штаммов:

• сконструировать интегративные плазмиды с вырезаемыми ДНКэлементами, облегчающими отбор на всех этапах транспозиции;

• осуществить интеграцию, амплификацию и фиксацию нескольких копий различных mini-Mu единиц в хромосоме *C. glutamicum*;

• оценить стабильность сконструированных штаммов.

Научная новизна и практическая значимость работы.

Двухплазмидная система транспозиции бактериофага Ми впервые успешно адаптирована для целей интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *C*. *glutamicum in vivo*.

Установлено, что основным механизмом функционирования mini-Muтранспозона в клетках *C. glutamicum* в рамках данной системы является репликативная транспозиция, с использованием которой может быть осуществлена амплификация интегрированных фрагментов ДНК в бактериальном геноме.

Показано, что наличие энхансерной последовательности фага Е в составе mini-Mu транспозона существенно увеличивает эффективность транспозиции в хромосоме *C. glutamicum*, что позволило разработать и осуществить стратегию последовательной интеграции/амплификации/фиксации необходимого числа копий нескольких целевых генов в хромосоме *C. glutamicum*.

Данная система представляет собой удобный генетический инструмент, прикладным значением которого является конструирование бесплазмидных безмаркерных штаммов-продуцентов биологически активных веществ.

Разработанный генетический инструментарий был успешно использован в работах НИИ «Аджиномото-Генетика» при конструировании штаммов *C. glutamicum* - продуцентов некоторых аминокислот.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ми-зависимая система транспозиции рекомбинантной ДНК в бактериальную хромосому, разработанная ранее для *E. coli* и некоторых других грамотрицательных бактерий, была модифицирована и впервые использована для интеграции mini-Mu элементов ДНК в геном трех штаммов грамположительных *Corynebacterium glutamicum* с последующей их амплификацией и фиксацией положения в геноме. Эта система включает три рекомбинантные плазмиды:

• «хелперную», обеспечивающую экспрессию генов MuAB факторов транспозиции, способную к автономной репликации в клетках *C. glutamicum*, но удаляемую из популяции в неселективных условиях культивирования;

 «интегративную», с условно зависимой репликацией, содержащую фланкированный L и R концами ДНК фага Mu интегрируемый ген и селективные маркеры – mini-Mu(LR) элемент, и дополнительно энхансер E – mini-Mu(LER) элемент, причем весь mini-Mu(LER) элемент за исключением целевого гена с флангами MuL/R может быть удален Cre-рекомбиназой фага P1;

•«хелперную», обеспечивающую экспрессию гена *cre* фага P1, способную к автономной репликации в клетках *C. glutamicum*, но утрачивающуюся в неселективных условиях культивирования.

2. Интеграция mini-Mu элемента в хромосому бактериальной клетки в условиях экспрессии генов MuAB с «интегративной» плазмиды может происходить, в основном (более 95% случаев), по механизму репликативной транспозиции с образованием коинтеграта и последующим возможным его RecA-зависимым разрешением. При этом частота интеграции зависит от штамма-реципиента, оптимизированных условий электротрансформации и составляет $\approx 2 \cdot 10^{-4}$ на клетку штамма ATCC13869.

9

3. Эффективность репликативной транспозиции mini-Mu(LER) элемента в условиях экспрессии факторов MuAB в клетках коринебактерий зависит от присутствия и ориентации Е. Присутствие Е существенно повышает эффективность транспозиции, особенно при амплификации *in vivo* в хромосоме, имеющей сниженную плотность суперспирализации вследствие взаимодействия с клеточными белками. Это позволило реализовать стратегию фиксации интегрированных и амплифицированных mini-Mu(LER) элементов через преобразование их в неспособные к амплификации в используемых условиях mini-Mu(LR) элементы в результате Cre-зависимого вырезания *in vivo* их E-содержащих ДНК фрагментов.

4. Конструирование штаммов, производных АТСС 13869, содержащих одновременно в хромосоме различное количество копий двух генов желтого и зеленого флуоресцентных белков, тестируемых генетическими методами, флуоресценцией и Саузерн-гибридизацией, явилось демонстрацией разработанной стратегии.

5. Дополнив новыми элементы ранее разработанную при участии автора систему интеграции/амплификации mini-Mu элементов в хромосому *Methylophilus methylotrophus* AS-1 для реализации стратегии преобразования интегрированных mini-Mu(LER) элементов в mini-Mu(LR), продемонстрирован универсальный характер системы, успешная адаптация которой была осуществлена еще для одного представителя метилотрофов – *Methylobacterium extorquens* AM1.

Степень достоверности и апробация работы

Материалы диссертации докладывались на конкурсе работ сотрудников ЗАО «АГРИ» (июнь 2017), на Международной научной конференции (Лиссабон, Португалия, декабрь 2010), были представлены в постерном сообщении на 12-ом Международном симпозиуме по «Метаболической инженерии» (Мюнхен, Германия, июнь 2018).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corynebacterium glutamicum - важный объект биотехнологии

1.1 Общая характеристика Corynebacterium glutamicum

Под влиянием увеличивающей потребности в глутамате в качестве вкусовой добавки к пище целая программа, направленная на изоляцию почвенных микроорганизмов, позже отнесенных к *Corynebacterium glutamicum*, способных накапливать глутамат в ростовой среде (до 10 г на литр), была осуществлена в Японии в 1956 году [*Kinoshita et al.*, 1957; *Udaka*, 1960]. Впоследствии обнаружение высокой секреции глутамата при ограниченном содержании биотина в среде предоставило возможность использовать этот штамм в промышленном масштабе. До открытия этой бактерии аминокислоты получали исключительно методами химического синтеза и экстракции.

Вид Corynebacterium glutamicum по современной систематике, а также по классификации Берджи входит в род Corynebacterium, семейство Corynebacteriaceae, порядок Actinomycetales, класс Actinobacteria, тип Actinobacteria, домен Бактерии [Bernard, 2015]. Род Corynebacterium включает около 88 видов фенотипически различных групп бактерий. Часть из них являются патогенами животных и растений, в то время как другие, питающиеся мертвой органикой, относятся к сапрофитам. Коринебактерии занимают различные биотопы тела человека и животных, их выделяют из сыра, молока, почвы, овощей и фруктов. Коринебактерии могут разлагать соединения, не использующиеся большинством других микроорганизмов (углеводороды, гумус, лигнин, синтетические вещества, такие как гербициды, инсектициды и др.) и поэтому играют существенную роль в процессах превращения веществ биосферы, содержащих углерод и азот. Многие представители этих бактерий имеют большое значение для промышленности и сельского хозяйства.

Коринебактерии обычно неподвижные, неспорообразущие, кислотонеустойчивые бактерии. Клетки микроорганизма имеют форму прямых или слегка изогнутых палочек с заостренными, иногда булавовидными концами, размером 0,3-0,8×1,5-8,0 мкм, грамположительные, хотя некоторые клетки окрашиваются неравномерно. Клеточная оболочка состоит из внешнего слоя и сложноорганизованной клеточной стенки. Внешний слой (S-слой) состоит из свободных полисахаридов, гликолипидов и белков (S-поверхностного белка, пилей и других поверхностных белков). Клеточная стенка коринебактерий имеет уникальное многослойное строение. Основным ее компонентом является комплекс, включающий ковалентно связанные между собой пептидогликан, арабиногалактан и миколовые кислоты. Типичная двухслойная мембраноподобная структура, состоящая из миколовых кислот и гликолипидов, формирует аналогичный наружной мембране грамотрицательных бактерий второй барьер проницаемости и является главной особенностью клеточной стенки этих бактерий. Пориноподобные белки пронизывают этот слой, образуя каналы, обеспечивающие диффузию небольших гидрофильных молекул в клетку. Цитоплазматическая мембрана, являющаяся основным диффузным барьером клетки, состоит из фосфолипидов, образующих липидный бислой, содержащий также другие полярные липиды, жирные кислоты и разнообразные белки [*Puech et al.*, 2001; *Bayan et al.*, 2003].

На сегодняшний день вид *Corynebacterium glutamicum* является хорошо изученной почвенной бактерией. *C. glutamicum* – это факультативно-анаэробная бактерия, поскольку может расти в анаэробных условиях только в присутствии таких терминальных акцепторов электронов, как нитраты, но высокой клеточной плотности достигает только при культивировании в аэробных условиях. Геном ее представлен одной хромосомой с умеренным или высоким G+C составом и несколькими плазмидами [*Vert`es A. et al.*, 2012]. Такие характеристики, как отсутствие патогенности, неспособность к спорообразованию, быстрый рост, относительно малые требования для своего развития, отсутствие склонности к внеклеточной секреции протеазы и относительно стабильный геном, делают *C. glutamicum* чрезвычайно полезной для целей биотехнологии, главным образом, в качестве продуцента аминокислот.

Широкий анализ молекулярной генетики, физиологии и биохимии *C*. *glutamicum* явился богатым источником информации о многих ферментах и метаболических путях, функционирующих в этом организме.

Транспорт в клетку сахаров, таких как глюкозы, фруктозы, сахарозы или маннозы осуществляется посредством фосфотрансферазной системы. Также для транспорта глюкозы в клетку существует альтернативный путь через внутриклеточное фосфорилирование глюкокиназой [*Wittmann*, 2010]. Преимуществом *C. glutamicum* также является возможность совместного использования различных источников углерода. Например, обнаружена ко-утилизация с глюкозой ацетата, фруктозы, лактата или пирувата [*Zahoor et al.*, 2012].

C. glutamicum может также утилизировать широкий спектр органических соединений в качестве единственного источника углерода и энергии, например, моносахариды (рибозу), дисахариды (маннозу, мальтозу), спирты (инозитол или этанол) и разные органические кислоты (пировиноградную, пропионовую, молочную, уксусную, лимонную и глюконовую кислоты), а также некоторые аминокислоты (Lглутамат и L-глутамин) [*Wittmann*, 2010].

Для роста и продукции аминокислот клеткам, кроме углерода, необходимы азот и сера (для суперпродукции метионина). Подходящими источниками азота являются ионы аммония и органические соединения, такие как мочевина или аминокислоты. Для поглощения аммония клетки *C. glutamicum* используют две альтернативные системы. При высокой концентрации иона аммония ассимиляция осуществляется, главным образом, глутаматдегидрогеназой, а при низкой концентрации энергетически более затратной высокоаффинной системой, состоящей из глутаминсинтетазы и глутаматдегидрогеназы. В качестве источника серы в основном выступают неорганические сульфаты. Кроме того, *C. glutamicum* могут потреблять другие источники серы, такие как цистеин, сульфонат и их эфиры [*Wittmann*, 2010]. В промышленном производстве в качестве источника углерода, в основном, используются среды на основе мелассы (Азия) и крахмала (Америка, Европа) вместе с неорганическими солями [*Wittmann and Becker*, 2007].

1.2 Центральный метаболизм углерода и пути биосинтеза основных продуктов биотехнологии

На сегодняшний день центральные метаболические пути *C. glutamicum*, включающие путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЭМП) (часто ошибочно называемого гликолизом, однако в биохимии под гликолизом понимают совокупность химических реакций всех метаболических путей данного организма, приводящих глюкозу в пируват [*Stephanopoulosetal.*, 1998]), пентозофосфатный путь (ПФП), цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), а также анаплеротические реакции и реакции глюконеогенеза хорошо известны (Рисунок 1). Различные ферменты участвуют в реакциях взаимопревращения углерода между интермедиатами ЦТК (малат/осалоацетат) и ЭМП пути (пируват/фосфоенолпируват(ФЕП)).

Пополнение пула расходуемых на строительство биомассы интермедиатов ЦТК происходит посредством двух анаплеротических реакций, в ходе которых карбоксилирование интермедиатов ЭМП пути -пирувата и фосфоенолпирувата до оксалоацетета (интермедиат ЦТК) катализируют пируваткарбоксилаза (продукт гена *рус*) и ФЕП-карбоксилаза (продукт гена *ppc*), соответственно. Малик-фермент (продукт гена malE) и ФЕП-карбоксикиназа (продукт гена pck) катализируют реакции декарбоксилирования, тем самым осуществляя переход от ЦТК к гликолизу. Дополнительными ферментами глюконеогенеза являются оксалоацетат декарбоксилаза (продукт гена odX) и ФЕП-синтетаза (продукт гена *pps*). Кооперативное взаимодействие карбоксилирующих и декарбоксилирующих ферментов на уровне пирувата необходимо для поддержания избытка АТФ в клетке. Многие биосинтетические реакции сопряжены с использованием НАДФН в качестве кофактора. Основную же роль в снабжении клеток НАДФН выполняют ферменты глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (продукт гена zwf), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (продукт гена gnd) окислительной части ПФП и изоцитратдегидрогеназа ЦТК, а в отдельных случаях может быть вовлечен и малик-фермент. Процессы анаболизма также исследованы. Информация о потребностях в предшественниках, участвующих в нем, была получена. В общей сложности около 16.4 ммоль НАДФН на 1г биомассы расходуется на анаболизм. Это конкурирует с требованием в НАДФН при суперпродукции этими бактериями промышленно значимых количеств лизина и метионина, поскольку в аэробных условиях культивирования C. glutamicum образуется 1,7 моль НАДФН на 1моль глюкозы в реакциях ПФП и ЦТК при выходе 0,5 г сухой биомассы на 1г глюкозы [Wittmann, 2010].



Рисунок 1- Центральные метаболические пути углерода в *C. glutamicum* [Согласно *Wittmann*, 2010]

Анализ важных для биотехнологического применения штамма метаболических путей позволил сконструировать эффективные продуценты аминокислот, применяя методы классической генетической инженерии, предполагающей использование нескольких раундов случайного мутагенеза и селективного отбора [*Demain*, 2000]. Глутамат, ароматические аминокислоты и аминокислоты, принадлежащие к семейству аспартата, являются самыми важными продуктами промышленного производства. Биосинтез этих аминокислот тесно связан с центральным метаболизмом. Требования предшественников, кофакторов и энергии, поставляемых в необходимых количествах центральными катаболическими путями, здесь конкурируют с требованиями клетки для роста. Поэтому многочисленные регуляторные механизмы необходимы для обеспечения сбалансированного синтеза всех этих метаболитов для клеточных нужд (Рисунок 2).

Особую проблему представляют очень длинные, сопряженные с другими путями общими промежуточными веществами и реакциями пути биосинтеза аминокислот из семейства аспартата. Здесь уже на уровне аспартилполуальдегида аспартаткиназа, катализирующая образование аспартилфосфата из аспартата, подвергается совместному ингибированию лизином и треонином по принципу обратной связи, что является ключевой точкой контроля биосинтеза лизина [*Wittmann*, 2010].Синтез метионина также включает сложные регуляторные механизмы. Так делеция глобального репрессора McbR, следствием которой является сверхэкспрессия почти всех генов, участвующих в биосинтезе метионина, не позволяет получить высокую продукцию этой аминокислоты, что предполагает существование других механизмов регуляции этого пути. Наряду с регуляцией на уровне транскрипции был обнаружен сложный и эффективный механизм ингибирования обратной связью в пути биосинтеза метионина [*Wittmann*, 2010]. Аналогичная сложная регуляция путей биосинтеза ароматических аминокислот, как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции осуществляется в клетках *С. glutamicum* (Рисунок 2).

Из-за этих препятствий дальнейшей успех методов классической генетики по поиску еще более совершенных желаемых вариантов оказался неэффективным [Vertes et al., 2005].



Рисунок 2 - Пути биосинтеза аминокислот -основных продуктов биотехнологии [Согласно *Wittmann*, 2010]

1.3 Современные подходы рационального дизайна продуцентов C. glutamicum

В 1990-х годах появилась новая технология, получившая название «метаболическая инженерия», основанная на анализе механизмов регуляции ферментов ключевых путей метаболизма и, как следствие, возможности управлять этим процессом. А разработка рекомбинантных ДНК-технологий, позволяющих вести целенаправленную генетическую модификацию, положила начало интенсивным исследованиям в направлении рациональной оптимизации *C. glutamicum* и созданию эффективных продуцентов аминокислот [*Sahm et al.*, 2000; *Eggeling et al.*, 1997].

Однако взаимосвязь многих биологических механизмов, таких как поглощение сахара и секреция продукта, гликолиз и ЦТК, избыточность многих путей наряду с устойчивостью клеточного метаболизма, посредством чего система регулируется в ответ на изменения в окружающей среде, создает барьер к достижению оптимизации промышленных процессов. Поэтому для генерирования идеи и концепции изменения метаболизма бактерии с целью конструирования высокопродуктивных производственных штаммов важно иметь целостное представление о метаболизме *C. glutamicum*, рассматривать его как сложную систему метаболических и регуляторных весьма взаимосвязанных реакций. Разработка системных подходов, направленных на управление ключевыми метаболическими путями, привела к накоплению в культуральной жидкости других аминокислот, таких как лизин, аргинин, треонин, орнитин изолейцин, валин, серин, триптофан, фенилаланин и гистидин [*Ikeda*, 2003].

Важнейшей вехой на пути к системному подходу явилось секвенирование генома *C. glutamicum* ATCC 13032. Кольцевой геном содержит около 3000 генов с общим размером 3,3 кб. Публикация полного сиквенса генома [*Ohnishi et al.*, 2002; *Tauch et al.*, 2002а] привела к ускоренному развитию новых высокоэффективных постгеномных технологий, позволяющих осуществить системный анализ клетки, охватывающий ее физиологию с разных позиций. Информация, извлекаемая из омиксанализов (транскриптомика, протеомика, метаболомика), сейчас может предсказывать новые цели метаболической инженерии или редизайн ферментативных стратегий, которые сложно определить интуитивно. Глобальная транскриптомика позволяет осуществить сравнительный анализ родительского, мутантного или рекомбинантного штамма с улучшенными производственными характеристиками. Транскриптомика дает представление о молекулярных механизмах, ответственных за повышение продукции, которые, как правило, не очевидны в штаммах, полученных случайным мутагенезом и селекцией. Так было обнаружено, что в основе эффективной секреции лизина промышленного штамма B-6 лежит регуляторный механизм гена *lysC* (аспартаткиназа) и других генов биосинтеза аминокислоты [*Hayashi*, 2006; *Ikeda et al.*, 2006b]. Глобальное исследование транскриптома клеток продуцента лизина ATCC 13287, культивируемых на минимальной среде в условиях аэрации, выявило, что переход от роста к продукции лизина сопровождается повышенной экспрессии генов, ответственных за поглощение глюкозы, тогда как уровень экспрессии генов, кодирующих АТФ-синтазу, ферменты ПФП (глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, 6-фосфоглюконат дегидрогеназу, транскетолазу, трансальдолазу) и ЦТК (цитратсинтазу, оксоглутаратдегидрогеназу, связанную с мембраной малатдегидрогеназу), снижается [*Krömer et al.*, 2004].

Протеомика позволяет охарактеризовать рекомбинантный штамм или подтвердить результаты транскриптомики, поскольку наличие транскрипта не означает обязательную с него трансляцию и не позволяет однозначно говорить о структуре белка, его созревании и локализации. Так протеомный анализ продуцента L-лизина DM1730 обнаружил, что в этом штамме пируваткарбоксилаза имеет точечную мутацию, вследствие чего увеличивается запас оксалоацетата, являющегося предшественником лизина. Интересно, что экспрессия этого фермента снижается, когда клетки начинают продуцировать лизин. Уровень экспрессии глюкозы-6-фосфат дегидрогеназы также падает, что ведет к уменьшению потока через ПФП, таким образом, увеличивая поток на ЦТК, а в конечном итоге на синтез лизина. Кроме того, данные протеомики могут предсказать способ оптимизации ферментационных сред. Например, было обнаружено, что в условиях эксперимента продуцент лизина DM1730 по сравнению с родительским штаммом страдает от дефицита железа и окислительного стресса [*Fränzel et al.*, 2010].

Метаболомика изучает химические процессы, в которые вовлечены метаболиты и может дать мгновенный снимок физиологических процессов в клетке. Метабо-

19

ломный анализ продуцента L-лизин *C. glutamicum* ATCC 13287, например, обнаружил, что инициация продукции лизина происходит приблизительно на 30 мин раньше, чем внеклеточное накопление лизина, связанное с индукцией экспортера лизина. Анализ также выявил, что переход от роста к продукции лизина сопровождается резким изменением внутриклеточных пулов аминокислот, тогда как во время продукции лизина и до окончания культивирования внутриклеточные концентрации аминокислот остаются относительно постоянными [*Krömer et al.*, 2004]. Исследования метаболомики в сочетании с транскриптомным анализом привели к открытию, что метаболизм азота, контролируемый на уровне транскрипции глобальным регулятором AmtR, и биосинтез L-лизина связаны через регуляцию экспрессии гена *dapD*, кодирующего сукцинилазу, участвующую в синтезе м-диаминопимелиновой кислоты. А пути метаболизма азота и углерода связаны через регуляцию активности маликфермента [*Buchinger et al.*, 2009].

Флуксомика является одним из направлений метаболомики, изучающим распределение потоков атомов исходных субстратов в продукты жизнедеятельности клеток. Начиная с 60-х годов XX века и до настоящего времени *C. glutamicum*, вероятно, является наиболее широко изучаемым организмом в этой области. Исследования *C. glutamicum* с использованием стабильных изотопов, результатом которых стала первичная оценка путей центрального метаболизма и открытие двойного пути биосинтеза лизина в *C. glutamicum*, были начаты вскоре после его выделения [*Wittmann*, 2010]. В последние годы были разработаны мощные подходы, из которых одним из самых развитых является метод ¹³С-MFA, основанный на проведении экспериментов с использованием субстратов, меченных тяжелыми ¹³С-изотопами углерода, которые позволяют осуществить количественную оценку потоков *in vivo* в квазистационарных условиях для индивидуальных путей. Идентификация тяжелых изотопов углерода и их углеродных соседей в конкретных позициях аминокислот проводится при помощи двумерной [¹H-¹³C]-ЯМР-спектроскопии и хромато-массспектрометрии.

Анализ потоков является мощным методом обнаружения узких мест и мишеней с целью последующей метаболической инженерии в направлении улучшения выхода продукции в *C. glutamicum*. Так анализ метаболического потока выявил, что в штамме *C. glutamicum* ATCC 13032, содержащем мутантный ген *lysC*, кодирующий устойчивый к ретроингибированию фермент, сверхэкспрессия генов *zwf* (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) и *fbp* (фруктоза 1,6-бисфосфатаза) ведет к увеличению потока через ПФП и, таким образом, к повышению продукции лизина на 70% [*Becker et al,*. 2011; Wittmann and Becker, 2007].

Участие относительно большого количество ферментов в узле ФЕП/ пируват делает его критической точкой метаболизма. Поставки ключевых продуктов ЦТК оксалоацетата и малата обеспечиваются анаплеротическими реакциями (Рисунок 1). Так, во время перехода от роста к продукции лизина в клетках ферментируемого в условиях аэрации на минимальной среде с глюкозой штамма C. glutamicum ATCC 13287 фиксируется повышенный анаплеротический поток вокруг пируватного узла, что соответствует большой потребности в оксалоацетате на этой стадии ферментации [Krömer et al., 2004]. Поэтому для увеличения продукции лизина целью генетической инженерии являются ферменты, способствующие накоплению его предшественника – оксалоацетата, и в частности пируваткарбоксилазы (Рус) и ФЕПкарбоксикиназы (Pck), возвращающей две трети анаплеротически синтезированного оксалоацетата в ФЕП [Vert'es et al., 2012]. Так инактивация гена pck ведет к увеличению накопления лизина клетками C. glutamicum MHB20-22B, выращенными на глюкозе в условиях аэрации, на 20%, а снижение активности пируватдегидрогеназного комплекса – на 40% в С. glutamicum DM1729 [Vert`es et al., 2012]. Эксперименты с использованием изотопной метки показали, что распределение потоков между основными анаплеротическими карбоксилазами (ФЕП-карбоксилазой (Ррс) и пируваткарбоксилазой (Рус)) в клетках, выращенных на глюкозе при аэрации, составляет 10/90, однако ФЕП-карбоксилаза является основным анаплеротическим ферментом при инкубации C. glutamicum клеток в условиях кислородного голодания [Vert`es et al., 2012].

Тесная связь между анаплеротическим пополнением ЦТК и продукцией также наблюдается для биосинтеза глутамата, который требует α-кетоглутарат в качестве предшественника. Результаты указывают, что α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс играет огромную роль в управлении потоком в ключевой точке ветви α-кетоглутарата, поскольку активность α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса

значительно снижается при индукции продукции глутамата, что приводит к перераспределению потоков [*Wittmann*, 2010].

Анализ элементарных потоков и дополнительное моделирование выявило перспективные цели модификации генома *C. glutamicum*, направленные на повышение выхода метионина, такие как экспрессия гетерологичных генов трансгидрогеназы или генов системы расщепления глицина. Было также показано, что использование восстановленной серы ведет практически к полному превращению глюкозы в метионин [*Krömer et al.*, 2006].

Исследования потоков с целью выяснения физиологии *C. glutamicum*, выращенного на глюкозе или фруктозе, а также сахарозе, показывают, что *C. glutamicum* имеет большую метаболическую гибкость. Это важно для промышленного производства, так как клетки *C. glutamicum* должны приспосабливать свой метаболизм к изъятию предшественников для синтеза целевых продуктов, таких как аминокислоты [*Vert`es et al.*, 2012]. Этот подход также может привести к открытию новых внутриклеточных реакций. Каноническим примером может служить компенсация дефицита пируваткиназы, которая преобразует ФЕП в пируват (Рисунок 1) путем активации обходного пути с участием ФЕП-карбоксилазы, малатдегидрогеназы и маликфермента, которые в конечном счете преобразовывают ФЕП в пируват, сохраняя другие потоки практически неизменными [*Becker et al.*, 2008].

Инженерный подход для анализа и проектирования заключается в использовании математического или компьютерного моделирования, с помощью которых предсказывают *in silico* функционирование клетки на основе взаимосвязи и взаимодействия всех клеточных компонентов. Системная биология, пожалуй, является лучшим количественным анализом биологических систем, использующим прогнозируемые математические модели метаболических процессов, полученные на основе анализа глобальных биологических данных [*Vert`es et al.*, 2012]. Она стала неизбежным инструментом для манипулирования клеточными функциями. Реконструкция метаболической сети в масштабах генома с целью конструирования или открытия новых свойств клеточной метаболической сети, включающей ее регуляторные компоненты, задействует стехиометрическое моделирование (метаболиты, направленность, ферменты, анализы баланса потока, ограничения, рабочие диапазоны) и кинетическое моделирование (метаболиты, направленность, время продукции и потребления соединения).

На сегодняшний день с началом эры секвенирования целых геномов реконструкция сетей биохимических реакций стала возможной для многих организмов. Так несколько полномасштабных геномных моделей метаболической сети было построено *in silico* для штамма *C. glutamicum* ATCC 13032, одна из которых включает 502 реакции и 423 метаболита [*Shinfuku et al.*, 2009], а другая охватывает 446 реакций и 411 метаболитов [*Kjeldsen and Nielsen*, 2009]. Анализ стационарных метаболических потоков, составленный на основе этих расчетов, показал удовлетворительную корреляцию между моделируемыми и биологическими данными, такими как, например, поток через ПФП в первой из двух моделей.

Большое количество моделей построено на результатах анализа метаболических потоков (Flux Balance Analysis - FBA). С их помощью, например, было предсказано, что при кислородном голодании нарушение пути биосинтеза сукцината, некоторых реакций ПФП или H⁺-АТФазы приводит к увеличению выхода лактата [*Shinfuku et al, 2009*], а нарушение пути биосинтеза лактата ведет к эффективной продукции сукцината, что было подтверждено экспериментальным путем [*Inui et al.,* 2004b]. К.R. Kjeldsen and J. Nielsen, использовав реконструкцию полногеномных карт *in silico*, продемонстрировал корреляцию между высокой скоростью реакций в ПФП, необходимой для генерации НАДФН, и высоким выходом лизина, что опять же согласуется с наблюдениями *in vivo*.

Метод стехиометрического моделирования был использован для оценки возможностей *C. glutamicum* как продуцента одного из основных промышленных продуктов – лизина. Моделирование с целью достижения максимального выхода лизина при ограниченном росте биомассы сформировало несколько полезных гипотез развития метаболической инженерии. Так модель прогнозирует максимальный выход лизина 75% в отсутствии синтеза биомассы (максимальное теоретическое значение для *C. glutamicum* составляет 75-82%), что можно достигнуть в условиях лимита по ATФ [*Vert`es et al.*, 2012]. Кроме того, модель демонстрирует, что снижение потоков через ЦТК, приводящих к высоким потерям углерода вследствие образования CO_2 , может повысить продукцию лизина. Эта гипотеза была подтверждена экспериментально. Так замена сильного ATG инициирующего кодона на редкий GTG кодон в гене, кодирующем изоцитратдегидрогеназу, привела к снижению активности фермента на 70% и увеличила продукцию лизина более чем на 40% [*Becker et al.*, 2009].

Кинетические модели реакционных сетей также начали приносить ощутимые результаты. Такие модели позволяют прогнозировать узкие места и оптимальные факторы, например, необходимую концентрацию ферментов для увеличения потока в направлении биосинтеза целевого продукта. Например, для производного С. glutamicum ATCC 13032 штамма была построена кинетическая модель управления потоком пути биосинтеза валина – лейцина из пирувата, базирующаяся на балансе участвующих в реакциях ферментов и концентрации метаболитов. Модель демонстрирует, что для конструирования высокопроизводительного продуцента валина необходима оптимизация синтеза пирувата, увеличение внутриклеточной концентрации НАД Φ и высокая экспрессия генов биосинтеза валина [Vert'es et al., 2012]. Интересная гипотеза предполагает, что 20% увеличение доступности пирувата может привести к увеличению скорости образования валина на 150%, таким образом, выделяя несколько потенциальных целей метаболической инженерии [Magnus et al., 2009]. Так нарушение одного гена aceE (кодирует компонент пируватдегидрогеназного комплекса) значительно увеличит продукцию валина с неопределяемого уровня до 30-35 мМ, тогда как дополнительное удаление pqo, pgi (кодируют хинонзависимую пируватдегидрогеназу и глюкозо-6-фосфат изомеразу) и рус, а также сверхэкспрессия *ilvBNCE* кластера, приведет к продукции 410 мМ L-валина. Модель также предположила, что транслоказа, ответственная за экспорт валина, оказывает сильное влияние на метаболический поток валина. Эта задача может быть решена методами технологического проектирования – снизить внеклеточную концентрацию валина и, таким образом, уменьшить влияние градиента.

Системная биология на основе прогнозируемых геномных и кинетических моделей промышленных штаммов, а также карты протеома позволяют оценить новые генетические манипуляции *in silico* до их перевода в биологическую систему не только с точки зрения биологической, но и экономической эффективности. Метаболическое моделирование *C. glutamicum* позволяет рассчитать максимальный теоретический потенциал производства конкретного метаболита, что дает возможность произвести оценку экономической целесообразности процесса.

Таким образом, математические модели разных уровней и базы данных о генах, ферментах, регуляции метаболической сети позволяют понять физиологию и выработать генно-инженерные стратегии для конструирования новых, более совершенных в биотехнологическом смысле штаммов, создание которых не представляется возможным на основании анализа исключительно на уровне одного гена или пути.

1.4 Основные продукты, получаемые с использованием *C. glutamicum*, и перспективы использования этого микроорганизма в биотехнологии

В настоящее время *C. glutamicum* имеет большое значение в области биотехнологии, в частности, для ферментативного производства L-аминокислот для нужд пищевой и кормовой промышленности. Ежегодно производят до 3.0 миллионов тонн популярного в мире «усилителя вкуса» L-глутамата, около 2 миллиона тонн пищевой добавки L-лизина и 15 тысяч тонн нуклеотидов, используя оптимизированные модифицированные штаммы [*Becker et al.*, 2011; *Wendisch et al.*, 2016].

Текущие исследования нацелены на разработку эффективных процессов производства новых продуктов, включая другие аминокислоты, D-аминокислоты, диамины (кадаверин или путресцин), органические кислоты (α-кетоизовалериат, αкетоглутарат, шикимат, сукцинат, лактат, итаконат) и белки [*Hochheim*, 2017; *Zahoor et al.*, 2012; *Wendisch et al.*, 2016; *Wieschalka et al.*, 2013].

С. glutamicum является перспективным альтернативным хозяином для производства биотоплива. Описана эффективная продукция этанола C. glutamicum экспрессией Zymomonas mobilis генов pdc и adhB, кодирующих пируватдекарбоксилазу и алкогольдегидрогеназу, соответственно, в условиях кислородного голодания [Zahoor et al., 2012]. Кроме того, конкурентоспособный продуцент изобутанола был создан на базе рекомбинантного C. glutamicum штамма, демонстрирующий меньшую токсичность к изобутанолу, чем штаммы E. coli [Zahoor et al., 2012]. Также было показано, что экспрессия E. coli генов gldA, mgsA, yqhD, кодирующих глицеролдегидрогеназу, метилглиоксаль синтазу, и альдегидредуктазу, соответственно, в клетках

C. glutamicum с одновременной делецией *C. glutamicum* генов *hdpA* и *ldh*, кодирующих дигидроксиацетонфосфат фосфатазу и лактатдегидрогеназу, соответственно, приводит к продукции 1,2-пропандиола до 0.343 моль/моль глюкозы [*Siebert and Wendisch*, 2015].

Экспрессия кластеров гетерологичных генов в *C. glutamicum* позволила сконструировать новые метаболические пути, следствием чего явилась продукция разнообразных веществ, таких как D-пантотената (витамина B5), спиртов – производных сахаров, таких как D-маннитола, ксилитола и других молекул [*Zahoor et al.*, 2012; *Wittmann*, 2010].

Экспрессия растительных белков синтеза полифенолов в клетках *C. glutamicum* привела к продукции не только стильбена и (2S) - флаванона, но и сложных флавоноидов, при этом решающее значение для разработки *C. glutamicum* штаммов, продуцирующих растительные полифенолы, имело нарушение путей деградации фенилпропаноидов и других ароматических соединений [*Kallscheuer*, 2017].

Совершенствование новых штаммов идет в направлении увеличения конверсии, продуктивности, устойчивости к стрессу и использования более широкого спектра субстратной специфичности. Глюкоза, а также сахароза и фруктоза широко используются как в промышленном производстве аминокислот, так и в пищевой промышленности, что вызывает необходимость поиска других дешевых и возобновляемых источников углерода, позволяющих снизить себестоимость производства. Поэтому основным событием в последние годы стала разработка C. glutamicum штаммов, способных использовать более широкий спектр углеродных субстратов, такие как дикарбоновые кислоты (сукцинат, фумарат, малат), метанол, различные сахара (лактоза и галактоза), отходы лигноцеллюлозы (ксилоза, арабиноза, и содержащаяся в целлюлозной биомассе целлобиоза) [Witthoff et al., 2015; Jensen, 2015; Zahoor et al., 2012; Wendisch et al., 2016]. Некоторые доступные, а значит интересные источники углерода не могут быть утилизированы C. glutamicum из-за отсутствия всех или части необходимых генов либо недостаточного уровня их экспрессии. Гетерологичная экспрессия E. coli генов xylA и xylB способствовала утилизации ксилозы как единственного источника углерода, а *E. coli* генов *araA*, *araB* и *araD* привело к способности клеток C. glutamicum расти на арабинозе. Введение гена S. griseus amy на векторе в штамм C. glutamicum, продуцирующий лизин, позволило синтезировать и секретировать α-амилазу в культуральную жидкость и эффективно использовать растворимый крахмал в качестве субстрата углерода и энергии для роста. Это помогло бы в дальнейшем избежать необходимую в настоящее время предварительную дорогостоящую обработку крахмала. Гетерологичная экспрессия *E. coli* генов утилизации глицерола позволила *C. glutamicum* расти на глицероле, являющимся побочным продуктом производства биодизельного топлива [Wittmann, 2010]. Учитывая его уникальную способность совместно утилизировать смешанные источники углерода, С. glutamicum может быть использован для очистки отходов сельского хозяйства или других отраслей промышленности, одновременно производя при этом полезные соединения, такие как L-лизин или путресцин. В случае роста на смеси углеродных субстратов C. glutamicum первой потребляет глюкозу, а затем L-глутаминовую кислоту или этанол, а ацетат использует до этанола. Также была продемонстрирована совместная утилизация глицерина с глюкозой, ксилозы с глюкозой, арабинозы с глюкозой, ксилозы и арабинозы с глюкозой и целлобиозы вместе с ксилозой и глюкозой после введения в C. glutamicum дополнительных генов путей утилизации углерода [Zahoor et al., 2012].

1.5 Генетические методы для метаболической инженерии C. glutamicum

Обширные манипуляции функций живых клеток коринебактерий стали возможными благодаря полному набору генетических инструментов молекулярной биологии. К ним относятся не только методы эффективной электротрансформации, но и транспозонный мутагенез, инструменты для нарушения и замены гена, конститутивные или индуцибильные промоторы различной силы, а также стабильные плазмиды высокой и средней копийности для клонирования генов и их экспрессии.

Первое сообщение о разработке инструментов для проведения генетических манипуляций в штамме появилось в 1984 [*Ozaki et al.*, 1984]. Предпосылкой к развитию рекомбинантной ДНК техники с целью осуществления различных модификаций *C. glutamicum* генома стала идентификация эндогенных плазмид [*Tauch et al.*, 2003]. Степень близости аминокислотных последовательностей инициирующих реплика-

цию белков и механизма репликации (тета- (Θ) тип репликации и по типу катящегося кольца), являлись основными критериями их классификации в 4 группы [*Ilyina andKoonin*, 1992]. Базируясь на полученных знаниях по генетической организации *C. glutamicum* плазмид и данных сиквенса, осуществлено конструирование автономно реплицирующихся в клетках *C. glutamicum* векторов для разных целей.

Много векторов для клонирования генов было разработано на базе малых криптических плазмид pBL1 [Kirchner and Tauch, 2003], pCG1 [Nešvera et al., 2011] и pGA1 [Sonnen et al., 1991]. В качестве маркеров отбора трансформантов небольшое число коринебактериальных, кодирующих устойчивость к антибиотику, и несколько гетерологичных генов, экспрессирующих устойчивость к канамицину, эритромицину, блеомицину, хлорамфениколу, были клонированы в их состав. Кроме того, другие альтернативные маркеры были использованы для промышленно значимых штаммов, например, ген alr, кодирующий аланинрацемазу, позволяющий $\Delta alr C$. glutamicum клеткам расти в отсутствии D-аланина [Tauch et al., 2002b]. Также на базе устойчивых к эритромицину плазмид pNG2 (C.diphtheria), pAC1 (Acetobacter pasteurianus) и стрептомицин устойчивой плазмиды pANV-6 (Citrobacter diversus) были сконструированы вектора широкого круга хозяев [Nesvera et al., 2011].

Были разработаны новые методы трансформации, трансдукции, конъюгации и электротрансформации, поскольку стандартные методы трансформации ДНК, используемые для грамотрицательных бактерий, в основном не подходили для грамположительной бактерии *C. glutamicum*. Наиболее удобным и эффективным методом оказалась электротрансформация, так как в отличие от конъюгации для ее осуществления не требовалось конструирование специальных векторов, способных к мобилизационному переносу в клетки *C. glutamicum*, что сильно расширяло ее возможности. Добавление в среду таких соединений, как ампициллин, пенициллин G, глицин совместно с Tween 80,«ослабляющих» клеточную стенку, представляющую серьезный барьер на пути транспорта рекомбинантной ДНК, повысило компетентность клеток [*Chevalier et al.*, 1988]. Прогрев *C. glutamicum* клеток сразу после электротрансформации, использование реципиентов, имеющих дефектную систему рестрикциимодификации и мутантов с измененной клеточной стенкой [*Jang and Britz*, 2000] наряду с ДНК, синтезируемой *in vitro* с помощью ПЦР или выделенной из штамма *E.coli* (*dam^{-/dcm⁻*), имеющего дефектную систему метилирования, сильно повысило частоту электротрансформации в штаммы *C. glutamicum* [*Ankri et al.*, 1996].}

Для изучения экспрессии генов и их регуляции в *C. glutamicum* в состав плазмид были клонированы различные гены-репортеры, не содержащие промоторную область, такие как *amy*, кодирующий α-амилазу из *Streptomyces griseus* [*Cadenas et al.*, 1996], *cat*₁, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT) из Tn9 [*Morinaga et al.*, 1987; *Eikmanns et al.*, 1991], *lacZ*, кодирующий β-галактозидазу из *E. coli* [*Eikmanns et al.*, 1991], *nptII*, кодирующий аминогликозидфосфотрансферазу из Tn5 [*Bara'k et al.*, 1990; *Zupancic et al.*, 1995], *uidA*, кодирующий β-глюкоронидазу из *E. coli* [*Bardonnet and Blanco*, 1991], а также гены, кодирующие пигмент меланин из *Streptomyces glaucescens* [*Adham et al.*, 2001] и зеленый флуоресцентный белок (GFP) из медузы *Aequorea Victoria* [*Letek et al.*, 2006; *Кпорроva et al.*, 2007]. Вектор,сконструированный для клонирования транскрипционного терминатора *C. glutamicum*, содержал *uidA* ген, экспрессия которого осуществлялась с промотора криптической плазмиды pBL1 [*Bardonnet and Blanco*, 1991].

Подавляющее большинство используемых векторов для экспрессии в клетках *C. glutamicum* содержат гетерологичные индуцибильные промоторы.

Было показано, что *lac* и *trp* системы оператор-репрессор *E. coli* функционируют в *C. glutamicum*. На основании этого регулируемая экспрессионная система с использованием гена *lacI^q* и P_{tac} или P_{trc} промоторов была сконструирована [*Eikmanns et al.*, 1991; *Guillouet et al.*, 1999]. В качестве альтернативы была разработана индуцибильная в клетках *C. glutamicum* посредством теплового шока система, состоящая из экспрессионного вектора рЕС901, содержащего P_RP_L промоторы и ген c1857, кодирующий температурно-чувствительный репрессор [*Tsuchiya and Morinaga*, 1988]. Температурно-чувствительный репрессор c1857 и оператор $\lambda O_L 1$ были также использованы для контролируемой экспрессии генов, клонированных в новый *C. glutamicum* – *E. coli* шаттл вектор рСеНЕМG857 [*Park et al.*, 2008]. Кроме того, была разработана система, содержащая *E. coli* промотор P_{BAD} оперона *araBAD* и *E. coli* гены *araC* и *araE*, кодирующие активаторный белок и транспортер L-арабинозы, соответственно. Эта система позволяет осуществить строгую регуляцию экспрессии клонированных целевых генов с промотора P_{BAD} в зависимости от концентрации Lарабинозы в среде в широком диапазоне от 0,001 до 0,4% [*Zhang et al.*, 2012].

Использование собственных конститутивных промоторов для экспрессии генов в *C. glutamicum* началось относительно недавно. Сильные конститутивные промоторы *C. glutamicum*, такие как промотор гена *cspB*, кодирующий основной секретируемый белок поверхностного слоя PS-2 [*Tateno et al.*, 2007], и промотор гена *gapA*, кодирующий глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназу [*Pátek et al.*, 2013], были использованы в составе плазмидных векторов для экспрессии генов в клетках *C. glutamicum*. Для замены нативных промоторов целевых генов в хромосоме *C. glutamicum* с целью получения стабильных бесплазмидных штаммов продуцентов были использованы промотор гена *tuf*, кодирующего фактор элонгации трансляции [*Pátek et al.*, 2013], промотор гена *sod*, кодирующий супероксиддисмутазу. Обширный мутагенез промотора гена *dapA*, кодирующего дигидродипиколинат-синтазу, позволил создать широкий ряд промоторов, обладающих разной силой [*Vasicova et al.*, 1999].

Не так давно была сконструирована строго контролируемая тетрациклининдуцибельная система для экспрессии в клетках коринебактерий с использованием гетерологичного и *C. glutamicum* промоторов. Целевые гены клонируются в состав вектора pCLTON1 под контроль модифицированного промотора P_{tet} из *B. subtilis*, строгая негативная регуляция которого в отсутствии тетрациклина осуществляется TetR репрессором, экспрессия которого реализуется с сильного конститутивного *C. glutamicum* промотора P_{eapA} с той же плазмиды [*Lausberg et al.*, 2012].

Были описаны *C. glutamicum* промоторы, индуцируемые ацетатом, глюконатом, мальтозой или пропионатом [*Pátek et al.*, 2013]. Сконструирована новая индуцибильная система, основанная на сильной индукции пропионатом промотора оперона *prpDBC2*, кодирующего ферменты 2-метилцитратного цикла [*Plassmeier et al.*, 2012], в присутствии PrpR активатора. Эта система экспрессии удобна и в целях лабораторного исследования, и для промышленных производств, так как она функционирует в минимальных и сложных средах для роста и использует дешевый индуктор пропионат в очень небольших количествах (1мг/л). А поскольку индуктор потребляется клетками, транскрипция прекращается, когда индуктор исчерпан.

Нарушение или замена генов непосредственно в хромосоме C. glutamicum, основанная на гомологичной рекомбинации, является необходимым этапом в изучении функций генов и регуляции их экспрессии и осуществляется с использованием конъюгативных, интегративных векторов или кольцевых фрагментов ДНК, не содержащих репликон, называемых интегронами [Kirchner and Tauch, 2003]. Интегративные вектора в основном разработаны на базе E. coli векторов, которые не реплицируются в клетках *C. glutamicum*. Процедура введения разнообразных модификаций в геном *C. glutamicum* была значительно облегчена с использованием гена *sacB* из Bacillus subtilis в составе интегративных векторов, кодирующего левансахаразу. Токсичность экспрессирующегося гена sacB B. subtilis для клеток C. glutamicum хорошо известна и является, по-видимому, следствием сложного строения клеточной стенки коринебактерий, имитирующей как бы внешнюю мембрану, являющуюся своеобразным фильтром для левана при его SacB-зависимом «внутриклеточном» синтезе [Jäger et al., 1992]. Экспрессия sacB в присутствие сахарозы вызывает гибель клеток *C. glutamicum*, и на среде с сахарозой выживают только клоны, в хромосоме которых произошло редкое событие двойного кроссинговера [Schäfer et al., 1994]. Для этой цели были сконструированы способные к мобилизации интегративные вектора pK18mobsacB [Schäfer et al., 1994] и pESB30 [Ohnishi et al, 2002], а также улучшенный интегративный вектор pCRA725, обеспечивающий высокий уровень экспрессии гена *sacB* с сильного P-*tac* промотора [*Inui et al.*, 2004а].

Разработана система селекции, включающая плазмидный репликон, обеспечивающий репликацию только при низких температурах и ген *sacB*. Вектора pSFKT2 и pBS5T, pCRD206 [*Nesvera and Patek*, 2011], pCl2-OriTS, имеющие температурочувствительный коринебактериальный репликон вследствие мутаций в гене *rep*, могут реплицироваться в клетках *C. glutamicum* только при 25 °C, тогда как сохранение их в клетке на 34 °C возможно лишь в случае гомологичной рекомбинации клонированного в ее состав фрагмента с хромосомой [*Hochheim*, 2017].

Впоследствии комбинация техники состыковки генов (gene SOEing) [*Horton*, 1995], позволяющей осуществлять генетические манипуляции *in vitro* с помощью ПЦР, вместе с использованием гена *sacB* в качестве маркера негативного отбора, находящегося на плазмиде, позволила создать эффективный генно-инженерный инструмент для осуществления целевых замен аллелей в хромосоме *C. glutamicum* [Wehmeier et al., 2001].

Для отбора редких двойных событий гомологичной рекомбинации вместо гена *sacB* был также использован новый маркерный ген $rpsL_{mut}$, сообщающий устойчивость к стрептомицину [*Kim et al.*, 2011].

Поскольку для биотехнологических целей важно иметь варианты рекомбинантных штаммов, не содержащих плазмиды, в настоящее время разработано много способов инсерции нескольких копий гетерологичных генов в хромосому *C. glutamicum*. С этой целью используют последовательности ДНК, нарушение которых не влияет на жизнеспособность клетки. Так интеграция нужных фрагментов ДНК была осуществлена в составе интегративного вектора по механизму гомологичной рекомбинации сразу в несколько точек на хромосоме штамма АТСС 13869, используя *IS13869* последовательности в качестве мишени [*Correia et al.*, 1996]. Примером также может служить множественная интеграция сразу в несколько копий гена, кодирующего 16S rRNA [*Amador et al.*, 2000].

Разработана техника интеграции, основанная на строгой несовместимости производных pCG1 плазмид [*Ikeda and Katsumata*, 1998]. Кроме того, в литературе были описаны векторы, использующие сайт-специфические интегративные свойства коринефагов, представляющие удобный инструмент для интеграции фрагментов рекомбинантной ДНК в специфические сайты *C. glutamicum* генома. Примером могут служить интегративный вектор pA3253, содержащий минимальный локус, необходимый для интеграции умеренного коринефага φ 16 [*Moreau et al.*, 1999b], и вектор pKMO3W+mob, базирующийся на сайт-специфической рекомбинации β-фага из *C. diphtheriae* [*Oram et al.*, 2007], а также плазмиды p5510 и pA6521, содержащие необходимые генетические последовательности сайт-специфической интеграции фагов φ AAU2 и φ 304L, соответственно [*Le Marrec et al.*, 1994; *Moreau et al.*, 1999а].

Описан метод последовательного ввода нескольких генетических элементов в хромосому *C.glutamicum*, основанный на сайт-специфической рекомбинации умеренного фага лактококков ТР901-1 с использованием кодируемой фагом интегразы и специфического *attB* сайта из хромосомы *Lactococcus lactis*, первоначально интегрированного в хромосому *C.glutamicum* [*Shen et al.*, 2017]. Эта система интеграции

очень эффективна и работает в различных хозяевах, включая клетки млекопитающих [Stoll et al., 2002]. Сконструированный на базе суицидной в клетках C.glutamicum плазмиды pK18mobsacB вектор pJS31 содержал ген, сообщающий устойчивость к канамицину, генетически модифицированный ген *sacB*, а также синтетическую ДНК кассету. Кассета имела *attP* сайт фагаТР901-1 для первичной и сайт *attB* для последующих интеграций в хромосому, поскольку интеграция pJS31 и его производных приводит к потере attB сайта хромосомы. Кроме того, синтетическая ДНК кассета включала *C. glutamicum* терминатор *lysA*, множественный сайт клонирования (MCSs) и два модифицированных сайта lox66 /lox71 [Albert et al., 1995], позволяющих удалять нежелательные элементы вектора из хромосомы с помощью Cre рекомбиназы фага Р1. Экспрессия Сте рекомбиназы осуществлялась с нереплицирующегося в клетках C.glutamicum вектора с сильного C.glutamicum промотора EF-Tu [Pátek et al., 2013]. В качестве демонстрации метода был сконструирован ряд штаммов, производных АТСС 13032, содержащих одновременно в хромосоме два репортерных гена - lacZ (кодирующий в-галактозидазу) и gusA (кодирующий в-глюкоронидазу) с разными уровнями экспрессии. С помощью разработанного подхода можно ввести неограниченное количество любых генов (нативные, гетерологичные или синтетические), что позволит значительно облегчить метаболическую оптимизацию штаммов C.glutamicum.

В последние годы создаются новые инструменты для осуществления точной редакции генома коринебактерий. Недавно была разработана техника «рекомбиниринга», позволяющая быстро осуществлять замену одиночных нуклеотидов в геноме *C.glutamicum*, используя в качестве субстрата одноцепочечную (оц)-ДНК (олигонуклеотиды) и рекомбиназу RecT профага Rac *E. coli* [*Binder et al.*, 2013]. В процессе «рекомбиниринга» рекомбиназа связывается с олигонуклеотидом, спаривает его с комплементарной (оц)-ДНК в репликационной вилке [*Hall and Kolodner*, 1994] и способствует его гомологичной рекомбинации с ДНК мишенью, в ходе которой олигонуклеотид интегрируется в виде фрагмента Okazaki [*Mosberg et al.*, 2010]. Было показано, что самая высокая частота «рекомбиниринга» целевого кодона G81E гена *murE* была получена с использованием рекомбиназы RecT (4,7 рекомбинантов на 100 клеток) [*Binder et al.*, 2013]. Создана новая технология RecFACS, представляющая собой объединение (оц)-ДНК «рекомбиниринга» с разработанной технологией наносенсоров, фиксирующей сигнал сразу при введении «продуктивной мутации», которая позволила обнаружить и отобрать мутанты с повышенной продуктивностью лизина на клеточном уровне с помощью метода сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). В качестве метаболитного сенсора (pSenLys) выступил регулятор транскрипции LysG, который осуществляет активацию транскрипции гена *lysE* в ответ на увеличение концентрации L-лизина в клетке. Слияние промотора *lysE* с *eyfp* приводит к испусканию флуоресценции клетками, продуцирующими L-лизин [*Binder et al.*, 2013].

Недавно сообщалось, что «рекомбиниринг» (оц)-ДНК идет в *C. glutamicum* даже без экспрессии гетерологичных рекомбиназ [*Krylov et al.*, 2014].

В качестве метода редактирования генома был разработан «рекомбиниринг» двухцепочечной (дц)-ДНК (фрагменты ПЦР), используя систему рекомбинации RecET профага Rac *E. coli*, для которого необходим дополнительный шаг, осуществляемый 5'-3' ДНК-экзонуклеазой RecE [*Hochheim*, 2017]. Несмотря на то, что введение точечных мутаций проиходило с высокими частотами (до 1.1 $\times 10^{5/}$ мкг ДНК), полноразмерные гены не были интегрированы в нужные места генома. Углубленный анализ выявил корреляцию длины субстрата ДНК с эффективностью рекомбинации, что позволило добиться очень низкой частоты (9,8 $\times 10^{2}$ рекомбинантных клеток на 10^{10} клеток) с фрагментами длиной 700 п.н. Показано, что использование 5'-фосфорилированных фрагментов ДНК в качестве субстрата повысило эффективность (дц)-ДНК рекомбинации в 10 раз в то время как фосфоротиоация снизила эффективность ность рекомбинации в 5 раз [*Hochheim*, 2017].

«Рекомбиниринг» самовырезаемого линейного ПЦР фрагмента, содержащего Cre/loxP систему, был успешно адаптирован в хромосому продуцента аминокислот *C. glutamicum* ATCC14067 с использованием пары экзонуклеаза-рекомбиназа RecET профага Rac *E.coli*, что позволило осуществить необходимые безмаркерные делеции в хромосоме. Эффективность процесса при оптимальной длине гомологии плеч в 800п.н. составила 97-100%. [*Huang et al.*, 2017].

Следующим перспективным подходом, позволяющим успешно проводить направленные генетические модификации в большом количестве организмов и клеточных линий, является CRISPR/Cas система. Система CRISPR/Cas встречается в широком спектре бактерий и архей и функционирует как адаптивная иммунная система. Существует несколько различных систем CRISPR, одна из самых простых – система CRISPR типа II недавно нашла применение в качестве средства для целевого редактирования генома [Jensen, 2015]. Эта система Streptococcus pyogenes использует эндонуклеазу двухцепочечной ДНК Cas9, зрелую РНК CRISPR (crRNA) и трансдействующую РНК (tracrRNA) [Jensen, 2015]. В то время, как механизм сначала рассматривался только как биологическое явление, он был превращен в инструмент генной инженерии с огромным потенциалом, когда M. Jinek et al. [Jinek et al., 2012] описал перепрограммирование последовательности ДНК-мишени путем замены 20 п.н. в crRNA и приведение системы к двум компонентам путем построения химерной малой направляющей РНК (sgRNA), имеющей шпильку, имитирующую комплекс tracrRNA-crRNA. Эта PHK сочетает адресную специфику crRNA со структурными характеристиками tracrRNA. В этом случае для точного определения цели генома достаточно только экспрессии Cas9 и конструирование sgRNA с 20 п.н. протоспейсерной последовательностью, комплементарной целевой ДНК. В настоящее время sgPHК используется значительно чаще, чем сгPHК и tracrPHК.

Так, например, для *C. glutamicum* была разработана система CRISPR-Cas9, позволяющая разделять различные генотипы. А недавно было показано, что сочетание техники ДНК «рекомбиниринга» клеток с последующим применением CRISPR-Cas9 системы позволяет значительно улучшить частоты редактирования генома *C.glutamicum* [Hochheim, 2017]. В смеси двух штаммов *C. glutamicum* ATCC13032 и ATCC13032, имеющего точечную мутацию, приводящую к замене в MurE-(G81E), все клетки дикого типа были устранены с помощью соответствующей sgRNA. Поскольку было отмечено, что наличие белка Cas9 снижает количество живых клеток из-за токсичности, замена стартового кодона *cas9* с ATG на TTG привела к весьма низкой неспецифической активности белка, в то время как метод CRISPR-Cas9 оставался функциональным [Hochheim, 2017].

На основе CRISPR/Cas9 системы разработан генетический инструментарий, позволивший осуществить эффективную модификацию генома нескольких штаммов *C. glutamicum* ATCC 13032, ATCC 13869. Экспрессия токсичного для бактерий белка

Саѕ9 осуществлялась со строго регулируемого с помощью IPTG промотора Р*tac*, а экспрессия sgRNA – с *C. glutamicum* промотора P_{11F} . Для преодоления частых мутаций гена *cas9* в клетках *C.glutamicum*, приводящих к низкой эффективности редактирования генома, была использована совместная трансформация плазмид, экспрессирующих Cas9 и gRNA. Все это позволило осуществить делеции, замены и вставки генов (до 3,6 т.п.н.) с эффективностью 30.8–60,0% и 16.7–62.5%, соответственно. Кроме того, для ввода в геном небольших модификаций и однонуклеотидных замен был осуществлен оц-ДНК «рекомбиниринг» с помощью рекомбиназы *recT* профага Rac *E.coli*, используяCRISPR/Cas9-опосредованныйотбор, с эффективностью более 80.0%. Редактирование одновременно двух мест также было реализовано в *C. glutamicum* с эффективностью 40.0% [*Liu et al.*, 2017].

Также разработана CRISPR система, использующая белок Cpf1 *Francisella novicida* вместо Cas9. Совмещая CRISPR/Cpf1 с оц-ДНК «рекомбинирингом», были внесены небольшие изменения в геном *C. glutamicum* с высокой эффективностью, а также реализованы протяженные «делеции» и вставки генов [*Jiang et al.*, 2017].

Систему CRISPR можно использовать для регуляции экспрессии транскрипции. Каталитически неактивный Cas9 (dCas9), не обладающий эндонуклеазной активностью, при совместной экспрессии с sgRNA образует рибонуклеопротеиновый комплекс, который может специфически препятствовать связыванию фактора транскрипции, связыванию PHK-полимеразы или удлинению транскрипции и поэтому используется для контроля экспрессии генов. В *Corynebacterium glutamicum* эта техника использовалась для снижения экспрессии гена *pgi* (фосфоглюкоизомераза) с целью увеличения продукции лизина и генов *pck* (PEP карбоксикиназа), *pyk* (пируваткиназа) для усиления синтеза глутамата [*Cleto et al.*, 2016].

Таким образом, современные методы «рекомбиниринга» и CRISPR/Cas9 расширяют и упрощают процедуры геномного редактирования. И хотя почти все современные методы доступны для *C. glutamicum*, тем не менее, дальнейшее их усовершенствование требуется для создания промышленных штаммов с улучшенными продуцирующими характеристиками, обусловленными множественными целенаправленными изменениями их генома.
2. Бактериофаг Ми - транспозон

Транспозоны являются дискретным сегментом генетического материала, способным перемещаться из одного локуса в другой в геноме хозяина или между различными геномами. Феномен был обнаружен Barbara McClintock в 1940 годах. Транспозоны перемещаются, главным образом, используя специальную форму рекомбинации, называемую транспозицией, не требующую ДНК гомологии сайтамишени [*Mizuuchi*, 1992; *Mizuuchi*, 1997; *Mizuuchi and Baker*, 2002]. Транспозиция вызывает инсерционные мутации и способствует различным типам геномных перестроек, таким как делеции и инверсии.

Бактериофаг Ми впервые был описан в 1960-х годах как умеренный фаг *Escherichia coli* (а также многих энтеробактерий), обладающий способностью индуцировать множественные мутации [*Taylor*, 1963] в клетках, вследствие чего был назван Ми (то есть фаг-мутатор). Десятилетия блестящих экспериментов группы

К. Мігиисһі с использованием в качестве субстратов либо mini-Mu плазмиды, либо олигонуклеотиды, содержащие Mu концы, заложили основу наших современных знаний о механизмах транспозиции. Жизненный цикл бактериофага проходит через две стадии, отличающихся конфигурацией донорного субстрата и дальнейшей судьбой продуктов транспозиции. Лизогенный путь используется фагом во время инфекции и приводит к интеграции линейной ДНК фага Mu в случайные места генома *E. coli* хозяина (с небольшим предпочтением узнавания консенсусной последовательности 5'-C-Py-(G/C)-Pu-G-3' *in vivo* с окружающей ее областью в ~23 до 24-п.н., обладающей облегчающей деформацию ДНК-мишени структурой) и стабильному состоянию профага. Второй путь используется во время литического роста, ведет к появлению множества копий фага Mu в геноме хозяина, а в конечном итоге, образованию фагового потомства [*Symonds et al.*, 1987; *Chaconas et al.*, 1981].

В обоих случаях механизм транспозиции Ми один и тот же, идет с образованием общего промежуточного продукта «Shapiro интермедиат» [*Shapiro*, 1979], paspeшение которого происходит по механизму репарации «nick-join-repair» в случае лизогенизации фагом Ми клетки-хозяина, а во время литического развития – по репликативному механизму «nick-join-replicative» с обязательным образованием структуры коинтеграта [*Chaconas and Harshley*, 2002; *Harshley and Jayaram*, 2006] (Рисунок 3). Оба пути транспозиции бактериофага Mu катализируются белок-нуклеиновым комплексом высокого порядка, названным транспозосомой [*Harshey and Jayaram*, 2006]. Сборка этого комплекса достаточно сложный процесс, требующий ряд специфических участков ДНК фага, фаговых белков и белков хозяина, включенных в сложный цикл белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий на суперспирализованной ДНК субстрате. Изгибы молекулы ДНК и тесное взаимодействие доменов, принадлежащих разным мономерам транспозаз, являются необходимыми условиями при конструировании функционально-активных сайтов.



Рисунок 3 - Стадии нерепликативного (А) и репликативного (В) путей транспозиции фага Ми [Согласно *Harshey*, 2014]

2.1 Необходимые для транспозиции ДНК элементы фага Ми

Бактериофаг Ми, геном которого представляет собой линейную двухцепочечную молекулу ДНК и имеет размер 36,717т.п.н. [*Morgan et al.*, 2002], является одним из самых больших и сложных из известных транспозонов [*Chaconas and Harshey*, 2002; *Mizuuchi*, 1992] (Рисунок 4).



Рисунок 4- Необходимые для транспозиции участки ДНК и белки генома фага Mu [Согласно *Harshey*, 2014]

Геном Ми фага содержит расположенные с разными интервалами шесть сайтов связывания с транспозазой MuA, обозначенные L1, L2, L3 (Mu-*attL*) и R1, R2, R3 (Mu-*attR*), находящиеся на левом или на правом концах, соответственно, в разной ориентации [*Creigie et al.*, 1984]. Эти сайты включают консервативную последовательность, состоящую из 22п.н., не имеющую внутренней симметрии, и обладают разной способностью к связыванию MuA-мономеров, а, следовательно, не равноценны для процесса транспозиции [*Groenen and van de Putte.*, 1986; *Lavoie et al.*, 1991].

Кроме этих важных ДНК элементов на расстоянии ~1т.п.н. от левого конца Ми генома находится энхансер транспозиции (Е), ранее называемый внутренней активирующей последовательностью (IAS) [*Leung et al.*, 1989; *Mizuuchi and Mizuuchi*, 1989; *Surette et al.*, 1989]. Энхансер перекрывается с тремя операторами O1-O3 транскрипции ранних фаговых генов, включающими P_e промотор [*Krause and Higgins*, 1986], являющимися также сайтами связывания MuA транспозазы. По меньшей мере, девять сайтов связывания с транспозазой MuA присутствуют в Е последовательности [*Lavoie et al.*, 1991]. Все концевые связывающие сайты (L1-L3 и R1-R3) участвуют во взаимодействиях с Е [*Jiang et al.*, 1999] через разные субъединицы MuA. *cis*действующий энхансер – необходимый компонент реакции транспозиции. Показано,

что энхансер эффективно (более чем в 100 раз) стимулирует транспозицию in vivo, и его роль существенна в процессе сборки транспозосомы in vitro [Leung et al., 1989; Chaconas and Harshey, 2002]. Играя важную роль при сборке транспозосомы [Mizuuchi et al., 1992], энхансер остается ассоциированным с комплексом на протяжении всего процесса транспозиции [Pathania et al., 2002; Yin et al., 2007]. Так, во время сборки транспозосомы энхансер направляет упорядоченное взаимодействие с двумя концами фага Ми, сближая их, тем самым облегчая формирование суперскрученного синапса, охватывающего 5 супервитков ДНК. Показано, что в случае нормальной относительной ориентации L и R, концы Ми были либо упорядочено свернуты (IW), либо выровнены случайным столкновением (RC). Добавление энхансера к этой системе направляет синапс в сторону пути IW, показывая, что Е накладывает топологическую специфичность на синапс. В случае нахождения Ми- концов в неправильной ориентации, синапс происходит только через RC [Harshey, 2014]. Было показано, что определенная (природная) ориентация Е-элемента, расположенного in cis между левым и правым att Mu, важна для его функционирования, в то время как удаление от концов транспозона не имеет существенного значения. Добавленный в 50-кратном молярном избытке [Surette, Chaconas, 1992] энхансер может действовать in trans, сохраняя свою топологическую специфику и осуществлять R1-O1 и L1-O2 взаимодействия [Jiang and Harshey, 2001]. Энхансер также выполняет роль фильтра при отборе наиболее стабильной конфигурации транспозосомы, защищает ее от спаривания ошибочных концов Mu-ДНК в клетке в случае присутствия нескольких копий Ми транспозона [Yin and Harshley, 2005]. Требования энхансера можно обойти in vitro, используя диметилсульфоксид или высокую концентрацию белка MuA и ДНК.

Кроме Е –элемента для эффективного синапса необходим сайт сильного связывания гиразы (SGS), локализованный в центре Ми генома. Через этот сайт осуществляется отрицательная суперспирализация ДНК, которая имеет большое значение для транспозиции Ми бактериофага *in vivo* [*Pato,* 2004; *Pato and Banerjee,* 2000]. Предполагается, что ДНК гираза, связываясь с SGS, стимулирует формирование суперспирализованной петли с сайтом связывания на вершине, что способствует сближению концов профага в ее основании (Рисунок 5) и, как следствие, эффективной сборки транспозосомы и репликации профага Mu *in vivo*. Было замечено, что сайт SGS играет важную роль в поддержании профага Ми как отдельного и стабильного домена на *E. coli* хромосоме, поскольку выделение Ми в независимую область на хромосоме обеспечивает низкий уровень транскрипции с промотора ранних фаговых генов, который контролирует экспрессию факторов транспозиции MuA и MuB. В этом процессе принимают также участие MuB и несколько нуклеотид-связывающих белков (NAPs) [*Harshey*, 2014].



Рисунок 5- Центральный сайт SGS. ДНК-гираза связывается в SGS и инициирует процесс введения сверхвитков, ведущий к образованию нового домена, содержащего полный геном профага Ми, выравнивая концы L и R, тем самым способствуя сборки транспозосомы [Согласно *Harshey*, 2014]

2.2 Белки, принимающие участие в транспозиции бактериофага Ми

Геном бактериофага Ми кодирует два белка, включенных в транспозицию: транспозазу МиА и вспомогательный активатор транспозиции MuB.

Основным белком, необходимым для осуществления транспозиции, выступает транспозаза MuA, являющаяся мономером в растворе, размер которого составляет 75kDa (663 ак.о). Частичный протеолиз белка показал, что он состоит из трех доменов, структурно и функционально разделенных на субдомены [*Nakayama et al.*, 1987] (Рисунок 6). N-концевой домен (I) ответствоенен за специфическое связывание как с энхансером через субдомен Ia [*Leung et al.*, 1989; *Mizuuchi M. and Mizuuchi K.*, 1989], так и с сайтами связывания MuA, находящимися на концах фагового генома –*attL, attR* через субдомены I β и I γ [*Kim and Harshley*, 1995; *Leung et*



Рисунок 6 - Доменная и субдоменная организация MuA транспозазы [Согласно Harshey, 2014]

al., 1989; Nakayama et al., 1987]. Субдомены Іβ и Іү связываются с разными половинами 22 п.н. консервативной последовательности att сайтов (с регионами, состоящими из первых 1-11п.н. и последних 12-22п.н., соответственно). Субъединицы MuA, связанные с L и R сайтами, осуществляют перекрестные взаимодействия с E во время формирования LER комплекса. Это специфичное взаимодействие определяет топологию транспозосомы. Субдомен Пα выполняет каталитические функции и содержит филогенетически консервативные остатки аминокислот (Asp₂₆₉-Asp₃₃₆-Glu₃₉₂), координируемые ионом двухвалентного металла, образуя, так называемый, DDE мотив [Baker and Luo, 1994; Rice and Mizuuchi, 1995]. Было выяснено, что субдомен Шβ также принимают участие в неспецифическом ДНК связывании в процессе сборки транспозосомы [Krementsova et al., 1998]. Субдомен IIIα (BAN) отвечает за неспецифическое связывание с ДНК и обладает нуклеазной активностью, возможно, взаимодействуя со слитой структурой Ми-ДНК мишени и DDE мотивом, а также может участвовать в структурных перестройках транспозосомы, осуществляемых между стадиями разрыва и переноса нитей ДНК [Kuo et al., 1991]. Субдомен Шβ взаимодействует с MuB [Baker et al., 1991] и ClpX [Levchenko et al., 1995] белками.

В составе транспозосомного комплекса MuA транспозаза катализирует специфические реакции расщепления ДНК и присоединения, необходимые для осуществления транспозиции [*Craigie et al.*, 1984; *Kuo et al.*, 1991; *Lavoie et al.*, 1991].

Еще два ДНК связывающих и изгибающих белка клетки-хозяина, HU и IHF, принимают участие на ранних стадиях транспозиции и играют важную роль в сборке транспозосомы [*Watson and Chaconas*, 1996] (Рисунок 4).

Гистоноподобный белок HU активен в форме димера и неспецифично связывается *in vivo* между L1 и L2 сайтами фагового генома, обеспечивая их сближение [*Gueguen et al.*, 2005]. В результате такого сближения субъединицы транспозазы, расположенные на L1 и L2, могут взаимодействовать между собой [Lavoie and Chaconas, 1995].

В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что IHF, связываясь с Е в районе между O1 и O2, образует шпилечную структуру на ДНК, способствуя, таким образом, MuA опосредованным взаимодействиям между L/R концами и энхансером, что стимулирует транспозицию в случае, когда уровень суперспирализации ДНК субстратов низкий или отсутствует один из «вспомогательных» сайтов связывания - L2, L3 или R3 [*Yin et al.*, 2007].

Показано, что в физиологических условиях для сборки транспозосомы требуется присутствие всех ДНК элементов (*att*L, *att*R, E) в природном расположении на суперспирализованной донорной молекуле ДНК, содержащей Ми транспозон, наряду с MuA и *E. coli* белками HU, IHF. А в присутствии двухвалентного иона металла Mg^{2+} этих компонентов достаточно для стимулирования реакции расщепления ДНК.

Однако для эффективной транспозиции требуется еще другой кодируемый фагом Ми белок – MuB, включающий 312 ак.о. MuB-это AAA+ATФаза, которая осуществляет неспецифичное связывание ДНК [*Chaconas and Harshey*, 2002; *Mizuno*, 2013] (Рисунок 7) АТФазная активность MuB стимулируется ДНК и MuA.



Рисунок 7 - Доменная организация MuB [Согласно Harshey, 2014]

Одновременно MuB стимулирует MuA опосредованное спаривание концов транспозосомы и осуществление однонитевых разрывов концевых участков ДНК фага Mu, соединяясь с фланкирующими последовательностями. Совместное действие MuA и MuB приводит к искажению ДНК, что позволяет захватить целевую ДНК и осуществить Mu транспозицию. Кроме того, MuB, взаимодействуя с С-концевым доменом IIIβ MuA, оптимизирует все стадии сборки транспозосомы. Белок MuB способен подавлять различные дефекты процессов сборки транспозосомы и катализа, используя для этого неизвестный механизм [*Coros et al.*, 2003]. Предполагают, что MuB не требуется для первичной интеграции, хотя, возможно, и стимулирует этот процесс [*Roldan and Baker*, 2001].

Он также ответственен за иммунность транспозиции, то есть предохраняет некоторые сегменты ДНК от встраивания транспозона [*Ge et al.*, 2010; *Han and Mizuuchi*, 2010]. Существует два типа иммунности.

сіз–иммунность не позволяет использовать области хромосомы хозяина, находящиеся в непосредственной близости (~5 т.п.н.) от концов фага Ми в качестве мишени. В основе этого механизма лежат MuA-MuB взаимодействия. Так ассоциированная с концами ДНК профага Ми транспозаза МиА при взаимодействии *in cis* со связанным с ДНК белком MuB стимулирует гидролиз АТФ, в результате которого MuB диссоциирует с ДНК. Свободная от MuB ДНК является плохой мишенью для новых вставок. MuA-MuB взаимодействия способствуют образованию петель на ДНК между участками, связанными с MuA и MuB. Повторяющиеся циклы формирования/разрушения петли приводят к более крупным петлям на ДНК, что влечет за собой преимущественное введение транспозона в места, удаленные от концов транспозона [*Han and Mizuuchi*, 2010]. MuB также диссоциирует при взаимодействии с MuA *in trans*, при этом олигомерное состояние MuA мономера, может различить взаимодействия с концами, лежащие в основе иммунитета *in cis*, от тех, которые способствуют захвату ДНК-цели и транспозиции *in trans* [*Harshey*, 2014].

Во время литической фазы развития Ми амплифицирует свой геном по крайней мере 100 раз. Чтобы производить жизнеспособное потомство фаг должен предотвратить транспозицию в себя. Ми геномная иммунность обусловлена, напротив, сильным связыванием белка MuB с ДНК транспозона, предположительно, модулируемым хозяйскими белками *in vivo* [*Ge et al.*, 2011]. Полимеризация MuB внутри независимого Mu домена образует барьер на пути интеграции в собственный геном.

Резкое отличие механизмов MuB-связывания в пределах и вне генома Mu профага свидетельствует о сегрегации Mu-генома в независимый домен на хромосоме.

2.3 Реконструкция моделей транспозосом

Основным этапом транспозиции Ми является сборка синаптического комплекса, в котором каталитически инертные мономеры MuA активируются благодаря образованию тетрамерного ядра, тесно связанного с двумя концами транспозона.

Первое трехмерное 3D изображение тетрамерной Mu-транспозосомы, собранной на предварительно расщепленных олигонуклеотидных субстратах R1-R2, было получено J.F.Yuan et al., 2005, используя сканирующую просвечивающую электронную микроскопию. Хотя разрешение реконструкции было относительно низким, было подтверждено *trans*-расположение каталитически активных MuA субъединиц. Модель комплекса напоминала большую V (на Рисунке 8 изображение перевернуто), причем единственные значимые белок-белковые взаимодействия отмечались в основании V, где расположены каталитически активные субъединицы. Остальная часть комплекса, по-видимому, удерживается вместе за счет ДНК-белковых взаимодействий, возможно, чтобы обеспечить гибкость всего комплекса по мере его перехода с каждым шагом реакции во все более стабильные состояния.



Рисунок 8- 3D реконструкция модели тетрамерной Ми транспозосомы, собранной на R1-R2 концах [из Yuan et al., 2005]

Рисунок 9-(А) Кристаллическая структура Mu STC транспозосомы; (В) Схематическое изображение кристаллической структуры транспозосомы, иллюстрирующее позиции различных доменов MuA и ДНК сегментов. [из *Harshey*, 2012]

Кристаллическая структура Mu STC (*strand transfer complex*) транспозосомы (Рисунок 9), собранная на предварительно расщепленных R1-R2-субсайтах с использованием укороченной MuA (ак. о. 77 до 605) и ДНК-мишени, имеющей одну «миссмэтч» замену, подтвердила *trans* расположение двух каталитически активных субъе-

диниц MuA и характерный изгиб ДНК-мишени, что является общими чертами для всех STC комплексов [*Montaño et al.*, 2012; *Harshey et al.*, 2012]. Было показано, что Mu транспозосомы обладают высокой стабильностью, главным образом, за счет сильных ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий.

2.4 Стадии репликативной транспозиции фага Ми

Репликативный путь транспозиции, используемый фагом во время литического пути развития, когда Ми является частью большого ковалентно- замкнутого кольцевого генома хозяина, воспроизведен *in vitro* и детально изучен [*Chaconas and Harshey*, 2002].

На ранних стадиях Ми транспозиции 6 каталитически неактивных мономеров MuA беспорядочно связываются с каждыми L/R сайтами. Сложный цикл взаимодействий сначала между субъединицами транспозазы, связывающими правый конец (R), и энхансером (ER-комплекс, содержит два супервитка), а затем между субъединицами, связывающими левый конец (L) и энхансером, стимулирует образование временного синаптического (по трем сайтам) комплекса (LER) определенной архитектуры, в котором концевые последовательности фага строго ориентированы друг относительно друга [*Watson and Chaconas*, 1996] (Рисунок 10). Формирование этого комплекса требует высокой суперспирализации ДНК, а также точно расположенных изгибов донорной цепи, которые индуцируются в *E. coli* взаимодействием с белками клетки-хозяина HU и IHF [*Wang and Harshey*, 1994]. Взаимодействие L1 сайта с ER через HU инициирует преобразование нестабильного LER комплекса в стабильную форму через серию транспозосом в направлении стабилизации белок-нуклеиновых



Рисунок 10 – Порядок и динамика сборки Ми транспозосомы [из Harshey, 2006]

взаимодействий, сопровождаемое изменением конфигурации энхансера от напряженной к менее напряженной, при этом происходит образование каталитически активного ядра, состоящего из четырех MuA субъединиц [*Baker and Mizuuchi*, 1992; *Lavoie et al.*, 1991]. Комплекс SSC (*stable synaptic complex*) [*Watson and Chaconas*, 1996], называемый также комплекс типа 0 (Рисунок 10), представляет собой стабильный синаптический комплекс, в котором пока еще не происходит разрыва донорной цепи, но четыре молекулы транспозазы из шести прочно связаны друг с другом и тесно контактируют с тремя концами (L1, R1, R2) Ми-транспозона.

Этот комплекс охватывает 5 супервитков, два из которых образуются между Е и R, два - между R и L и один между E и R элементами. На этой стадии осуществляется контроль правильности координации концов Ми фага и соответствующих вспомогательных сайтов ДНК для выполнения последующей реакции разрыва донорной ДНК. Стадия формирования SSC является лимитирующей, поскольку на этом этапе идет плавление нескольких пар оснований на ДНК в непосредственной близости от сайтов расщепления, на что используется свободная энергия суперспирализации фланкирующих геном фага участков гетерогенной ДНК предыдущего хозяина, FD (flanking DNA) [Savilahti et al., 1995; Wang and Harshey, 1994]. В этой связи нахождение на концах транспозируемой цепи ДНК фага Ми динуклеотидов 5'-СА-3 (особенно последнего – А-аденина), консервативных во многих транспозируемых элементах, включая ретровирусы, важно из-за их гибкости и легкости деформации [Lee and Harshey, 2001]. Так мутации концевых динуклеотидов блокируют переход LER в SSC, однако «мисс-мэтч» замена способствует сборке стабильной транспозосомы. SSC образуется как в присутствии Mg^{2+} , так и ионов Mn^{2+} , Ca^{2+} in vitro [Mizuuchi et al., 1992; Jiang and Harshey, 2001]. Но это требование существенно ослабляется для субстратов, имеющих «мисс-мэтч» замены концевых динуклеотидов [Lee and Harshey, 2003], некомплементарные или очень короткие FD или, если субстрат предварительно расщеплен, указывая на то, что ионы металлов способствуют плавлению спаренных оснований ДНК в непосредственной близости от концов фага Ми [*Harshey*, 2014].

При добавлении только Mg^{2+} или Mn^{2+} МиА транспозаза (а в случае уже собранного комплекса Zn^{2+} и Co^{2+}) быстро катализирует однонитевой разрыв в конце-

вых 5'-СА-3' нуклеотидах, расположенных в L1, R1 сайтах с образованием более стабильного расщепленного донорного комплекса CDC (*cleaved donor comlex*) или комплекса типа I [*Craigie and Mizuuchi*, 1987] (Рисунок 10). Разрыв донорной цепи происходит в результате нуклеофильной атаки молекулой воды фосфодиэфирной связи 3' концов транспозона в один этап и не сопровождается образованием связанных ковалентной связью белок-нуклеиновых промежуточных соединений. Эта и последующая стадии переноса цепи ДНК осуществляются двумя MuA субъединицами, связанными с L1, R1 сайтами, действующими *in trans*, то есть мономер, взаимодействующий с одним концом фаговой ДНК расщепляет другой конец и, наоборот [*Yuan et al*, 2005]. В CDC выступающие на концах транспозона 3'OH группы находятся в соответствующей ориентации для осуществления последующего переноса цепей ДНК [*Craigie and Mizuuchi*, 1987; *Mizuuchi et al.*, 1992], происходящего в присутствии MuB, ионов двухвалентных металлов, ATP и ДНК мишени.

Когда МиВ в присутствии АТФ свяжется с подходящей для транспозиции (неиммунной) ДНК-мишенью, образуется комплекс захвата мишени TCC (*target capture complex*) (на Рисунке 10 не показан). Отличием Ми транспозосомы от других систем транспозиции является гибкость в отношении захвата мишени, поскольку реципиентная ДНК может быть включена в состав транспозосомы на этапах LER, SSC или CDC комплексов [*Naigamwalla and Chaconas*, 1997].

Далее активируемый транспозазой МиА белок МиВ в комплексе с АТФ и ДНК мишенью стимулирует реакцию переноса ДНК фага в новый сайт реципиентной ДНК [*Yamauchi and Baker*, 1998], при этом выступающие 3'OH группы проявляют нуклеофильные свойства и атакуют фосфодиэфирные связи ДНК-мишени, образуя ступенчатые разрывы в реципиентной ДНК со «ступенью» в пять нуклеотидов. Процессы расщепления и воссоединения происходят одновременно и энергетически независимы. Нуклеофилом является 3'OH группа концевого аденозина. Однако, было показано, что перенос субстратов, содержащих на конце только рибозу с 3'OH группой без аденина также осуществляется эффективно. Предварительно расщепленные концы будут выполнять перенос в присутствии Ca^{2+} . В случае наличия мутаций на концах и, как следствие, блокировки стабильного их спаривания, ионы двухвалентных металлов и белок MuB подавляют эти дефекты. Образующийся транспозосомный комплекс переноса нитей STC (*strand transfer complex*) или комплекс типа II является наиболее стабильным из всех структур транспозосом [*Surette et al.*, 1987]. В нем обе цепи донорной ДНК связаны ковалентными связями с цепями ДНК-мишени через промежуток длиной в 5 пар нуклеотидов.

Образовавшаяся θ-образная структура ДНК «Shapiro интермедиат» [Shapiro, 1979]- общий промежуточный продукт двух путей транспозиции, разрешается в случае литического пути развития через репликацию всего генома фага. Однако свободные 3'-ОН концы разветвленной структуры «Shapiro интермедиат», которые могут стать местом начала репликации Ми ДНК, оказываются недоступными для репликативных белков, поскольку субъединицы МиА, белки HU, MuB остаются прочно связанными с соответствующими сайтами ДНК [Lavoie et al., 1991; Surette et al., 1987; Lavoie and Chaconas, 1990]. Поэтому прочные белок-нуклеиновые контакты STC комплекса сначала дестабилизируется, но не разрушаются белком-шапероном клет-ки-хозяина – ClpX, входящим в Clp/Hsp100 семейство АТФаз. ClpXвзаимодействует с IIIβ субдоменом MuA, меняя пространственную структуру одной из каталитически



активных субъединиц МиА, при этом связи транспозосомы с ДНК ослабевают [*Levchenko et al.*, 1995; *Nakai et al.*, 2001]. В результате,STC1 комплекс преобразуется в менее прочный комплекс STC2 (Рисунок 11). STC2 в свою очередь при участии пока еще точно неустановленных белков клетки-хозяина, названных факторами Ми репликации MRF α 2 (*Mu replication factors*), переходит в другой нуклеопротеиновый комплекс–пререплисому (STC3), в котором транспозосома заменена с затратой энергии АТФ на укороченный фактор инициации трансляции IF2-2 [*North et al.*, 2007]. После формирования пререплисомы даль-

Рисунок 11 - "nick–join– replicative" механизм транспозиции, изученный *in vitro* [Согласно *Nakai et al.*, 2001] нейшие этапы требуют участия еще большего количества хозяйских белков. РгіА связывается с разветвленной структурой ДНК и инициирует сборку препраймосомы с одного конца, способствуя включению PriB, DnaT и DnaB-DnaC комплекса. Для смещения IF2-2 и связывания DnaB требуется хеликазная активность PriA. После связывания с ДНК DnaB привлекает праймазы, способствуя переходу в инициирующую репликацию праймосому, а с дальнейшим привлечением ДНК-полимеразы III - в реплисому, доступную для репликации [*Nakai et al.*, 2001]. В конечном итоге одноцепочечные пробелы репарируются хозяйскими факторами и образуется коинтеграт, в котором геном Ми фага фланкирован 5-ти нуклеотидными прямыми повторами [*Nakai et al.*, 2001] (Рисунок 3; 11).

2.5 Механизм нерепликативной транспозиции Ми

Механизм первичной интеграции бактериофага Ми, результатом которого является простая инсерция, изучен неполно из-за сложности воспроизводства его *in*



vitro. Во время инфекции упакованная в фаговую головку, вмещающую до 39 т.п.н., линейная ДНК фага Ми фланкирована участками гетерогенной ДНК предыдущего хозяина, FD (60-150 п.н. с L и 0,5-3 т.п.н. с R концов) [Au et al., 2006]. До интеграции в хромосому хозяина концы генома входящего Ми фага удерживаются вместе фаговым белком N, преобразуют его в нековалентно замкнутную кольцевую форму, и защищают его ДНК от экзонуклеаз [Harshey and Bukhari, 1983] (Рисунок 12). Предполагается

Рисунок 12 - "nick–join–repair" механизм транспозиции, изученный *in vivo*. Х-гипотетический фактор [Согласно *Harshey*, 2014]

тот же механизм транспозиции, ведущий к образованию «Shapiro-интермедиата» [Shapiro, 1979], для разрешения которого, однако, используется механизм «nick-joinrepair», включающий удаление FD концов и репарацию возникших брешей, контролируемые как транспозосомой, так и хозяйскими белками [Au et al., 2006]. Эта интеграция также называется нерепликативной транспозицией из-за наблюдаемой ограниченной репликации на концах Ми. Выбор пути, по которому происходит разрешение промежуточного продукта STC во время литической фазы и фазы инфекции, возможно, вызвано различными конфигурациями их FD (Рисунок 3, 10, 11). Было показано, что некоторые белки и факторы ДНК, существенные во время репликативной стадии транспозиции, такие как MuB, ClpX [Mhammedi-Alaoui et al., 1994] и SGS-сайт связывания гиразы [Sokolsky and Baker, 2003], играют меньшую роль при первичной интеграции. Так неподдерживающие транспозицию во время литической фазы мутантные MuB способны осуществлять интеграцию фага Mu во время инфекции [Roldan and Baker, 2001]. In vitro эти мутанты сохраняют способность стимулировать MuA, но имеют дефекты в связывании и доставке ДНК мишени к транспозосоме.

Сразу после интеграции фага Ми происходит удаление FD последовательности, для чего требуется экзонуклеазная активность RecBCD. Контролируемое транспозосомой удалениеN белка приводит к тому, что RecBCD экзонуклеаза получает доступ к FD и деградирует большую часть FD до защищенных транспозосомой 19 п.н., что инициирует дальнейший гидролиз ДНК внутри транспозосомы до 4-п.н. флангов с обоих концов Mu. Так называемый CSF (*cleavage stimulating factor*), включающий неизвестные белки клетки хозяина, осуществляют этот процесс. Предполагается, что ClpX принимает участие в этом процессе, поскольку в отсутствии ClpX удаление FD задерживается [*Choi and Harshey*, 2010]. Вероятно, белок-шаперон ClpX, также участвующий в процессе дестабилизации транспозосомы, стимулирует эндонуклеазную активность C-концевого домена III MuA транспозасы, в результате чего происходит инициация процесса удаления участков ДНК предыдущего хозяина, присоединенных к 5' концам Mu фага [*Choi and Harshley*, 2010]. Однако такой механизм должен быть подавлен во время литической фазы, поскольку удаления FD в этом случае может повлиять на целостность всей хромосомы (Рисунок 3). Интересно, что мутации, содержащиеся в домене III транспозазы, блокирующие удаление FD, не мешают осуществлению репликационной транспозиции [*Choi and Harshley*, 2010], предполагая, что существует благоприятная возможность для удаления FD, после чего репликация Mu может продолжаться путем перезапуска.

Последующая репарация образовавшихся брешей осуществляется реплисомой (Pol III), ответственной за репарацию двухцепочечных разрывов ДНК в клетках *E. coli* с участием возобновляющих репликацию белков PriA-DnaT и белков общей рекомбинационной системы RecABC [*Jang et al.*, 2012]. Поскольку PriA участвует в обоих путях транспозиции предполагают, что связывание PriA, осуществляемое после стадии переноса, протекает по сходным механизмам. Но отсутствие необходимости хеликазной активности PriA и участие белков гомологичной рекомбинации во время первичной интеграции отличают эти два процесса друг от друга [*Jang et al.*, 2012].

2.6 Бактериофаг Ми - инструмент генной инженерии

Фаг – транспозон Ми явился первым из транспозирующих элементов, для которого была разработана система транспозиции *in vitro* [*Mizuuchi*, 1983]. Система, в которой использовались очищенные белки и компоненты ДНК, позволила более детально изучить этот процесс. Использование диметилсульфоксида и глицерола в реакции ослабило требования к сборке траспозосомы *in vitro*, то есть исключило необходимость суперспирализации ДНК субстрата, НU и энхансера (E) [*Baker and Mizuuchi*, 1992; *Mizuuchi and Mizuuchi*, 1989]. Кроме того, использовние субстрата, содержащего только R – концы с R1, R2 сайтами связывания, способствовало увеличению эффективности реакции. В упрощенном варианте Ми транспозиция выполняется с очищенным белком МиА и короткими R-концевыми сегментами ДНК, содержащими R1, R2 сайты связывания [*Savilahti et al.*, 1995], что вполне достаточно для сборки транспозосомы, осуществления расщепления донорной ДНК и переноса цепей ДНК и используется для изучения детального механизма транспозиции [*Chaconas and Harshley*, 2002].

Успешная реализация Ми-зависимой репаративной транспозиции рекомбинантной ДНК была осуществлена с помощью электропорации собранным *in vitro* комплексом, состоящим из MuA транспозазы и линейной mini-Mu единицы, в хромосомы различных организмов, включающих не только грамотрицательные [Lamberg et al., 2002; Lanckriet et al., 2009], но также грамположительные бактерии, дрожжи и геномы млекопитающих.

Свойство фага Ми внедряться в хромосому реципиента в места, содержащие «мисс-мэтч» замены, позволяет картировать генетический полиморфизм, что и было продемонстрировано *in vitro* для генома бабочки [*Harshley*, 2014]. Это важно, поскольку однонуклеотидный полиморфизм является причиной ряда заболеваний у людей.

Поскольку транспозицию бактериофага Ми отличает предельно низкая специфичность (интеграция может идти как в различные гены бактериальной хромосомы, так и в различные участки внутри одного гена с небольшим предпочтением [*Harshey*, 2014], эта особенность оказалась полезной для целей генной инженерии. С середины 1980-х годов производные mini-Mu широко используются *in vivo* для инсерционного мутагенеза, для слияния и картирования генов, а также для клонирования генов и секвенирования ДНК, интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому [*Groisman and Casadaban*, 1986; *Haapa et al.*, 1999; *Chaconas and Harshey*, 2002; *Akhverdyan et al.*, 2011].

В настоящее время в литературе описаны разные виды mini-Mu элементов. Некоторые mini-Mu несут все генетические последовательности, необходимые для транспозиции, репликации и упаковки. Другие производные обладают только концами Mu (mini-Mu(LR)), и для выполнения специфических функций Mu в *E. coli* должны быть дополнены *in trans* [*Chaconas et al.*, 1981; *Harshey*, 1983]. Интегрированные в хромосому *E. coli* экспрессионные вектора, сконструированные на базе Mu фага, не имеющего генов, отвечающих за образование фаговых частиц, были использованы для одновременной термо-индуцированной репликативной транспозиции и гетерологичного синтеза белка в *E. coli* [*Akhverdyan et al.*, 2011].

Однако mini-Mu(cts) конструкции, содержащие факторы транспозиции *in cis*, могут вызывать нестабильность рекомбинантных штаммов даже без индукции [*Axвердян и др.*, 2007]. Стабилизация может быть достигнута путем использования двухкомпонентной системы, в которой гены, кодирующие MuA и MuB факторы транспозиции, находятся *in trans* на ДНК молекуле, не способной к транспозиции и впоследствии теряющейся клеткой.

Разные варианты этой системы были разработаны [Akhverdyan et al., 2011]. Одна из наиболее популярных систем включает интегративную плазмиду, содержащую mini-Mu(LR) единицу в качестве первого компонента и совместимую с ней хелперную плазмиду, содержащую индуцибильные гены, кодирующие MuA, MuB, в качестве второго компонента. Обычно хелперная плазмида имеет нестабильный репликон, и легко может быть удалена из клетки. Гены, находящиеся в составе mini-Mu(LR) единицы, фланкированы Rho-независимыми транскрипционными терминаторами в прямой ориентации [Abalakina et al., 2008]. В mini-Mu(LER) единицах между L и R концами расположен энхансер, который положительно влияет на транспозицию [Leung et al., 1989]. Для облегчения отбора mini-Mu транспозиции маркер устойчивости к антибиотику обычно включается в состав транспозона. А фланкированный последовательностями, необходимыми лля осуществления сайтспецифической рекомбинации- $\lambda attL/R$, loxP или FRT впоследствии легко вырезается in vivo из состава mini-Mu единицы соответствующими рекомбиназами, получая в итоге безмаркерный рекомбинантный штамм [Akhverdyan et al., 2011]. Двухкомпонентная система транспозиции фага Ми часто используется в E.coli для внесения поправок в геном и для конструирования различных бактериальных штаммов с целью проведения фундаментальных исследований и создания штаммов-продуцентов.

Система, разработанная в АГРИ группой В. З. Ахвердяна, является примером такой интегративной системы. С ее помощью можно интегрировать в хромосому *E.coli* различные гены, опероны или генетические кассеты с высокой эффективностью. Система включает две совместимые плазмиды, имеющие относительно нестабильные репликоны, что способствует в дальнейшем, после интеграции целевых генов в хромосому, легкому удалению плазмид из интегрантов [Зименков и др., 2004; *Ахвердян и др.*, 2007]. Интегративная плазмида содержит целевой ген, фланкированный концевыми фрагментами ДНК фага Mu-L и Mu-R, а хелперная плазмида содержит фрагмент mini-Muтранспозона MD4041 [*Symonds et al.*, 1987], на котором расположены ген температурочувствительного репрессора фага Mu, *c*ts62, ранний оперон фага и гены факторов транспозиции MuA и MuB. Во время термоиндуцибильного синтеза факторов транспозиции происходит перенос расположенной на интегративной плазмиде mini-Mu кассеты в хромосому хозяина. При длительном действии транспозазы уже интегрированная в хромосому mini-Mu единица в результате репликативной транспозиции может встраивать свою копию в новое место бактериального генома [*Ахвердян и др.*, 2007; *Саврасова и др.*, 2007].

Поскольку эффективность транспозиции в геном *E.coli* высокая, эта система позволяет интегрировать и амплифицировать целевые фрагменты ДНК в хромосоме без использования селективных маркеров [Саврасоваи др., 2007], что существенно облегчает процедуру и уменьшает время конструирования промышленных продуцентов. Кроме того, эта Ми-производная интегративная система позволяет осуществить интеграцию одновременно нескольких копий экспрессионных кассет в различные локусы бактериальной хромосомы, а также провести последовательную интеграцию нескольких функционально различных единиц mini-Mu. В большинстве случаев уровень экспрессии интегрированных с помощью Ми генов увеличивается пропорционально увеличению числа копий их в хромосоме. Несмотря на то, что бактериофаг Mu с частотой приблизительно 10^{-2} встраивается в жизненно важные гены, приводя к гибели клетки или к возникновению ауксотрофных мутантов, последующая селекция позволяет отобрать штаммы с высокой продуктивностью и хорошими ростовыми характеристиками. Уровни продукции полученных бесплазмидных штаммов соответствовали их плазмидным рекомбинантным аналогам, причем первые были значительно более стабильны при неселективном культивировании [Ахвердян и др., 2007; Саврасова и др., 2007].

Двухкомпонентная системы транспозиции фага Ми была адаптирована для интеграции целевых фрагментов ДНК в геном с последующим увеличением числа интегрированных копий в хромосоме метилотрофной бактерии *M. methylotrophus* AS1 [*Abalakina et al.*, 2008]. Было продемонстрировано, что в отличие от *E.coli* системы Mu-зависимой транспозиции, для обеспечения возможности высокоэффективной (с частотой $2x10^{-2}$) амплификации mini-Mu элемента в бактериальной хромосоме в присутствии факторов транспозиции необходимо введение в состав интегрируемой mini-Mu кассеты E-элемента [*Токмакова*, 2010], присутствие которого повышает внутримолекулярный перенос на 2 порядка. Была получена библиотека ауксотрофных по ароматическим аминокислотам мутантов в штамме, содержащем в хромосоме ген транспортера $aroP_{Eco}$, интегрированный с использованием Ми-зависимой системы транспозиции (*Yomantas et al.*, 2010).

Исходя из предшествующих результатов, полученных в нашей группе, в том числе и непосредственно автором данной работы, была сформулирована конкретная цель настоящей диссертации. Она состояла в дальнейшем развитии исследований свойств системы Ми-зависимой интеграции гетерологичной ДНК в геном различных бактерий. Удалось показать, что этот инструмент можно с успехом использовать и для коринебактерий. Более того, поскольку и в этом случае наблюдалось значительное снижение эффективности внутрихромосомальной транспозиции mini-Mu(LR) элементов по сравнению с их mini-Mu(LER) аналогами, была предложена, апробирована и затем практически использована новая стратегия Интеграция-Амплификация – Фиксация независимых mini-Mu(LE^{ex}R) элементов со специально организованными, «выщепляемыми E^{ex} -локусами». Эту стратегию оказалось возможным с успехом применять как в случае коринебактерий, так и в случае нашего раннего объекта исследования – *M. methylotrophus*, а также и для еще одного метилотрофа, *Methylobacterium extorquens* AM1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Бактериальные штаммы, плазмиды и условия культивирования

Штаммы *E. coli* культивировали при 37°С в жидкой или на твердой, содержащей 1,2% бактоагара Difco (США), среде Лурия-Бертани (LB) [*Sambrook and Russel*, 2001]. Антибиотики в концентрации: ампициллин – 200мкг/мл (Ар), тетрациклин – 20 мкг/мл (Тс), стрептомицин – 50 мкг/мл (Sm), гентамицин – 10 мкг/мл (Gm), канамицин – 40 мкг/мл (Km) были добавлены при выращивании соответствующих плазмидных штаммов *E. coli*.

Трансформацию сконструированных *in vitro* рекомбинантных плазмид осуществляли в штаммы *E. coli* TG1 и BW25141 [*Datsenko and Wanner*, 2000].

Штаммы *M. methylotrophus* AS1 культивировали при 37°С на модифицированной минеральной среде (SEIIa) [*Gunji*, 2004] следующего состава: 1,9 г K₂HPO₄, 1,56 г NaH₂PO₄·2H₂O, 5 г (NH₄)₂SO₄, 200 мг MgSO₄·7H₂O, 72 мг CaCl₂·2H₂O, 5 мкг CuSO₄·5H₂O, 25 мкг MnSO₄·5H₂O, 23 мкг ZnSO₄·7H₂O, 9,7 мг FeCl₃·6H₂O, 16 г (20 мл) метанола на 1 литр, pH7.0. При приготовлении твердых питательных сред использовали 1,2% бактоагара Difco (США) и концентрацию метанола – 8 г/л (1%). Антибиотики для поддержания плазмидной ДНК добавляли в концентрациях: 2 мкг/мл Tc, 50 мкг/мл Sm. Для селекции интегрантов использовали Km в концентрациях 15 мкг/мл. Отбор клонов с большим числом копий гена Sm^Rв хромосоме проводился на среде, содержащей 2 мг/мл Sm.

Штамм *M.extorquens* AM1 [*Nunn and Lidstrom*, 1986] культивировали при 30°C на минимальной среде Hypho [*Attwood and Harder*, 1972], содержащей в 1 л: 17 г K₂HPO₄, 13,1 г NaH₂PO₄, 20 г (NH₄)₂SO₄, 2 гMgSO₄·7H2O, 8 г (10 мл) метанола и 10 мл/л стокового раствора витаминов следующего состава: биотин 2,0 мг/л, фолиевая кислота 2,0 мг/л, тиамин-HCl 5,0 мг/л, пантотенат Ca 5,0 мг/л, B12 0,1мг/л, рибофлавин 5,0 мг/л, никотинамид 5,0 мг/л. При приготовлении твердых питательных сред использовали 1,2% бактоагара Difco (США). Для поддержания плазмиды добавляли Tc до конечной концентрации 10 мкг/мл, для отбора интегрантов – Km 20 мкг/мл.

Штаммы *Corynebacterium glutamicum* растили на Brain Heart Infusion (BHI) среде (Difco, USA) при 32°С. Когда требовалось, добавляли необходимые антибио-

тики: Gm в концентрации 1 мкг/мл, Tc 1 мкг/мл, Km 25мкг/мл, Sm 250 мг/мл (обычная концентрация) и 750 мг/мл (использовали для отбора амплификантов).

Штаммы или плазмиды	Генотип, описание	Источник		
<i>E. coli</i> штаммы	Е. coli штаммы			
TG1	$\overline{F} \Delta(lac\text{-}pro) \text{ supE thi } hsd\Delta 5 [F' traD36 proAB^+ lacI^{q} lacZ\Delta M15]$	VKM IMG-341		
BW25141	$lacI^{q}rrnB_{T14} \Delta lacZ_{WJ16} \Delta phoBR580 hsdR514 \Delta araBAD_{AH33}$	Datsenko and Wanner, 2000		
	$\Delta rhaBAD_{LD78} galU95$ endA _{BT333} uidA($\Delta MluI$)::pir ⁺ recA1			
M. methylotrophus AS1	Дикий тип	NCIMB10515		
<i>M.extorquens</i> AM1	Дикий тип	Nunn and Lidstrom,1986		
C. glutamicum III	таммы			
ATCC13869	Дикий тип	Лабораторная коллекция		
ATCC13869 recA	ATCC13869 recA	Лабораторная коллекция		
ATCC13032	Дикий тип, нуждающий в биотине для роста	VKPMB-41		
MB001	АТСС13032, с делецией профагов СGP1, CGP2, CGP3 без сдвига рамки считывания	Baumgart et al., 2013		
1YK	АТСС13869, содержащий интеграцию mini- Mu(LER)-YK кассеты в хромосоме	Данная работа		
2ҮК	Производный 1ҮК, содержащий две копии mini-Mu(LER)-ҮК в хромосоме после амплификации	Данная работа		
ЗҮК	Производный 2YK, содержащий три копии mini-Mu(LER)-YK в хромосоме после амплификации	Данная работа		
1Y	Производный 1ҮК штамма, полученный в результате Cre-опосредованного вырезания из одной копии mini-Mu единицы фрагмента ДНК, заключенного между <i>lox66/lox71</i> сайтами и состоящего из (Km ^R , Sm ^R) и Е-элемента	Данная работа		

Таблица 1 -Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

2Y	Производный 2ҮК штамма, из двух копий mini-Mu единиц которого с помощью Cre рекомбиназы удалены фрагменты ДНК, заключенные между <i>lox</i> 66/ <i>lox</i> 71 сайтами, состоящие из (Km ^R , Sm ^R) и Е-элемента	Данная работа
ЗҮ	Производный ЗҮК штамма, из трех копий mini-Mu единиц которого с помощью Сге рекомбиназы удалены фрагменты ДНК, заключенные между <i>lox</i> 66/ <i>lox</i> 71 сайтами, состоящие из (Km ^R , Sm ^R) и Е-элемента	Данная работа
Плазмиды:		[
pMIV5	ApR; pMW119, несущая mini-Mu(LR) единицу, содержащую MCS из pUC59	Abalakina et al., 2008
pMIV5-[FRT- KmR-FRT]- SmR-Mob	Ap ^R ; Km ^R ; Sm ^R ; pMIV5-Mob[FRT-Km ^R -FRT] содержащая 1.9 т.п.н. <i>EcoR</i> V фрагмент, несущий <i>strAB</i> гены под контролем <i>M.methylotrophus</i> P _{17Mme} промотора	Abalakina et al., 2008
pOK12	Km ^R ; вектор для клонирования	Vieira and Messing, 1991
pOK17PR	Km ^R ; pOK12, содержит 0.1т.п.н. <i>ClaI-Eco</i> RI фрагмент с <i>M. methylotrophus</i> P _{17Mme} промотором	Лабораторная коллекция
pTP310	Tc ^R ; pRK310, содержащая 5.7т.п.н <i>ВатН</i> фрагмент pUC-MuAB, несущий MuAB, <i>ner</i> , и c ^{ts} гены	Abalakina et al., 2008
P17TP310	Tc ^R ; pRK310 с 3,4 т.п.н. фрагментом, содержащим гены Mu <i>AB</i> под P _{17Mme} промотором	Akhverdyan et al., 2011
pT-P _{lac} -cre	Тс ^R ; pRK310, содержащая 1,1т.п.н. фрагмент с геном <i>cre</i> под Р _{lac}	Данная работа
pBGR10	Gm ^R , Km ^R ; производная pBHR1, содержит <i>aac1</i> ген с плазмиды pBGEA10	Ishikawa et al., 2008
pCM110	Tc ^R ; <i>M. extorquens</i> AM1 экспрессионный вектор pCM110 широкого круга хозяев IncP группы;	Marx and Lidstrom, 2001
pCM110-Gm ^R	Gm ^R ; производная плазмиды pCM110, используемая в данной работе для «shotgun» клонирования <i>C. glutamicum</i> ДНК фрагментов в <i>E. coli</i>	Данная работа
pAH162	Тс ^R ; производная плазмиды R6K, имеющая oriRy	Haldimann and Wanner, 2001; Posfai et al., 1994
pAH-mini- Mu(LR)-K	Tc^{R} ; Sm^{R} ; Km^{R} ; pAH162-Mu <i>att</i> L- T_{his} -P _{17Mme} [<i>lox</i> 66- <i>strAB</i> -Km ^R - <i>lox</i> 71]- T_{deo} -Mu <i>att</i> R	Данная работа
рКТ139	Плазмида pFA6a–link–yECitrine–SpHIS5, кодирующая YFP	<i>Sheff and Thorn</i> , 2004 EUROSCARF, ANo P30186

pAH-mini- Mu(LR)-YK	Tc ^R ; Sm ^R ; Km ^R ; производная pAH-mini- Mu(LR)-K; содержит <i>yECitrine</i> внутри mini-Mu ; pAH162-Mu <i>att</i> L-T _{his} -P _{17Mme} <i>yECitrine</i> [lox66- <i>strAB</i> -Km ^R -lox71]-T _{deo} -Mu <i>att</i> R	Данная работа
pAH-mini- Mu(LER)-YK	Tc^{R} ; Sm ^R ; Km ^R ; производная pAH-mini- Mu(LR)-YK, содержит E _{direct} в составе mini- Mu; pAH162-Mu <i>att</i> L-T _{his} - P _{17Mme} yECitrine[lox66- strAB-E-Km ^R -lox71]-T _{deo-} Mu <i>att</i> R	Данная работа
pAH-mini- Mu(LR)-YK	Tc ^R ; Sm ^R ; Km ^R ; производная pAH-mini- Mu(LR)-YK, содержит E _{converse} в составе mini- Mu	Данная работа
рКТ128	pFA6a–link–yEGFP–SpHIS5 кодирует yEGFP	<i>Sheff and Thorn</i> , 2004 EUROSCARF, ANo P30174
pAH-mini- Mu(LER)-GK	Tc ^R ; Sm ^R ; Km ^R ; производная pAH-mini- Mu(LER)-YK, в которой <i>yECitrine</i> заменен на <i>yEGFP</i>	Данная работа GenBankANo MG014198
p06-P _{dapA}	Cm ^R ; производная pVK9; содержит <i>E. coli</i> репликон p15A, промотор P _{dapA}	Лабораторная коллекция
p06-P _{dapA} -cre	Cm ^R ; p06-P _{<i>dapA</i>} , содержит 1.1 т.п.н. <i>SalI-КpnI</i> фрагмент с <i>cre</i> геном под контролем Р _{<i>dapA</i>} промотора	Данная работа GenBankANoMG014197
pVK9	Km ^R ; шаттл-вектор: <i>C. glu</i> pCG1 репликон [<i>Ozakietal.</i> , 1984]; <i>E. coli</i> ColE1 репликон [<i>Backman et al.</i> , 1979]	Nakamura et al., 2006
pVK-Gm ^R	Производная pVK9, имеющая Gm ^R -маркер,	Данная работа
pVK- <i>lacI</i> ^Q -P _{tac} - MuAB	Производная pVK-Gm ^R , содержащая <i>lacI</i> ^Q -P _{tac} - MuAB	Данная работа GenBankANoMG014199
pVK-P _{dap} - MuAB	Производная pVK-Gm ^R , содержащая P _{dap} - MuAB	Данная работа

2. Олигонуклеотиды

Химический синтез олигонуклеотидов, используемых в дальнейшем в качестве праймеров для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), осуществлялся фирмой «Синтол» (Москва, Россия) на коммерческой основе. Структура синтезированных олигонуклеотидов приведена ниже в Таблице 2.

Прай	Нуклеотидная последовательность(5' – 3')	Примечание
мер	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	-
P1	GGATTCATGCAAGGAAACTATCATGCAGGTGA	Конструирование рАН-
	CACCCTATCATTG	mini-Mu(LR)-YK
P2	CGTACTTCAAGTGAATCAATACAACCCCCATT	Конструирование рАН-
	CACTGCCAGAGC	mini-Mu(LR)-YK
P3	GAAAAGATTACTTCGCGTGAACGTTTTTTGAA	Конструирование рАН-
	GCTGTTAT	mini-Mu(LR)-YK
P4	CTAGTCGCTGAATATTCCTTTTG	Конструирование рАН-
		mini-Mu(LR)-YK
P5	GCCCTTCCCAACAGTTGCAATTCTTAACGACG	Конструирование рАН-
	GTAATTG	mini-Mu(LR)-YK
P6	CAGCTTCAAAAAACGTTCACGCGAAGTAATCT	Конструирование рАН-
	TTTC	mini-Mu(LR)-YK
P7	ATA <u>TCTAGA</u> ATCT <u>ATCGAT</u> AATGATGACATCG	Конструирование рАН-
	CTGGTTAG	mini-Mu(LR)-YK / XhoI,
		ClaI подчеркнуты
P8	CAATTACCGTCGTTAAGAATTGCAACTGTTGG	Конструирование рАН-
	GAAGGGC	mini-Mu(LR)-YK
P9	CTGACATGGGAATTAGCCATGTAACTAGCTAG	Конструирование рАН-
- 10	TCGCTGAATATTCCTTTT	mini-Mu(LR)-YK
P10	ATA <u>TCTAGA</u> ATCT <u>ATCGAT</u> AATGATGACATCG	Конструирование рАН-
		mini-Mu(LR)-YK / Xhol-
211		Clal подчеркнуты
PII	CATTITICICICCAGCITICAAGATCCCCATGI	Конструирование рАН-
D10		mini-Mu(LR)-YK
P12	TAGTITCCITGCATGAATCCATA	Конструирование рАН-
D10		mini-Mu(LR)-YK
P13		Конструирование рАН-
D14		mini-Mu(LR)-YK
P14	GCGATAAGAGTAATIGTGTTTCGC	Конструирование рАН-
D15		mini-Mu(LR)-YK
P15	AIAACIICGIAIAAIGIAIGCIAIACGAACGGIAG	Конструирование рАН-
	CGATAAGAGTAATIGIGITICGC	$\min -Mu(LR) - YK / IOX / I$
D16		Отмеченкурсивом
P10		конструирование рАН-
D17		
P1/	ATAACTICUTATAATUTATUCTATACUAAC	конструирование рАп-
D10		
P18		конструирование рАп-
D10	ΑΤΑΤΟΤΑGΑΤΑΤΟΟΟGGGTTGCAGCATTACAC	Конструирование рАН
117	GTCTTGAGC	mini-Mu(I R)-VK / YhoI
	UICTIONUC	$\frac{1}{2} \sum_{n=1}^{m} \frac{1}{n} \sum_{n=1}^{m} \frac{1}$
P20	ΔΤΔΟΤΟGΔGGΔΔΟΤGCΔΟΔΤΤΟGGGΔΤΔΤΤΤΟ	Конструирование рАН
120	TC	mini-Mu(I R)-YK / XhoI
		подтеркиут

Таблица 2 - Олигонуклеотиды, использованные в работе

P21	ATA <u>CCCGGG</u> CCATCTAGTATGACGTCTGTCGC	Конструирование рАН-
	ACC	mini-Mu(LR)-YK / SmaI
		подчеркнут
P22	ATA <u>CTCGAG</u> ATAACTTCGTATAGCATACATTATAC	Конструирование рАН-
	<i>GAACGGTA</i> TTATTTGTACAATTCATCAATACCA	mini-Mu(LR)-YK / XhoI
	TGG	подчеркнут,
		<i>lox</i> 66отмечен <i>курсивом</i>
P23	ATA <u>ATCGAT</u> AGGAGGTTAATTAAC <u>ATG</u> TCTAA	Конструирование рАН-
	AGGIGAAG	mini-Mu(LR)-YK / Clai
		подчеркнут, SD отмечен
D24		курсивом
P24	ATA <u>CCCGGG</u> GCATCGACATCACATCGTATTCA AC	mini-Mu(LER)-YK, pAH-
		mini-Mu(LÉR)-YK / Smal
		полчеркнут
P25	ATACCCGGGACATTTAAAAACCCTCCTAAGTT	Конструирование рАН-
	TTG	mini-Mu(LER)-YK, pAH-
		mini-Mu(LÈR)-YK / SmaI
		подчеркнут
P26	TTGCAGCATTACACGTCTTGAGC	Конструирование рАН-
		mini-Mu(LER)-YK, pAH-
		mini-Mu(LER)-YK
P27	GGGCCATCTAGTATGACGTCTGTC	Конструирование рАН-
		mini-Mu(LER)-YK, pAH-
		mini-Mu(LER)-YK
P29	TTTCGTACTTCAAGTGAATCAATACA	Определение точки инте-
		грации MuattL- 5'(-)
P30	GGAGGACATTGGATTATTCGG	Определение точки инте-
		грации MuattL-5'(+)
P31	TTTAGCTTTCGCGCTTCAAATG	Определение точки инте-
		грации Mu <i>att</i> R-5'(+)
P32	TTTATCGTGAAACGCTTTCGC	Определение точки инте-
200		грации MuattR-5'(-)
P33	ATACIGCAGATGATCAAAATCGCACIG	Определение точки инте-
D24		грации (<i>att</i> R)
P34	ATAGAATICITAACGACGGTAATIGAG	Определение точки инте-
P35	ΔΤΔGCTΔGCΔGCGGGTGΔTGGGΔCTΔΔCG	Конструирование рСМ110-
1 55	AINGEINGENGEGGGTGATGGGAETAAEG	Gm ^R
P36	ATAGCTAGCTCTCTGTGCATGGTGAAAACGG	Конструирование рСМ110-
		Gm ^ĸ
P39	ATATATGCTAGCAGCGGGTCATGGGACTCACG	Конструирование рVК-
	CCTGAGCCTAGCAGCGGGTGATGG	<i>lacI</i> ² -Р _{tac} -MuAB / NheI под-
		черкнут
P40	ATATAT <u>GCTAGC</u> TCTCTGTGCATGGTGAAAAC	Конструирование pVК-
	GG	<i>lac1</i> ~-Р _{tac} -MuAB / Nhel под-
1		черкнут

P41	ATA <u>TCTAGA</u> GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT	Конструирование рVК-
	CCACACATACGAGCCGATGATTAATTGTCAACAG	$lacI^{Q}$ -P _{tac} -MuAB / P _{tac} отме-
	<i>CTC</i> ATTAATTCAGAATATACACCATCGAATGG	чен <i>курсивом</i> , Q мутация
	TGCAAAACC	отмечена жирным шриф-
		том, XbaI подчеркнут
P42	ATA <u>GGTACC</u> AGCTAACTCACATTAATTGCGTT	Конструирование рVК-
	GC	<i>lacI^Q-Р_{tac}-МuAB / Крn</i> I под-
		черкнут
P43	ATA <u>GTCGAC</u> AGGAGGTGTTAAATGTCCAATTT	Конструирование р06-Р _{<i>dapA</i>} -
	ACTGA	cre / SalI подчеркнут
P44	ATA <u>GGTACC</u> CATAAATATCAAATAATTATAGC	Конструирование р06-Р _{<i>dapA</i>} -
		<i>cre / Крп</i> І подчеркнут
P63	ATA <u>ATCGAT</u> AGGAGGAACCACCATGTCTAAAG	Конструирование рАН-
	GTGAAGAATTATTC	mini-Mu(LER)-GK / ClaI
		подчеркнут, SD отмечен
		курсивом
P64	ATA <u>CTCGAG</u> ATAACTTCGTATAGCATACATTATAC	pAH-mini-Mu(LER)-GK /
	<i>GAACGGTA</i> GCTTATTTGTACAATTCATCCATAC	XhoI подчеркнут, lox66 от-
	С	мечен курсивом
P37	TGATTGAACAAGATGGAT	На ген Кт ^к (проверочный
		и проба для гибридизации)
P38	CTCAGAAGAACTCGTCAA	На ген Кт ^к (проверочный
		и проба для гибридизации)
P56	ATAATA <u>GCTAGC</u> TGATGCTCGATGAGTTTTTTC	Конструирование рVК-
		<i>lacI^Q-P_{tac}-MuAB / Nhe</i> I под-
		черкнут
P57	ATATAT <u>GCTAGC</u> TGTAAAAAACTTCTGCGTCG	Конструирование рVК-
	CCCCGCAAATTTTCG	<i>lacI</i> ^Q -Р _{tac} -MuAB / NheI под-
		черкнут

3. Стандартные генно-инженерные методики

Рестрикцию, лигирование, электрофорез ДНК в геле 0,8% агарозы, Ca²⁺зависимую трансформацию клеток *E. coli*, а также ДНК-ДНК гибридизацию по Cayзерну осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [*Sambrook and Russel*, 2001]. Выделение плазмидной ДНК проводили, используя Qiaprep spin kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Геномная ДНК выделялась набором «Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA). В работе использовали препараты эндонуклеаз рестрикции, T4 ДНК-лигазы, *Pfu* ДНК-полимеразы, Long PCR Enzyme Mix и High Fidelity PCR Enzyme Mix Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) и *Taq* ДНК-полимеразы «Силекс-М» (Москва) в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя. Определение нуклеотидной последовательности проводили в лаборатории «Генотехнология» (Москва) на комерческой основе.

4. Электротрансформация клеток C.glutamicum

Протоколы, представленные в работе, оптимизированы с целью достижения максимальной эффективности электротрансформации нативной плазмидной ДНК, находящейся в суперскрученной форме (выделенной из E.coli клеток). Для приготовления компетентной культуры 250 мкл свежих клеток Corynebacterium glutamicum засевали в 5 мл жидкой ВНІ среды и подращивали до ОП₅₉₅ – 1,2-2,0 при 32°С приблизительно 1,5-2 часа. Затем добавляли ампициллин до концентрации 100 мкг/мл и инкубировали еще 1 час. Клетки сразу помещали в ледяную баню. Осадок клеток, собранный из 5 мл культуры, трижды отмывали на льду 1 мл ледяной деионизованной воды, затем ресуспендировали в 50 мкл той же воды. К компетентной культуре добавляли ДНК непосредственно перед проведением электропорации в концентрации 50-100 нг плазмидной ДНК. Клетки переносили в 0,1 см предварительно охлажденные стерильные кюветы. Электротрансформацию проводили в MicroPulserTM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) электропораторе с параметрами электрического импульса: 2,0 kV, 25 μF и 200Ω. Сразу после электропорации к клеточной суспензии добавляли 1 мл жидкой ВНІ среды и подращивали в условиях аэрации 2-3 часа при 32°С. Все высевали на селективные чашки с агаризованной средой ВНІ и инкубировали 2 суток при 32°С. Максимальная эффективность трансформации для двух других С. glutamicum штаммов MB001 (DSM102070) и АТСС13032 была достигнута инкубацией клеток этих штаммов с 1мл ВНІ в течение 6 минут при 46°С сразу после электропорации.

5. Электротрансформация клеток *M. methylotrophus* AS1 (*M. extorquens* AM1)

Для приготовления компетентной культуры клетки ночной культуры *M. methylotrophus* AS1 (*M. extorquens* AM1), разведенные в 5 раз, подращивали в 10 мл жидкой минимальной среде SEIIa (Hypho) до ОП₆₀₀ –0,8-1,0. Осадок клеток, собранный из 10 мл культуры, трижды отмывали на льду 1 мл ледяной деионизованной воды, затем ресуспендировали в 100мкл (50 мкл) той же воды. Непосредственно перед проведением электропорации к компетентным клеткам добавляли плазмидную ДНК в концентрации 100 нг. Электротрансформацию проводили в 0,2 см (0,1 см) предварительно охлажденных кюветах в MicroPulserTM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) электропораторе с параметрами электрического импульса 2,5 kV, 25 μ F и 200 Ω (1,8 kV, 25 μ F и 200 Ω). Сразу после проведения электропорации к клеточной суспензии добавляли 1 мл жидкой SEIIa (Hypho) среды, содержащей в качестве источника углерода метанол (1%). После чего клетки подращивали в условиях аэрации 3 часа при 37°C (30°C) и высевали на селективные чашки с агаризованной средой SEIIa (Hypho). Чашки инкубировали 2 - 3 суток при 37°C (30°C).

6. Интеграция mini-Mu транспозона в хромосому C. glutamicum

Для интеграции mini-Mu в хромосому *C. glutamicum* был использован протокол электротрансформации, описанный в «Разделе 4». Для транспозиции клетки *C. glutamicum*, содержащие хелперную плазмиду pVK-*lacI*^Q-P_{tac}-MuAB засевали с высокой начальной плотностью (OП₅₉₅-0,4-0,8) и культивировали при 37°C в течение ночи. Затем 500 мл ночной культуры клеток *C. glutamicum* засевали в 5 мл жидкой ВНІ среды и подращивали при 32°C до OП₅₉₅ 1,5-2 приблизительно 1,5-2 часа. Индукцию экспрессии генов MuAB осуществляли сразу после электропорации во время восстановительной стадии добавлением 1,5 мМ ІРТG в жидкую ВНІ среду. Интегранты отбирали на твердой ВНІ среде, содержащей канамицин. Интеграция подтверждалась с помощью ПЦР, используя P37/P38 праймеры. Полученные Km^Rклоны проверялись на наличие маркеров Sm^R и Tc^R.

Излечивались от хелперной плазмиды культивированием интегрантов с аэрацией в жидкой ВНІ среде при 37°С в течение 48 часов с одним пересевом и последующим высевом в разведениях на агаризованные чашки с ВНІ средой. На отсутствие хелперной плазмиды указывал Gm^S фенотип.

В специально спланированном эксперименте, описанном в «Результатах и обсуждении» препараты релаксированной, коваленто-замкнутой плазмидной ДНК были использованы для трансформации. Для релаксации нативная плазмида была гидролизована по уникальному сайту рестрикции (*SaI*I), затем ковалентно замкнута с помощью T4 DNA лигазы при низкой концентрации плазмидной ДНК (~1мкг/мл).

7. Интеграция mini-Mu транспозона в хромосому M. methylotrophus AS1, M. extorquens AM1

Транспозицию mini-Mu-единицы в хромосому бактерий осуществляли посредством электротрансформации интегративной плазмиды в концентрации 200 нг в реципиентные штаммы *M. methylotrophus*, *M. extorquens*, содержащие хелперную плазмиду p17TP310. Интегранты отбирали на твердой среде с добавлением канамицина. Интеграция подтверждалась с помощью ПЦР, используя P37/P38 праймеры. На разрешение коинтеграта и отсутствие хелперной плазмиды указывал Tc^S фенотип.

8. Внутрихромосомальная амплификация mini-Mu(LER) единицы в клетках *C. glutamicum*

В разрешенный Sm^R коинтеграт, в хромосоме которого осталась только одна копия mini-Mu(LER) единицы (см. «Обзор литературы»), вновь вводили хелперную плазмиду pVK-*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB (или pVK-P_{dap}-MuAB) с помощью электротрансформации, и клетки культивировали в течение ночи с аэрацией при 37°C в жидкой BHI среде, содержащей 1.5 мМ IPTG. Далее клетки высевали в разведениях (от 10^{-2} до 10^{-5}) на агаризованную BHI среду для отбора целевых Sm^{HR} клонов, устойчивых к высокой (750мкг/мл) концентрации стрептомицина. Эффективность амплификации рассчитывалась как отношение количества выросших Sm^{HR} клонов к общему количеству Sm^R клеток, высеянных на чашку. Для «излечивания» от хелперной плазмиды, Sm^{HR} клоны культивировали с аэрацией в жидкой BHI среде при 37°C в течение 48 часов с одним пересевом и высевали в разведениях на агаризованные чашки с BHI средой. Среди полученных отдельных колоний отбирали клоны, обладающие Gm^S фенотипом.

9. Внутрихромосомальная амплификация mini-Mu(LER) единицы в клетках *M. methylotrophus* AS1

Интегранты *M. methylotrophus* AS1, содержащие хелперную плазмиду p17TP310, растили в течение ночи с аэрацией при 37° C, высевали от 10^{-1} до 10^{-5} клеток на агаризованные селективные среды. Клоны, устойчивые к высоким концентрациям стрептомицина – 2 мг/мл (Sm^{HR}), «излечивали» от хелперной плазмиды аэроб-

ным культивированием в жидкой среде при 37°С в течение 24 часов. Амплификацию mini-Mu(LER) единицы подтверждали, используя ДНК-ДНК гибридизацию по Саузерну.

10. Вырезание ДНК фрагмента, заключенного между *lox* сайтами, из mini-Mu единиц, интегрированных в геном *C. glutamicum*

Хелперная плазмида р06- P_{dapA} -*cre* была введена в клетки *C.glutamicum*, содержащие в хромосоме mini-Mu-транспозон, по маркеру Cm^R с помощью электротрансформации. Полученные Cm^R клоны рассевались до отдельных колоний на твердой ВНІ среде, не содержащей антибиотика Cm. Фенотипы Km^S и Sm^S полученных клонов свидетельствовали об утрате ДНК фрагмента, заключенного между *lox* сайтами.

11. Вырезание ДНК фрагмента, заключенного между *lox* сайтами, из mini-Mu единиц, интегрированных в геном *M. methylotrophus* AS1

Хелперная плазмида pT-P_{lac}-cre была введена в клетки, содержащие в хромосоме mini-Mu-транспозон, по маркеру Tc^R с помощью электротрансформации. Полученные Tc^R клоны рассевались до отдельных колоний на твердой SEII среде, не содержащей антибиотика Tc. Фенотипы Km^S и Sm^S полученных клонов свидетельствовали об утрате ДНК фрагмента, заключенного между *lox* сайтами.

12. Гибридизация по Саузерну

Гибридизация по Саузерну была проведена согласно предоставленному протоколу [Sambrook and Rassel, 2001] с использованием следующего оборудования: Bright StarTM-Plus Positively Charged Nylon Membrane (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), VacuGene XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) и Hybridization oven/shaker (Amersham Biosciences). Для «мечения» зонда ДНК Biotin-11-dUTP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) стандартная ПЦР проводилась в 50 мкл. Реакционная смесь содержала необходимую пару праймеров, матрицу, 0.2 мМ Biotin labeling mix и *Taq* DNA полимеразу. Biotin labeling mix представляла собой водный раствор 2мМ dGTP, 2 мМ dATP, 2 мМ dCTP, 1.3 мM dTTP, и 0.7 мМ Biotin-11-dUTP . Biotin chromogenic detection kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) использовался для визуализации проб ДНК после гибридизации по Саузерну. Для амплификации проб использовали пару праймеров P37/P38 на ген *kan*, P22/P23 на ген *yECitrine*, P63/P64 на ген *yEGFP* (Таблица 2).

13. Измерение относительной флуоресценции

Для измерения удельной флуоресценции *C. glutamicum* штаммов, содержащих интегрированный в хромосоме гены *yECitrine* и/или *yEGFP*, и контрольного штамма, не имеющего mini-Mu транспозон в хромосоме, клетки суспендировали в 200 мкл H₂O в 96-well плашках (GBO, Kremsmünster, Austria). Оптическая плотность (OП₅₉₅) и флуоресцентная интесивность (F) полученной суспензии определялась с помощью прибора SafireTM plate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). Для yECitrine и yEGFP были выбраны длины волн возбуждения/ испускания 522/560 нм и 490/522 нм, соответственно. В качестве фона была принята интенсивность флуоресценции воды в отсутствии клеток ($F_{\phi o H}$). Среднее значение ОП₅₉₅ соответствовало 0,2-0,3. Относительная интенсивность флуоресценции рассчитывалась по формуле: RF=[($F_{o пыт}$ - $F_{\phi o H}$)/OП_{опыт}] и выражалась в условных единицах.

14. Определение точек интеграции mini-Mu транспозона в хромосоме *C. glutamicum*

Определение точек интеграции mini-Mu элементов в бактериальную хромосому проводилось по методу разработанному ранее Д.В. Зименковым [Зименков и др., 2004]. Выделенную из интегранта хромосому гидролизовали по нескольким содержащимся в составе mini-Mu транспозона сайтам узнавания рестриктазами RsaI или Sau3A. Рестриктазы были выбраны с таким расчетом, чтобы один из сайтов узнавания эндонуклеазами располагался близко к Mu-L- или Mu-R-концам, соответственно (Рисунок 13). Линейные фрагменты хромосомы были замкнуты в кольцо с помощью T4 ДНК лигазы при низкой концентрация ДНК. Используя полученную лигазную смесь в качестве матрицы и дивергентно направленные праймеры P29/P30 и P31/P32, комплементарные Mu-L или Mu-R концам, соответственно, обратная ПЦР была поставлена, как было описано ранее [Зименков и др., 2004]. Нуклеотидная последовательность фланкирующих транспозон участков ДНК хромосомы хозяина в полученных ПЦР фрагментах была определена, используя те же праймеры. Локус инсерции транспозона идентифицировали, сравнивая данные сиквенса по методу Сенгера с опубликованной нуклеотидной последовательностью генома *C. glutamicum*, используя программу BLAST на сайте NCBI.



Рисунок 13 - Схема определения точек интеграции mini-Mu единицы в хромосоме *C. glutamicum* [по *Зименкову*, 2004]

15. «Shotgun» клонирование интегрированных в хромосому *C. glutamicum* копий mini-Mu единиц

Выделенную из интегранта (клон №10) хромосому гидролизовали рестриктазой *Stu*I (сайт узнавания не содержится в составе mini-Mu(LER)-YK транспозона). Полученные фрагменты хромосомальной ДНК клонировали в состав плазмиды pCM110-Gm^R, обработанной *Swa*I эндонуклеазой. Отбор трансформантов проводили в *E. coli* TG1 клетках по маркеру устойчивости к канамицину (детальная схема конструирования представлена на Рисунке 20 «Раздел 2.1»). Нуклеотидная последовательность ДНК участков хромосомы, фланкирующих транспозон, была определена с плазмиды, используя дивергентно расположенные праймеры Р33 и Р34, комплементарные концевым участкам транспозона Mu-L и Mu-R (Рисунок 20 «Результаты и обсуждение – Раздел 2.1»). Локус инсерции транспозона идентифицировали, сравнивая данные сиквенса с опубликованной нуклеотидной последовательностью генома *C*. *glutamicum*, используя программу BLAST на сайте NCBI.

16. Конструирование рекомбинантных плазмид 16.1 Конструирования хелперной плазмиды рVK9- *lacI^Q-P_{tac}-MuAB*

Для конструирования хелперной плазмиды pVK9-*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB (GenBank ANo MG014199) сначала 4,4 т.п.н. фрагмент, содержащий репликон криптической плазмиды pCG1 C. glutamicum [Tauch et al., 2003; Nakamura et al., 2006] и E.coli репликон рМВ1, был получен с помощью ПЦР, используя праймеры Р 56/57 и плазмиду рVК9 в качестве матрицы. Затем 1,0 т.п.н. ПЦР фрагмент, содержащий ген *аасС1* транспозона Tn1696 [Rubens et al., 1979], был амплифицирован с помощью ПЦР, используя пару праймеров Р39-Р40 и плазмиду pBGR10 в качестве матрицы. Оба фрагмента были обработаны NheI рестриктазой и объединены в реакции лигирования с получением плазмиды pVK-Gm^R. Затем 1,3 т.п.н. фрагмент, содержащий промотор Р_{tac} и дивергентно-транскрибируемый ген lacl^q, был амплифицирован с помощью ПЦР, используя праймеры P41/P42 и хромосому штамма E.coli K-12 MG1655 в качестве матрицы (Q-мутация и промотор P_{tac} были включены в состав праймера P41). Полученный фрагмент и плазмида pVK9-Gm^R были обработаны KpnI и XbaI эндонуклеазами и объединены в реакции лигирования с получением плазмиды pVK-Gm^RlacI^Q-Ptac. Наконец, 5.3 т.п.н. EcoRV-Ecl136II фрагмент, содержащий структурные гены MuA и MuB плазмиды pTP310, был клонирован на плазмиду pVK-Gm^RlacI^Q-Ptac, предварительно обработанную эндонуклеазой SalI с последующим туплением концов.

16.2 Конструирования хелперной плазмиды pVK-P_{dap}-MuAB

Для конструирования хелперной плазмиды pVK-P_{dap}-MuAB 5,3 т.п.н. *Eco*RV - *Крп*I фрагмент, содержащий гены MuA и MuB, был изолирован из плазмиды pTP310 и клонирован в состав вектора pO6-P_{dap}, в область между *Sma*I – *Крп*I сайтами узна-

вания, под транскрипционный контроль P_{dapA} промотора *C. glutamicum*. Далее *SpeI-MluI*_{«тупой»} фрагмент был выделен из плазмиды pO6-P_{dap}-MuAB и переклонирован в вектор pVK9Gm, обработанный рестриктазами *XbaI-SmaI*. В результате была сконструирована хелперная плазмида pVK9-P_{dap}-MuAB.



Рисунок 14 - Схема конструирования интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(LR)-YK

16.3 Конструирование интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(LR)-YK

ПЦР с перекрывающими праймерами (OE-PCR) и классическое клонирование были использованы при конструировании интегративных плазмид, содержащих разные OE-PCR mini-Mu единицы (Рисунок 14). Сначала 2 т.п.н. фрагмент, содержащий *pir*⁺-зависимый *γ*-репликон плазмиды R6K *E. coli* [*Bowers et al.*,2007] и *tetA* ген транспозона Tn10 [Hillen and Berens, 1994; Lawley et al., 2000], был получен с использованием пары праймеров P1 и P2 и плазмиды pAH162 [Haldimann and Wanner, 2001; Posfai et al., 1994] в качестве матрицы. Потом 809 п.н. фрагмент, содержащий Ми-L конец, терминатор аттенуаторной области E. coli his оперона T_{his} [Kingsford et al., 2007] и промотор P_{17Mme}, был получен OE-PCR объединением трех ПЦР фрагментов, используя фланкирующую пару праймеров Р9/Р10 (для получения фрагментов использовали: праймеры Р3/Р4 и плазмиду pMIV5-[FRTKmR-FRT]-SmR-Mob в качестве матрицы для Mu-L конца; праймеры P5/P6 и хромосому E. coli штамма MG1655 в качестве матрицы для терминатора T_{his}; праймеры P7/P8 и плазмиду pOK17PR для промотора Р_{17Мте}). Параллельно 333п.н. фрагмент, содержащий Ми-R конец с терминатором T_{deo} E. coli deo оперона [Larsen et al., 1987], был получен OE-PCR, используя пару праймеров Р15/Р16 (для получения фрагментов использовали: праймеры P11/P12 и плазмиду pMIV5-[FRTKmR-FRT]-SmR-Mob в качестве матрицы на Mu-R конец; пару праймеров P13/P14 и хромосому штамма E. coli MG1655 в качестве матрицы на терминаторТ_{deo}). Затем полученные три фрагмента были объединены ОЕ-РСЯ, используя фланкирующие праймеры P10/P17, с получением 2,9 т.п.н.Р_{17Мте}.-T_{his}-attL-pAH162-T_{deo}-attR фрагмента. Также 1,5 т.п.н. фрагмент был получен с помощью ПЦР, используя пару праймеров P18/P19 и плазмиду pMIV5-[FRT-Km^R-FRT]-Sm^R-Mob в качестве матрицы. Фрагменты 2,9 т.п.н. и 1,5 т.п.н. были обработаны ApaI_{«тупой»} /XhoI и объдинены в реакции лигирования. Наконец, 1,7 т.п.н. фрагмент, содержащий гены strAB, был получен с помощью ПЦР, используя пару праймеров P20/P21 и плазмиду pHP17 в качестве матрицы, и клонирован в ранее сконструированную плазмиду, предварительно обработанную XhoI/SmaI эндонуклеазами. Полученная плазмида была названарАН-mini-Mu(LR)-К (Рисунок 14). На базе этой плазмиды был сконструирован ряд аналогичных интегративных плазмид.

Интегративная плазмида pAH-mini-Mu(LR)-YK была сконструирована встраиванием 0,78 т.п.н. фрагмента в pAH-mini-Mu(LR)-K, предварительно обработанную *ClaI/Xho*I эндонуклеазами. Фрагмент был получен с помощью ПЦР, используя пару праймеров P22/P23 и плазмиду pKT139 в качестве матрицы. В праймер P22 введен мутантный *lox*66 сайт [*Suzuki et al.*,2005], а искусственная SD последовательность «upstream» ATG_{yfp} была включена в праймер P23.
16.4 Конструирование интегративных плазмид pAH-mini-Mu(LER)-YK,

pAH-mini-Mu(LER)-YK

Плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-YK (GenBank ANo MG014198) и pAH-mini-Mu(LER)-YK были получены в реакции лигирования по тупым концам двух ПЦР фрагментов. Для получения первого 368 п.н. фрагмент, содержащий энхансерный элемент, был амплифицирован с помощью ПЦР, используя пару праймеров P24/25, и плазмиду pTP310 в качестве матрицы. Второй 7 т.п.н. фрагмент был получен с помощью ПЦР, используя пару праймеров P26/27 и плазмиду pAH-mini-Mu(LR)-YK в качестве матрицы. Разная ориентация энхансерного элемента была отобрана с помощью ПЦР, используя пару праймеров P19/P24 или P19/P25.

16.5 Конструирование интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-GK

Плазмида pAH-mini-Mu(LER)-GK была сконструирована заменой гена *yECitrine* на ген *yEGFP* в плазмиде pAH-mini-Mu(LER)-YK. Для этого 0,78 т.п.н. фрагмент был амплифицирован с помощью ПЦР, используя пару праймеров P63/P64 и плазмиду pKT128 в качестве матрицы. Искусственная SD последовательность «upstream» ATG_{gfp} была включена в праймер P63.

16.6 Конструирование плазмиды pCM110-Gm^R

Конструирование pCM110-Gm^R было осуществлено на базе плазмиды широкого круга хозяев pCM110 [*Marx and Lidstrom*, 2001]. Для этого 1,0 т.п.н. фрагмент, содержащий ген Gm^R, *aacC1*, с собственным промотором, был клонирован в плазмиду pCM110 между *Eco*47III и *Psp*1406I_{тупой} сайтами узнавания рестриктазами. Фрагмент был получен с помощью ПЦР, используя пару праймеров P16/P17 и плазмиду pBGR10 (производную pBHR1 [*Szpirer et al.*, 2001]) в качестве матрицы.

16.7 Конструирование хелперной плазмиды pT-P_{lac}-cre

Амплифицированный с помощью ПЦР, используя праймеры Р43/Р44, 1,1 т.п.н. фрагмент, содержащий ген *cre*, был клонирован в состав вектора широкого круга хозяев IncPα группы несовместимости pRK310 [*Ditta et al.*, 1985; *Marx and Lidstrom*, 2001] в *Bam*HI_{«тупой»} сайт.

16.8 Конструирование хелперной плазмиды р06-Р_{дарА}-сге

Для конструирования хелперной плазмиды p06-P_{dapA}-cre (GenBank ANo MG014197) сначала 1,1 т.п.н.фрагмент, содержащий ген *cre*, кодирующий Cre рекомбиназу фага P1, был получен с помощью ПЦР, используя пару праймеров P43/P44 и лизат фага P1 в качестве матрицы. Типичная для *C. glutamicum* SD последовательность перед геном *cre* была включена в состав праймера P43. Фрагмент был клонирован в плазмиду p06-P_{dapA}, обработанную *Sall/Kpn*I эндонуклеазами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Адаптация системы транспозиции бактериофага Ми для интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *C.glutamicum* ATCC 13869

1.1 Компоненты Ми-зависимой системы интеграции / амплификации / фиксации генов в хромосоме *C. glutamicum* ATCC 13869

С момента своего открытия в 1957 году, как продуцент L-глутамата непатогенная грамположительная почвенная бактерия, относящаяся к классу актиномицетов и классифицированная как «в целом признана безопасным» (GRAS) организмом, *Corynebacterium glutamicum* стала «рабочей лошадкой» в широкомасштабном промышленном производстве аминокислот, химических веществ, материалов, топлива и различных белков [*Becker and Wittmann*, 2012] («Обзор литературы»).

Поэтому в настоящее время достаточно остро стоит задача разработки новых высокоэффективных методов редактирования генома этого организма с целью конструирования высокопродуктивных промышленных штаммов.

Сведения об успешной реализации Ми-зависимой репаративной транспозиции рекомбинантной ДНК с помощью электропорации собранным *in vitro* комплексом, состоящим из МиА транспозазы и линейной mini-Mu единицы, в хромосомы различных организмов, включающих не только грамотрицательные [Lamberg et al., 2002; Lanckriet et al., 2009], но также грамположительные бактерии [Pajunen et al., 2005], а также обнаружение в геноме некоторых грамположительных Firmrcutes профагов, полностью или частично подобных фагу Mu [Taussaint, 2013], явились предпосылками к началу исследования возможности транспозиции фага Mu в хромосоме грамположительной бактерии Corynebacterium glutamicum.

Известно, что при осуществлении транспозиции Mu бактериофага *in vivo* в геномы бактерий по механизму репликативной транспозиции намного большее количество белков клетки хозяина принимает участие в этом процессе по сравнению с процессом простой инсерции [*Au et al.*, 2006; *North and Nakai*, 2005]. Однако интеграция целевых генов в бактериальную хромосому *E. coli* с последующим увеличением числа их копий в геноме осуществляется с высокой эффективностью с помощью двухкомпонентной Ми-зависимой системы транспозиции, первоначально разработанной и использованной в 80-х годах в нескольких западных лабораториях в различных целях [Groisman and Casadaban, 1986; Surrette et al., 1989; Savilahti et al., 1995], а в конце 90-х годов воспроизведенной в АГРИ группой проф. Ахвердяна для создания стабильных бесплазмидных рекомбинантных штаммов E.coli [Caspacosa u dp., 2007; Axвердян u dp., 2007]. Позже интеграция mini-Mu транспозона с последующей амплификацией его копий в хромосоме была осуществлена в АГРИ группой Йомантаса для метилотрофной бактерии Methylophilus methylotrophus AS1 («Обзор литературы», «Результаты и обсуждение – Раздел 5.1»).

Поскольку ранее адаптированная Ми-зависимая двухкомпонентная система интеграции гетерологичной ДНК в геном грамотрицательных бактерий оказалась высокоэффективным и удобным методом хромосомной инженерии, особенно для тех бактерий, для которых пока еще не разработано универсального генетического инструментария, было интересно его опробовать и для грамположительных бактерий. Для исследования был выбран штамм *C. glutamicum* ATCC 13869.

На первом этапе для проверки возможности интеграции и амплификации гетерологичных генов в хромосоме *C. glutamicum* с использованием механизма транспозиции фага Mu необходимо было провести модификацию ранее разработанной для метилотрофных бактерий двухкомпонентной системы транспозиции с целью экспрессии ее в клетках грамположительной бактерии.

Как было отмечено выше («Обзор литературы»), особенностью этой системы является то, что необходимые для транспозиции элементы и белковые факторы находятся в составе разных векторов, при этом одна из плазмид – интегративная не способна к автономной репликации, а другая - хелперная, обеспечивающая экспрессию факторов транспозиции MuAB, относительно стабильно поддерживается в штамме-реципиенте даже в неселективных условиях. Поскольку все ранее сконструированные хелперные плазмиды получены на базе векторов, способных к автономной репликации только в грамотрицательных бактериях, для осуществления Muзависимой транспозиции в геном *Corynebacterium glutamicum* необходимо было ввести гены MuA, MuB в состав плазмиды, способной к автономной репликации в этой бактерии. Поэтому для экспрессии генов факторов транспозиции MuA и MuB в клетках *C. glutamicum* была сконструирована хелперная плазмида pVK9-*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB («Материалы и методы»; Рисунок 15) на базе довольно стабильной в клетках *C. glutamicum* плазмиды pVK9-Gm^R, но в то же время обладающей способностью теряться при культивировании в неселективных условиях (без добавления антибиотика гентамицина в среду). Так доля клеток, потерявших плазмиду pVK9-*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB



Рисунок 15 - Схематическая карта плазмид, включенных в систему интеграции mini-Mu единиц в хромосому *C. glutamicum*, используя репликативный путь транспозиции фага Mu: (A) плазмида-помощник pVK-*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB, содержащая гены факторов транспозиции MuA, MuB; (B) интегративные плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-YK, pAH-mini-Mu(LER)-YK, и pAH-mini-Mu(LER)-GK; (C) плазмида-помощник, содержащая ген Сге рекомбиназы, p06- P_{dapA} -cre

при росте в неселективных условиях в течение ночи, составляет 3-10%. Оперон, содержащий гены MuAB, был клонирован в состав хелперной плазмиды со своим собственным сайтом связывания рибосомы (RBS), поскольку рассчитанная эффективность трансляции (URL:https://salislab.net/software/) [Borujeni and Salis, 2016] не предполагала проблем с трансляцией этих белков в клетках *C. glutamicum*. Экспрессия генов факторов транспозиции находилась под транскрипционным контролем довольно часто используемой в клетках *C. glutamicum* конструкции P_{tac}/O_{lac} и гена LacI^Q репрессора [*Eggeling and Bott*, 2005; *Kirchner and Tauch*, 2003; *Nešvera and Pátek*, 2011; *Ravasi et al.*, 2012]. Индукция синтеза MuAB осуществлялась добавлением в среду IPTG. Но поскольку *lacI^Q*-P_{tac}/O_{lac} система даже без индукции имеет достаточно высокий базальный уровень транскрипции [*Billman-Jacobe et al.*, 1994; *Xu et al.*, 2010], нередко могут возникать проблемы с клонированием токсичных для клеток генов. Однако мы не столкнулись с трудностями при клонировании генов MuAB в клетках *E.coli*.

Для сравнительной оценки влияния уровня синтеза факторов транспозиции MuA, MuB на эффективность процесса дополнительно была сконструирована хелперная плазмида pVK-P_{dap}-MuAB («Материалы и методы»). На этой плазмиде экспрессия генов MuA, MuB находилась под контролем конститутивного *C. glutamicum* P_{dapA} промотора средней силы [*Pátek*, 1996; *Pátek et al.*, 2005].

Надо отметить, что при конструировании плазмид pVK9-*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB и pVK-P_{dap}-MuAB были учтены недостатки предыдущей двухкомпонентной системы, paзpaботанной для метилотрофных бактерий, связанные с трудностями выявления типа механизма транспозиции (репликативный или репаративный) mini-Mu единицы с интегративной плазмиды в хромосому бактерии. Поэтому маркером отбора транс-формантов, содержащих хелперную плазмиду, была выбрана устойчивость к гента-мицину, кодируемая геном *aacC1*, способным выражаться в клетках *C. glutamicum* и отсутствующим на интегративном векторе.

Что касается второго элемента системы, то, исходя из схемы, предложенной для эффективной интеграции гетерологичных генов в хромосомы грамотрицательных бактерий, интегративная плазмида, содержащая mini-Mu единицу, может вообще не обладать способностью к репликации в клетках бактерии, что существенно облегчает отбор первичных интегрантов. Ранее сконструированные интегративные вектора, входящие в систему Mu-зависимой транспозиции, разработанную для метилотрофных бактерий, созданы на базе плазмиды рАН162 *E. coli* [*Haldimann and Wanner*, 2001; *Posfai et al.*, 1994] и имеют *pir*⁺-зависимый (*oriR* γ) репликон, а, следовательно,

не могут поддерживаться в клетках *C. glutamicum*. Этот факт, а также присутствие маркера отбора транспозиции в составе mini-Mu единицы позволяет напрямую вести селекцию первичных интегрантов в *C. glutamicum* клетках. Поэтому для проверки возможности работы системы в клетках *C. glutamicum* в качестве второго элемента Mu-зависимой системы транспозиции было удобно воспользоваться ранее сконструированной интегративной плазмидой. Однако предполагаемая в дальнейшем работа, направленная на получение стабильных безмаркерных рекомбинантных штаммов *C. glutamicum*, требовала введения некоторой модификации. В результате было сконструировано несколько вариантов интегративной плазмиды с использованием pir^+ -зависимого репликона *E. coli* плазмиды рАН162.

Не содержащая ДНК бактериофага Ми часть интегративной плазмиды имела *tetA* ген транспозона Tn*10* [*Hillen and Berens*, 1994; *Lawley et al.*, 2000], находящийся под контролем конститутивного промотора. Предполагаемая экспрессия этого гена в клетках *C. glutamicum* была очень важна для подтверждения образования коинтеграта в случае репликативной транспозиции и последующего его возможного разрешения, поскольку коинтеграты обладают Tc^R фенотипом в отличие от их разрешенных вариантов, а также от интегрантов, для которых встраивание mini-Mu единицы в хромосому произошло через репаративный механизм транспозиции («Обзор литературы»). Но, насколько нам было известно на сегодняшний день, экспериментальных данных, касающихся экспрессии гена *tetA* в клетках *C. glutamicum*, не существовало.

Для осуществления отбора первичной и внутрихромосомальной транспозиции состав mini-Mu единицы включал гены устойчивости к антибиотикам Km^R, Sm^R. Гены *strAB* были выбраны не случайно. Ожидалось, что клоны, содержащие несколько копий mini-Mu единицы в хромосоме *C. glutamicum* в результате внутрихромосомальной амплифиации, могут быть отобраны на высоких концентрациях стрептомицина, посколькууровень экспрессии одной копии *strAB* генов в клетках ранее исследуемой метилотрофной бактерии был относительно низким, позволяющий вести селекцию амплификантов [*Abalakina et al.*, 2008]. В случае экспрессии более высокого уровня устойчивости к стрептомицину (Sm^{HR}) в клонах, полученных в ходе внутрихромосомальной транспозиции mini-Mu единицы, по сравнению с уровнем устойчивости к стрептомицину стойчивости Sm^R в случае внутри-

только одну копию mini-Mu в хромосоме, гены *strAB* можно будет использовать в качестве селективного маркера отбора амплификации.

В качестве модельных, амплификацию которых в хромосоме C. glutamicum необходимо было продемонстрировать, были выбраны структурные гены *уЕСіtrine* или *уЕСFP*, кодирующие желтый флуоресцентный белок, уЕҮГР, или зеленый флуоресцентный белок, yEGFP. Кроме того, возможность использования флуоресцентных белков vECitrine, vEGFP в качестве дополнительного селективного маркера для предварительной оценки эффективности амплификации (количества копий mini-Mu, содержащихся в хромосоме бактерии) не исключалась, поскольку уровень экспрессии флуоресцентных белков легко можно измерить количественно с помощью метода спектрофлуорофотометрии [Chalfie et al., 1994]. Экспрессия генов yECitrine или уEGFP на mini-Mu(LER)-YK (или -GK) единицах, соответственно, находилась под транскрипционным контролем конститутивного промотора *Methylophilus* methylotrophus P_{17Mme} [Abalakina et al., 2008]. Канонические SD последовательности для создания искусственных RBS этих генов в бактериях были включены в праймеры, используемые для амплификации этих фрагментов в ПЦР, при этом рекомбинантные плазмиды pKT139 и pKT128 [Sheff and Thorn, 2004] выступили в качестве матрицы («Материалы и методы»).

Для исследования влияния Е-элемента на эффективность процессов первичной интеграции и внутрихромосомальной амплификации три варианта интегративных плазмид были сконструированы, различающиеся, главным образом, наличием Е-элемента (энхансера) и его ориентацией относительно L- и R-концов ДНК фага Ми в составе mini-Mu единицы. В mini-Mu(LR) кассете энхансер отсутствовал; в mini-Mu(LER) Е-элемент был правильно расположен по отношению к L- и R-концам, то есть соответствовал его природной ориентации в геноме Mu бактериофага; а в mini-Mu(LER) единице Е-элемент был развернут в противоположном направлении (Рисунок 15). В названиях всех интегративных плазмид отражены особенности состава mini-Mu единицы («Материалы и методы») (Рисунок 15).

Для конструирования в итоге штаммов, не содержащих маркеров устойчивости к антибиотикам, обеспечивающих селективность процессов интеграции и амплификации целевого фрагмента, а также для снижения вероятности внутримолекулярной транспозиции амплифицированных в составе mini-Mu единицы целевых генов во время проведения последующих раундов интеграции-амплификации модуль, содержащий Е-элемент и гены Km^R, Sm^R, был фланкирован *lox*66/*lox*71 последовательностями [*Albert et al.*, 1995], что позволило бы в дальнейшем необратимо удалить этот фрагмент из содержащейся в хромосоме mini-Mu кассеты с помощью Cre рекомбиназы фага P1 [*Abremski and Hoess*, 1984] на завершающей стадии эксперимента по амплификации («Материалы и методы»).

С целью удаления внутреннего фрагмента ДНК mini-Mu единицы, содержащего Е-элемент и гены Km^R, Sm^R, сообщающие устойчивость к соответствующим антибиотикам, была сконструирована хелперная плазмида на базе плазмиды p06-Cm^R, в составе которой клонирован ген Cre рекомбиназы фага P1 («Материалы и методы»; Рисунок 15). На этом векторе экспрессия гена Cre рекомбиназы находилась под контролем конститутивного *C. glutamicum* P_{dapA} промотора. Промотор P_{dapA} является промотором средней силы [*Pátek*, 1996; *Pátek et al.*, 2005], и был выбран с целью избежать сверхэкспрессии гена *cre*, которая может привести не только к Cre зависимой рекомбинации между мутантными *lox* сайтами, расположенными близко друг от друга, в составе одной и той же mini-Mu(LER) единицы, но также и между мутантными *lox* сайтами, находящимися в разных mini-Mu(LER) копиях, интегрированных в хромосому и отделенных друг от друга большим расстоянием.

В случае успешного вырезания все mini-Mu единицы приобретают mini-Mu(LR) подобный вид, отличающийся от исходного фенотипически, отсутствием маркеров устойчивости к антибиотикам, и содержат гены *yECitrine* или *yEGFP*, заключенные между Mu-L/R концами, экспрессия которых ведет к накоплению в клетках флуоресцентных белков, легко детектируемых в бактериальном геноме.

1.2 Транспозиция mini-Mu(LER) единицы с интегративной плазмиды, находящейся в суперскрученной форме, в хромосому *C. glutamicum* ATCC 13869

Чтобы проверить возможность транспозиции Mu бактериофага в хромосому *C. glutamicum* сначала с помощью электротрансформации («Материалы и методы») был получен штамм *C. glutamicum* ATCC 13869, содержащий хелперную плазмиду pVK-

lacI^Q-Р_{*tac*}-Ми*AB*. В полученный реципиентный штамм с помощью электротрансформации была введена интегративная плазмида pAH-mini-Mu(LER)-YK в условиях индукции экспрессии генов Mu*AB* посредством добавления IPTG в среду во время культивирования клеток после электропорации («Материалы и методы»).

Поскольку интегративные плазмиды, производные вектора pAH162, не способны к репликации в клетках *C. glutamicum*, появление Km^R трансформантов, предположительно, явилось результатом интеграции mini-Mu единицы в хромосому хозяина, используя либо репаративный, либо репликативный пути транспозиции Mu бактериофага [*Watson et al.*, 2004] (Рисунок 16)



Рисунок 16 - Два пути ДНК транспозиции фага Mu с интегративной плазмиды, содержащей mini-Mu единицу (IP), в хромосому бактерии (BC) [из Gorshkova et al., 2018].

Интересно отметить, что эффективность первоначальной транспозиции mini-Ми единицы значительно повысилась, когда клетки *C. glutamicum* подращивали при 37°С перед индукцией факторов транспозиции MuAB, как описано в разделе «Материалы и методы». Вероятно, этот эффект связан с возможным синтезом некоторых «белков теплового шока» и шаперонов, способствующих транспозиции.

Частота отбора Km^R клонов в результате трансформации интегративной плазмиды на селективных агаризованных средах составила $\approx 1.6 \times 10^{-4}$ (то есть ≈ 200 клонов/ 100 нг ДНК/ 3.2×10^{6} выживших после электропорации клеток). Эффективность транспозиции была всего лишь в 10 раз ниже эффективности трансформации сверхспирализованной плазмидной ДНК, введенной в клетку в тех же условиях, значение которой для *C. glutamicum* приблизительно составило $\approx 10^{-3}$ трансформантов от числа выживших клеток после электропорации.

Анализ полученных Km^{R} трансформантов обнаружил, что большинство отобранных клонов (95-99%) обладали также и Tc^{R} фенотипом. Но, как мы и предполагали, активность TetA в клетках *C. glutamicum* оказалась довольно низкой. Уровень экспрессии *tetA* гена сообщал Tc^{R} клеткам устойчивость только к 1 мкг/мл тетрациклина (Tc), добавленного в среду. Но тем не менее, уровень устойчивости клеток контрольного дикого Tc^{S} *C. glutamicum* штамма оказался ниже. Поэтому среди Km^{R} трансформантов можно было отделить варианты, обладающие Tc^{S} или Tc^{R} фенотипом.

Опираясь на предыдущий опыт с *M. methylotrophus* [Abalakina et al., 2008], мы предположили, что для Tc^S и Km^R клонов, появившихся в результате либо вполне возможной репаративной транспозиции, либо посредством быстрого разрешения коинтегратов в процессе репликативной транспозиции, уровень Sm^R может быть ниже, поскольку интегранты содержат только одну копию mini-Mu транспозона в хромосоме. Структура же коинтеграта предполагает интегрированную в хромосому кассету, состоящую из двух прямых повторов mini-Mu единиц, между которыми заключена не содержащая ДНК фага Ми часть интегративной плазмиды. Следовательно, в этих клонах можно ожидать проявления Sm^{HR} и Tc^R фенотипов. Проверка роста всех полученных вариантов на среде, содержащей разные концентрации стрептомицина, обнаружила, что подавляющее большинство отобранных трансформантов обладали Sm^{HR} (95-99%) фенотипом, поскольку росли на средах, содержащих 750 мкг/мл стрептомицина. Остальные (1-5%) трансформантов были устойчивы только к 250 мкг/мл Sm в среде, то есть проявляли Sm^R фенотип. Более того, практически все Sm^{HR} клоны были устойчивы к 1 мкг/мл тетрациклина, добавленного в среду. Как и ожидалось, все Sm^R клоны оказались чувствительны к тетрациклину (Tc^S). При этом оказалось, что хотя Sm^{HR} и Tc^R фенотип полученных клонов был достаточно стабильным, 97% отдельных колоний сохраняли его после пяти – восьми генераций в неселективных условиях, однако <3% приобретали Sm^R и Tc^S скорее всего из-за разрешения образовавшегося коинтеграта через механизм общей рекомбинации, вследствие чего вся нерепликативная плазмида, производная pAH162, вместе с одной копией mini-Mu были удалены из хромосомы. Поскольку уровень экспрессии одной копии генов *strAB* оказался относительно невысоким, сообщающим устойчивость приблизительно к 250 мкг/мл Sm, добавленного в среду, было предположено, что штаммы, имеющие несколько копий mini-Mu кассет в хромосоме *C. glutamicum*, можно будет отобрать на высоких концентрациях стрептомицина (Sm), как было показано ранее для *Methylophilus methylotrophus* [*Abalakina et al.*, 2008; *Абалакина и др.*, 2008].

На последнем этапе полученные Gm^R и Km^R интегранты были излечены от хелперной плазмиды, как описано ранее («Материалы и методы»), и были отобраны варианты, обладающие Gm^S и Km^R фенотипом.

Анализ yECitrine-зависимой флуоресценции в полученных Sm^{HR} клонах и их Sm^R производных подтвердил наши предположения (Рисунок 17А). Как и следовало ожидать, уровень относительной флуоресценции, регистрируемый в предполагаемых коинтегратах, был в 2 раза выше тестируемого в их Tc^S производных.

На данном этапе было установлено, что один клон (клон № 10) имеет стабильный, но отличный от других Sm^{HR} и Tc^S фенотип, природа происхождения которого будет проанализирована ниже («Раздел 2.1»).

Интеграцию mini-Mu транспозона в хромосому *C. glutamicum* АТСС 13869 окончательно подтверждали гибридизацией по Саузерну. Для проведения ДНК-ДНК гибридизации из нескольких Sm^{HR} и Tc^R клонов и их Sm^R и Tc^S производных была выделена хромосома, гидролизована по имеющемуся на плазмиде рАН-mini-Mu(LER)-YK уникальному сайту рестрикции *Sma*I эндонуклеазы, находящемуся внутри mini-Mu транспозона, но не затрагивающему ген Km^R. После разделения по лученных ДНК фрагментов на электрофорезе в агарозном геле была поставлена ДНК-ДНК гибридизация с полученным с помощью ПЦР в присутствии Biotin-11-dUTP «меченым» зондом на структурную часть гена Km^R, используемого в качестве маркера mini-Mu транспозона («Материалы и методы»). Было обнаружено, что все проверенные Sm^{HR} и Tc^R клоны содержали два выявляемых гибридизацией фрагмента гена Km^R, указывающих на наличие двух копий mini-Mu единицы в хромосоме



Рисунок 17 - уЕСіtrіne удельная флуоресценция (А) и результаты гибридизации по Саузерну (В) выполненные для родительского штамма (1), независимых коинтегратов (Sm^{HR}, Tc^R) и их соответствующих разрешенных интегрантов (Sm^RTc^S) (2, 3, 4, 5). Для гибридизации по Саузерну геномная ДНК отдельных клонов была обработана *SmaI* эндонуклеазой и гибридизована с амплифицированным с помощью ПЦР фрагментом ДНК, содержащим ген *kan*; (10) – результат, полученный для клона No. 10, обладающего отличным фенотипом (Sm^{HR}, Tc^S), отобранного в ходе стандартной процедуры интеграции с помощью транспозции фага Mu

бактерии, при этом все их Sm^R и Tc^S производные имели только одну копию mini-Mu единицы в геноме (Рисунок 17В). Размеры одного фрагмента ДНК хромосомы, содержащего ген Km^R, идентифицированного с помощью ДНК-ДНК гибридизации во всех обладающих Sm^{HR} и Tc^R фенотипом клонах, были одинаковыми и соответствовали линейной форме плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-YK, гидролизованной по *SmaI* сайту узнавания. Другой фрагмент ДНК хромосомы родительских Sm^{HR} и Tc^R клонов оказался идентичен фрагменту ДНК хромосомы их Sm^R и Tc^S производных, поскольку был фланкирован *SmaI* сайтом, содержащимся внутри mini-Mu единицы, и ближайшим к Mu-R концу на хромосоме бактерии, что подтверждает сохранение первоначальных точек интеграции mini-Mu транспозона в геноме бактерии после разрешения коинтеграта (Рисунок 18). Из вышесказанного можно заключить, что результаты гибридизации по Саузерну полностью согласуются с моделью репликативной транспозиции, сопровождающейся образованием коинтеграта с последующим его разрешением.

Таким образом, возможность транспозиции, обусловленная фагом Ми, была проанализирована на примере штамма *C. glutamicum* ATCC13869. Представленные экспериментальные данные однозначно указывают на то, что основным путем встраивания mini-Mu единицы (> 95%) в бактериальную хромосому с интегративной плазмиды, находящейся в суперскрученном состоянии, является репликативная транспозиция, предполагающая образование коинтеграта между ДНК бактерии и интегративной плазмидой.

Для небольшой доли (<5%) первоначально отобранных $Sm^{R}Tc^{S}$ интегрантов мы не смогли определить, какой из двух путей транспозиции был использован в данном случае, поскольку клоны, полученные по механизму репаративной, приводящий к «простой» вставке mini-Mu единицы, или репликативной транспозиции, с последующим быстрым разрешением коинтеграта и утратой генетических маркеров «суицидной» плазмиды, будут обладать идентичным $Sm^{R}Tc^{S}$ фенотипами.



Рисунок 18 - Пояснение к Рисунку 17 - Схема образования структуры коинтеграта и его разрешение в процессе репликативной транспозиции mini-Mu(LER)-YK в хромосоме *C. glutamicum* с последующим определением числа копий mini-Mu(LER)-YK единиц с помощью гибридизации по Саузерну

Согласно литературным данным [*Harshey*, 1983], MuA транспозаза не обладает резолвазной активностью, позволяющей облегчить разрешение коинтеграта до завершения процесса репликации Mu транспозосомы во время репликативной транспозиции. Таким образом, разрешение коинтеграта может зависеть только от активности белков клетки-хозяина, принимающих участие в механизме общей рекомбинации, главным образом, от активности продукта гена *recA* [*Fitzpatrick et al.*, 1994]. Поэтому для выявления механизма Mu-зависимой транспозиции mini-Mu единицы в геном клонов, обладающих Sm^R и Tc^S фенотипами на этапе первичной интеграции, RecA⁻ мутант штамма *C. glutamicum* ATCC 13869 был выбран в качестве реципиента. Эксперимент проводился в соответствии со стандартным протоколом. Эффективность появления Km^R трансформантов в этом опыте составила ($0,5\pm0,2$) × 10^{-4} (Km^R клонов/ 100 нг плазмидной ДНК/ на количество выживших клеток). Для RecA⁻ мутанта, аналогично ему изогенному RecA⁺ штамму, было обнаружено, что примерно 97-98% полученных Km^Rтрансформаторов обладали Sm^{HR} и Tc^R фенотипом, а остальные 2-3% оказались Sm^R и Tc^S. Но в отличие от Sm^{HR} и Tc^R коинтегратов, полученных в Rec⁺ штамме, фенотип их Rec⁻ аналогов был значительно более стабильным, поскольку Sm^R и Tc^S «резолванты» не были отобраны после пяти-восьми генераций культивирования в неселективных условиях.

Таким образом, использование в работе изогенного *C. glutamicum* ATCC 13869 $recA^-$ штамма помогло выявить, что небольшая часть первичных интегрантов, обладающих Sm^R и Tc^S фенотипом, в $recA^+$ штамме (<5%), вероятно, были получены через репаративный путь транспозиции mini-Mu единицы с интегративной плазмиды, находящейся в суперскрученной форме, в геном *C. glutamicum*. Участвуют ли белки клетки-хозяина в этом пути в *C. glutamicum* неизвестно, однако прямые аналоги *E. coli* RecBCD нуклеаз, которые взаимодействуют с транспозосомой, способствуя репарации простой Mu инсерции [*Choi et al.*, 2014], отсутствуют в этой бактерии [*Nakamura et al.*, 2003].

1.3 Влияние формы донорной ДНК и Е-элемента на эффективность транспозиции mini-Mu единицы с интегративной плазмиды в хромосому *C. glutamicum* ATCC 13869

Как известно, в клетках *E. coli* оба пути транспозиции фага Mu катализирует высокоупорядоченный ДНК-белковый комплекс, называемый транспозосомой, организованный взаимодействием трех участков ДНК: L/R концами фага Mu и E-

элементом, при этом присутствие Е элемента в природной ориентации на mini-Mu единице важно для правильной сборки транспозосомы [Lavoie and Chaconas, 1995; Watson and Chaconas, 1996]. Кроме этих участков генома бактериофага Mu, шесть субъединиц Mu транспозазы, а также ДНК-изгибающие белки-помощники клетки хозяина HU и сайт-специфический «integration host factor» IHF участвуют в формировании LER синапсиса [Harshey, 2014]. Когда уровень суперспирализации (σ) донорной ДНК становится низким [Surette and Chaconas, 1989], т. е. сравнимым со связанной с белками молекулой ДНК *in vivo* [Dillon and Dorman, 2010], хозяйский белок IHF облегчает перенос mini-Mu(LER) единицы, осуществляя изгиб ДНК на Еэлементе, расположенном в *cis* ориентации по отношению к L/R концам, тем самым способствуя взаимодействию специфичного участка N-терминального домена MuA субъединицы с энхансером.

По нашим сведениям функционально активные ДНК-связывающие аналоги *E. coli* белков IHF и HU не были достоверно идентифицированы среди коринебактериальных белков; однако, ген, кодирующий предполагаемый хозяйский белок cIHF (GenBank accession number: CG1811 (CorglutaCyc)), был аннотирован в геноме *C. glutamicum* ATCC 13032 [*Kalinowski et al.*, 2003].

Поэтому для выяснения способности *C. glutamicum* белков выполнять функции своих аналогов из клеток *E. coli* интересно было исследовать зависимость эффективности транспозиции Mu бактериофага в хромосому *C.glutamicum* от конформационного состояния донорной плазмидной ДНК в отсутствии или при наличии E- элемента в разной ориентации в составе mini-Mu модуля. Для этого были сконструированы три интегративные плазмиды, содержащие mini-Mu(LER)-YK, mini-Mu(LER)-YK, и mini-Mu(LR)-YK кассеты («Материалы и методы»). В этих экспериментах использовали две формы каждой сконструированной интегративной плазмиды: сверхспирализованную и релаксированную ковалентно-замкнутую («Материалы и методы»).

Как видно из результатов, представленных в Таблице 3, в случае переноса с релаксированных форм интегративных плазмид наблюдалась зависимость эффективности процесса от присутствия энхансера в составе mini-Mu и его ориентации. Так плазмида с mini-Mu(LER) единицей явилась лучшим донором транспозиции среди других плазмид той же конформации. Интеграция же mini-Mu(LR) единицы в хромосому *C. glutamicum* в случае попадания плазмиды в клетку в релаксированном состоянии продемонстрировала самую низкую эффективность по сравнению с другими плазмидами одной топологии. Количество интегрантов, содержащих в хромосоме mini-Mu(LER) единицу, отобранных при использовании релаксированной формы интегративной плазмиды, составило промежуточное значение. Так было отмечено снижение эффективности интеграции mini-Mu(LER) единицы в три раза по сравнению с mini-Mu(LER) единицей, при этом эффективность транспозиции повысилась примерно в 10 раз по отношению к несодержащей энхансер mini-Mu(LR) единицы.

Однако электротрансформация релаксированных форм всех плазмид в клетку *C. glutamicum* снизила эффективность транспозиции более чем на два порядка по сравнению с Mu-зависимой интеграцией соответствующих mini-Mu в хромосому бактерии в случае использования аналогичных плазмид, введенных в клетку в сверхспирализованной форме. Возможно, это связано с низкой концентрацией белковпомощников клетки-хозяина, способных выполнять функцию колийных ДНК изгибающих белков - HU и IHF, ответственных за сверхспирализацию донорной ДНК и, следовательно, за стимулирование формирования транспозосомы в клетках *C. glutamicum*.

В эксперименте Ми-зависимого переноса с интегративных плазмид, находящихся в суперскрученной форме, была выявлена разница в 20 раз в эффективности транспозиции. При этом самая высокая частота отбора интегрантов отмечалась в случае использования mini-Mu(LER) содержащей интегративной плазмиды, на которой Е элемент присутствовал в нативной *cis* ориентации, а самая низкая эффективность была зафиксирована для плазмиды с mini-Mu(LR) единицей (Таблица 3). Количество интегрантов, содержащих в хромосоме mini-Mu(LER) единицу, отобранных при использовании сверхспирализованных форм плазмид, составило промежуточное значение. Так mini-Mu(LER) единица транспозируется в хромосому с эффективностью ближе к подобной ей mini-Mu(LR), чем к mini-Mu(LER) единице, поскольку эффективность ее транспозиции в 10 раз ниже mini-Mu(LER) единицы и только в два раза выше mini-Mu(LR) (Таблица 3).

Тип интегративной плазмиды	Эффективность интеграции, отнесенная к 100 нг ДНК		
	SH плазмида	Релаксирванная	
		плазмида	
pAH-mini-Mu(LR)-YK	(0.8 ± 0.2) ×10 ⁻⁵	$(2.9\pm0.6)\times10^{-8}$	
pAH-mini-Mu(LÈR)-YK	$(1.5\pm0.5)\times10^{-5}$	$(3\pm1)\times10^{-7}$	
pAH-mini-Mu(LER)-YK	$(1.6\pm0.4)\times10^{-4}$	$(9\pm3))\times10^{-7}$	

Таблица 3- Влияние суперскрученной формы плазмиды (SH) и расположения Е -элемента на эффективность транспозиции

Из результатов эксперимента можно предположить, что для сравнительно небольших интегративных плазмид, благодаря близкому пространственному расположению концов Mu-L/R в структуре суперскрученной ДНК, процесс образования минимальной транспозосомы протекал достаточно эффективно даже в отсутствии Еэлемента. Тем не менее, энхансер в обратной ориентации в соответствующей плазмиде, LER, имел недостаточную структурную свободу, чтобы значительно повысить эффективность сборки полноразмерной транспозосомы.

Амплификация mini-Mu(LER)-YK единицы в хромосоме *C. glutamicum* ATCC 13869, оптимизация процесса Исследование природы происхождения клона №10

Данные, представленные на Рисунке 17В, раскрывают происхождение клона \mathbb{N} 10, имеющего стабильно Sm^{HR} и Tc^S фенотипы. Хромосома клона \mathbb{N} 10 содержала две копии Km^R гена. Встраивание двух копий mini-Mu единиц в геном *C.glutamicum* может быть результатом: или а) двух независимых инсерций mini-Mu(LER)-YK по механизму репаративной транспозиции с двух интегративных плазмид, трансформированных в одну клетку реципиента, или б) разрешения двух коинтегратов, последовательно интегрированных в хромосому бактерии в результате репликативной транспозиции mini-Mu единиц с двух интегративных плазмид, или, вероятнее всего, в) амплификации первоначально интегрированной в хромосому Mu(LER)-YK кассеты в процессе внутрихромосомальной репликативной транспозиции во время роста бактериальных клеток в условиях индукции факторов транспозиции MuAB. В случае

внутрихромосомальной амплификации mini-Mu механизм встраивания в хромосому первой копии mini-Mu (либо через репаративный путь транспозиции, либо через репликативный с последующим разрешением коинтеграта) не является существенным.

Известно, что каждое событие внутримолекулярной репликативной транспозиции фага Mu [*Watson et al.*, 2004] приводит либо к амплификации mini-Mu единицы и сопровождается инверсиями хромосомных участков, заключенных между двумя инвертированными копиями mini-Mu транспозона, либо к делециям фрагментов ДНК хромосомы, приводящим к образованию двух кольцевых продуктов, каждый из



homologous recombination product

которых содержит только одну копию mini-Mu, при этом один из них способен к автономной репликации, в то время как другой нет. Следует отметить, что в случае присутствия существенных для клетки генов на неспособном поддерживаться в клетке кольцевом фрагменте бактериальной ДНК, выжившие клоны будут содержать кольцевую ДНК, образовавшуюся

Рисунок 19- Во время литической фазы развития Ми бактериофага транспозиция идет внутримолекулярно, в пределах одного репликона. Каталитически активные субъединицы МиА транспозосомы осуществляют одноцепочечные разрывы с 3' концов Ми транспозона, и при участии белкапомощника МиВ переносят высвободившиеся 3' концы ДНК в целевой сайт, находящийся на той же молекуле. При этом в сайте-мишени свободные 3'-ОН группы

осуществляют ступенчатый (в 5 пар нуклеотидов) разрыв фосфодиэфирных связей комплементарных цепей ДНК. В результате образуется промежуточный продукт, так называемый "Shapiro intermediate", разрешение которого осуществляется посредством репликации. При этом вновь образовавшиеся свободные 3'-ОН концы ДНК промежуточного продукта выступают в качестве праймеров при репликации Ми. В зависимости от выбора цепи встраивания - та же (А) или ей комплементарная (В) разрешение приводит к делециям или инверсиям хромосомных участков генома хозяина в результате слияния по mini-Mu единицам в процессе общей рекомбинации двух продуктов транспозиции. При этом бактериальная хромосома таких клонов будет иметь две копии mini-Mu элемента, расположенных в одной ориентации (Рисунок 19).

Таким образом, происхождение клона № 10, содержащего две mini-Mu копии в хромосоме, может быть установлено определением точек интеграции mini-Mu в геноме бактерии. Появление прямых повторов mini-Mu транспозона в хромосоме может возникнуть в результате двух независимых актов интеграции или при репликативной амплификации интегрированной на первой стадии mini-Mu единицы с последующим слиянием двух продуктов транспозиции в ходе общей рекомбинации между участками mini-Mu ДНК. Встраивание двух инвертированных повторов mini-Muединиц в случайные позиции на хромосоме может быть также следствием двух независимых актов интеграции mini-Mu–единиц или результатом внутрихромосомальной амплификации. Однако инверсия участка хромосомы *C. glutamicum*, заключенного между двумя противоположно направленными повторами mini-Mu единиц, однозначно будет указывать на внутрихромосомальную транспозицию.

Поэтому для клона №10 было выполнено молекулярное клонирование фрагмента ДНК хромосомы, содержащего mini-Mu единицу («Материалы и методы»). Все плазмидные ДНК, выделенные из трех независимо полученных $Km^R \ E. \ coli$ трансформантов, содержали только одну из двух копий mini-Mu единицы в составе 11,2 т.п.н. ДНК фрагмента хромосомы *C. glutamicum*, обработанной *Stul* эндонуклеазой. Анализ последовательности установил, что граничащая с клонированной mini-Mu единицей последовательность ДНК хромосомы хозяина соответствует инвертированной структуре генома *C. glutamicum*. Дополнительное подтверждение предполагаемого расположения обеих mini-Mu единиц было получено с помощью ранее разработанной стратегии [*Зименков и др.*, 2004], основанной на обратной ПЦР с праймерами, комплементарными внутренней части mini-Mu, а именно Mu-R (или Mu-L) концам, и ориентированными наружу (данные не представлены).

Кроме того, координаты ДНК хозяина, относящиеся к инсерциям двух mini-Mu единиц, были идентифицированы и соответствовали 484.726 н.п. и 2.370.010 н.п. последовательности генома *C. glutamicum* ATCC 13869 (GenBank AN AP017557.2). На в основании полученных результатов было сделано заключение, что обнаруженная структура клонированного *StuI* -фрагмента (Рисунок 20) могла быть получена только в результате внутримолекулярной репликативной транспозиции первоначально интегрированного mini-Mu транспозона, поскольку сопровождалась перестройкой генома.

2.2 Влияние уровня экспрессии факторов транспозиции на эффективность внутримолекулярного переноса mini-Mu единицы в хромосоме *C. glutamicum* ATCC 13869

Как было показано в настоящей работе, транспозиция mini-Mu единицы в геном *C. glutamicum* ATCC 13869 с интегративной плазмиды, использованной в данной системе, происходит преимущественно по репликативному механизму.



Рисунок 20- Схема интеграции двух mini-Mu(LER)-YK единиц в хромосому клона №10 вследствие Ми-зависимой внутрихромосомальной репликативной транспозиции первоначально интегрированной одной mini-Mu(LER)-YK единицы

Кроме того, было установлено, что появление второй копии в хромосоме клона №10 также стало результатом репликативной транспозиции. Поскольку принципиальная возможность внутрихромосомальной амплификации mini-Mu путем репликативной транспозиции была продемонстрирована, мы попытались оптимизировать адаптированную двухкомпонентную систему для осуществления целенаправленной амплификации с целью отбора заданного количества копий. Поэтому дальнейшим интересом в исследовании Mu-зависимой транспозиции в клетках *C. glutamicum* ATCC 13869 явилось оценка эффективности процесса внутримолекулярного репликативного переноса первоначально интегрированных в хромосоме mini-Mu конструкций, и, в частности, зависимость ее от уровня экспрессии факторов транспозиции MuAB.

Для сравнительного анализа процесс внутрихромосомальной амплификации осуществлялся с использованием двух вариантов хелперных плазмид, состав которых отличался только промоторным участком, контролирующим экспрессию генов факторов транспозиции MuAB pVK-Gm^R-(P_{dap} -MuAB) и pVK9-Gm^R-($lacI^{Q}$ - P_{tac} -MuAB) («Материалы и методы»).

Для проведения внутримолекулярной амплификации в штамм *C. glutamicum* ATCC 13869, содержащий одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы в хромосоме, была введена хелперная плазмида с помощью электротрансформации. Затем полученные трансформанты культивировали в течение ночи при 37° C в жидкой BHI среде, содержащей Gm (маркер хелперной плазмиды) и IPTG (для индукции экспрессии генов факторов транспозиции MuAB в случае pVK9-Gm^R-(*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB)), и высевали на селективные среды для отбора Sm^{HR} вариантов. На завершающей стадии несколько отобранных случайным образом Sm^{HR} клонов излечивали от хелперной плазмиды и тестировали в них относительные уровни флуоресценции желтого белка vECitrine («Материалы и методы»).

В случае использования хелпера pVK-Gm^R-(P_{dap} -MuAB) частота возникновения Sm^{HR} клонов составила $\approx 10^{-4}$ от числа всех высеянных на чашку Sm^Rклеток, при этом только в восьми из ста произвольно отобранных Sm^{HR} вариантах уровень относительной флуоресценции yECitrine превышал контрольный, содержащий одну копию транспозона в геноме, в 2 раза (Рисунок 21А). Из чего следует, что истинная эффективность амплификации в этом случае оказалась на порядок ниже и составила ~10⁻⁵. Гибридизация по Саузерну подвердила появление всего лишь одной дополнительной копии в геноме клонов, для которых фиксировался повышенный уровень относительной флуоресценции (Рисунок 21В).



Рисунок 21 - уЕСіtrine удельная флуоресценция (А) и результаты гибридизации по Саузерну (В), выполненные для Sm^{HR} клонов, полученных после амплификации mini-Mu(LER)-YK единиц с помощью хелперной плазмиды pVK-Pdap-MuAB (2-11) и родительского Sm^R клона, содержащего одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы (1). Для гибридизации по Саузерну геномная ДНК отдельных клонов была выделена и обработана SmaI эндонуклеазой (имеет только один сайт узнавания, находящийся внутри mini-Mu, но не затрагивающий ген kan) и гибридизована с амплифицированным с помощью ПЦР фрагментом ДНК, содержащим ген kan

Частота возникновения Sm^{HR} клонов в случае использования хелпера pVK9-Gm^R-(*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB) составила $\approx 5.0\pm 2,0\times 10^{-3}$ от числа всех высеянных на чашку клеток, то есть несколько сотен Sm^{HR} колоний на $\sim 10^5$ Sm^R и Gm^R клонов отбирали в одном эксперименте. Данные по флуоресценции и результаты гибридизации по Cayзерну соответствующей хромосомной ДНК со структурной частью гена Km^R, входящего в состав mini-Mu(LER)-YK единицы, представлены на Рисунке 22A и B, соответственно. Результаты эксперимента подтвердили, что все протестированные Sm^{HR} клоны были получены по механизму фага Mu внутримолекулярной репликативной транспозиции изначально интегрированной в хромосому бактерии mini-Mu кассеты и в итоге содержали две или три копии в хромосоме.

Таким образом, использование хелпера рVК9-Gm^R-(*lac1*^Q-P_{*tac*}-MuAB) привело к значительному повышению не только эффективности внутрихромосомальной амплификации, но и множественности транспозиции по сравнению с аналогичной хелперной плазмидой со сниженным уровнем экспрессии генов MuAB вследствие их транскрипции с более слабого промотора. Поэтому можно предположить, что множественность внутрихромосомальной транспозиции можно будет контролировать уровнем экспрессии генов MuAB.



Рисунок 22 - уЕСіtrіne удельная флуоресценция (А) и результаты гибридизации по Саузерну (В) выполненные для Sm^{HR} клонов, полученных после амплификации mini-Mu(LER)-YK единиц с помощью хелперной плазмиды pVK-Gm^R-(*lac1*^Q-P_{tac} –MuAB) (1-10) и родительских Sm^R клонов, содержащих одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы (11). Для гибридизации по Саузерну геномная ДНК отдельных клонов была выделена и обработана *SmaI* эндонуклеазой (имеет только один сайт узнавания, находящийся внутри mini-Mu, но не затрагивающий ген *kan*) и гибридизованас амплифицированным с помощью ПЦР фрагментом ДНК, содержащим ген *kan*

Надо отметить, что выявленная эффективность внутрихромосомальной амплификации ($5,0\pm2,0\times10^{-3}$) оказалась на два порядка ниже эффективности образования коинтегратов, полученных путем Ми-зависимой репликативной транспозиции mini-Mu единицы с уже содержащейся в клетке сверхспирализованной интегративной плазмиды в присутствии хелперной плазмиды pVK9-Gm^R-(*lacI*^Q-P_{tac}-MuAB), так как, эффективность транспозиции с уже находящейся в клетках интегративной плазмиды составляет $\approx 10^{-1}$ («Раздел 1.2»).

2.3 Внутримолекулярная Ми-зависимая амплификация mini-Mu единиц различного состава в хромосоме *C. glutamicum* ATCC 13869

Было любопытно оценить эффективность процесса Ми-зависимой множественной транспозиции в геноме *C.glutamicum* в зависимости от присутствия Еэлемента в разной ориентации в составе mini-Mu модуля или в его отсутствии. Для этого на первом этапе с помощью разработанной двухкомпонентной системы транспозиции с использованием всех трех конструкций интегративных плазмид, находящихся в сверхспирализованных формах, были получены коинтеграты, а затем их «разрешенные» производные – интегранты, содержащие по одной копии mini-Mu единиц в хромосоме: mini-Mu(LER), или mini-Mu(LER), или mini-Mu(LR). По одному выбранному из каждого варианта клону, еще не потерявшему плазмидупомощник pVK-*lac1*^Q-P_{tac}-MuAB, растили в жидкой среде в условиях индукции экспрессии генов MuAB, а далее проводили селекцию амплификантов на высокой концентрации стрептомицина Sm («Материалы и методы»).

В результате оказалось, что в присутствии в геноме mini-Mu(LER) кассеты эффективность амплификации составила $3\pm1\times10^{-3}$ / клеток ($\approx 200-400 \text{ Sm}^{HR}$ клонов получали на 10^5 Sm^R высеянных на чашку клеток), что в целом совпадало с предыдущими результатами. Приблизительно в пять раз меньше Sm^{HR} клонов было получено для штамма, содержащего mini-Mu((LER) единицу в хромосоме, и только несколько Sm^{HR} клонов было отобрано в случае mini-Mu(LR) варианта (Таблица 4).

Таблица 4 - Количество Sm^{HR} клонов, отобранных на высокой концентрации стрептомицина (0,75; 1,0 мг/мл) в результате внутримолекулярной транспозиции mini-Mu единицы в хромосоме штамма *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 в зависимости от присутствия и ориентации энхансерного элемента (E)

Sm мг/мл	Всего по- сеянных Sm ^R клеток	mini-Mu(LR)-YK		mini-Mu(LER)-YK		mini-Mu(LER)-YK	
		конт-	амплифи-	конт-	амплифи-	конт-	амплифи-
		роль	кация	роль	кация	роль	кация
0.75	10^{5}	-	13±7	7±5	74±19	8±5	415±57
1.0	10^{5}	-	-	2±1	46±2	3±2	241±17

Результаты гибридизации по Саузерну подтвердили наличие от двух до трех копий гена Km^Rв хромосоме всех Sm^{HR} клонов, производных mini-Mu(LER)-YK содержащего штамма, и в некоторых Sm^{HR} клонах, полученных в результате внутрихромосомальной транспозиции mini-Mu(LER)-YK единицы. Но лишь одна исходная копия, детектируемая с помощью «меченого» зонда на структурную часть гена Km^R, сохранялась в проверенных Sm^{HR} клонах, имеющих mini-Mu(LR)-YK единицу в хромосоме (Рисунок 23).



Рисунок 23- Результаты гибридизации по Саузерну родительского штамма (1) и клонов, содержащих в хромосоме по одной копии mini-Mu(LER)-YK единицы (2), mini-Mu(LER)-YK единицы (10), и mini-Mu(LR)-YK единицы (19), а также их производных, отобранных после амплификации при росте в условиях индукции экспрессии MuAB (3–9), (11–18) и (20–22), соответственно. Для гибридизации по Саузерну геномная ДНК отдельных клонов была выделена и обработана *SmaI* эндонуклеазой (имеет только один сайт узнавания, находящийся внутри mini-Mu, но не затрагивающий ген *kan*) и гибридизована с амплифицированным с помощью ПЦР фрагментом ДНК, содержащим ген *kan*

Таким образом, можно было заключить, что обратная ориентация энхансера, E, снизила частоту амплификации соответствующей mini-Mu единицы до значений, по крайней мере, в два раза ниже уровня $6,0\pm1,5\times10^{-4}$ /клетку. Отсутствие же E-элемента в структуре mini-Mu(LR) уменьшило частоту Mu-зависимой внутримолекулярной репликативной транспозиции до уровня ниже 10^{-5} , поскольку в экспериментах с этим типом кассеты амплификация вообще не была выявлена.

Исходя из результатов, полученных в настоящем исследовании, можно предположить, что процесс транспозиции mini-Mu(LER) элемента с интегративной плазмиды, находящейся в релаксированной форме, близок к экспериментальной модели внутрихромосомальной репликативной амплификации mini-Mu(LER), когда связанные с ДНК белки поддерживают хромосому в состоянии сверхспирализации, но со значительно сниженной плотностью сверхвитков [*Dillon and Dorman*, 2010].

Действительно, выявленная эффективность электропорации (проникновения в штамм *C. glutamicum* АТСС 13869 суперскрученной плазмидной ДНК) была ≈1×10⁻³ / 100 нг ДНК / количество выживших клеток. В то же время эффективность транспо-

зиции (проникновение в клетку и образование коинтегратов) с находящейся в релаксированной форме интегративной плазмиды с mini-Mu(LER) единицей в тот же штамм, была снижена до $\approx 10^{-6}/100$ нг ДНК/количество выживших клеток. Таким образом, эффективность внутриклеточного образования коинтегратов между «релаксированной» интегративной плазмидой и хромосомой *C. glutamicum* составила приблизительно 1×10^{-3} /клетку. Эта оценка очень близка к экспериментально обнаруженной эффективности внутрихромосомальной амплификации mini-Mu(LER) единицы, которая составила $\approx 3\pm1,5\times10^{-3}$ /клетку.

Эффективность транспозиции mini-Mu(LER) единицы с интегративной плазмиды в релаксированной форме снизилась в три раза по сравнению с mini-Mu(LER), что хорошо согласуется с обнаруженной разницей в уровнях внутримолекулярной амплификации mini-Mu(LER) и mini-Mu(LER) единиц, и является дополнительным подтверждением найденного соответствия между этими процессами.

Результаты, полученные для mini-Mu(LR) единицы, были довольно неожиданными. Хотя формирование коинтегратов между «релаксированными» формами интегративных плазмид с mini-Mu(LR) или mini-Mu(LER) единицамии и *C. glutamicum* хромосомой происходит в отношении 1 : 30, однако истинная разница в частотах внутримолекулярной транспозиции этих mini-Mu единиц была значительно выше, поскольку амплификация не была обнаружена для mini-Mu(LR) единицы в условиях проводимого эксперимента. Возможно, сближение концов ДНК фага Mu без участия Е-элемента в процессе образования транспозосомной структуры представляет значительно меньше трудностей для «релаксированного» плазмидного субстрата, но является серьезной проблемой, когда в качестве субстрата выступает лишь частично релаксированная, но все же сверхспирализованная бактериальная хромосома.

Отметим, что наличие в центре генома профага Ми сайта связывания с гиразой (SGS) необходимо для эффективного синапсиса и формирования транспозосомы, являющихся обязательным условием инициации репликации ДНК профага, даже если он содержит нативный Е элемент. Действительно, связывание гиразы в SGS сайте стимулирует быстрый, эффективный синапс L/R концов ДНК профага Mu, несмотря на напряжения, вызванные структурой бактериального нуклеоида, делая это путем

формирования суперскрученной петли, в основании которой концы профага оказываются сближены [*Pato*, 2004; *Pato and Banerjee*, 2000].

Наблюдаемое резкое уменьшение эффективности внутримолекулярного переноса mini-Mu(LR) единиц по сравнению с mini-Mu(LER) единицами, расположенными в напряженной связыванием с белками *C. glutamicum* хромосоме, позволяет применить новую стратегию геномной модификации, осуществляемую через последовательные процессы интеграции, амплификации и фиксации различных генов в хромосоме бактерии.

3. Стратегия интеграция/амплификация/фиксация различных mini-Mu(LER) единиц в хромосоме *C. glutamicum* ATCC 13869

Поскольку в отсутствии Е-элемента в составе mini-Mu единицы процесс репликативной транспозиции идет с очень низкой эффективностью в клетках C. *glutamicum*, то можно было предполагать, что удаление Е- элемента из состава всех интегрированных в геном C. *glutamicum* mini-Mu(LER) единиц приведет к значительному снижению внутримолекулярного переноса mini-Mu(LR) в присутствии не содержащей энхансер хелперной плазмиды, что позволит провести интеграцию и последующую независимую амплификацию другой mini-Mu(LER) единицы в геноме C. *glutamicum* без изменения количества и локализации первоначально интегрированных, но уже не содержащих Е-элемент mini-Mu(LR) [*Akhverdyan et al.*, 2011]. Эти результаты легли в основу вновь разработанной стратегии интеграции/амплификации/ фиксации, позволяющей осуществить последовательное встраивание в хромосому бактерии C. *glutamicum* необходимое количество копий различных целевых генов (Рисунок 24).

Интегрант штамма *C. glutamicum* АТСС 13869 (обозначенный 1ҮК), содержащий одну копию mini-Mu(LER)-YK, и два его производных, полученных Muзависимой амплификацией этой кассеты, и содержащих две и три копии в хромосоме (обозначенные 2YK и 3YK, соответственно), были излечены от хелперной плазмиды pVK-*lacI*^Q-P_{tac}-MuAB. На заключительной стадии эксперимента внутренняя часть



Рисунок 24- Использование стратегии интеграции/амплификации/фиксации; интеграция и амплификация mini-Mu(L[exE]R)единицы идет путем репликативной транспозиции в условиях экспрессии E⁻ хелперной плазмиды. Затем E элемент вырезается с помощью Cre - зависимой сайт-специфической рекомбиниции. Амплификация усеченной mini-Mu(LR) единицы в присутствии E⁻ хелперной плазмиды идет с очень низкой частотой, то есть позиции на хромосоме mini-Mu(LR) единиц можно считать фиксированными

тіпі-Ми транспозона, расположенная между сайтами lox66/lox71 и включающая как Е-элемент, так и маркеры Km^R и Sm^R (Рисунок 24), была вырезана с помощью Cre рекомбиназы («Материалы и методы») с последующим удалением хелперной плазмиды p06-P_{dapA}-cre. В итоге полученные штаммы приобрели Km^SSm^S фенотипы, подтверждающие отсутствие внутренней, фланкированной lox66/lox71 последовательностями части mini-Mu кассеты. Флуоресценция, обусловленная экспрессией белка уЕСitrine, была количественно оценена для трех содержащих mini-Mu(LER)-YK родительских интегрантов, 1YK, 2YK и 3YK, и их Km^SSm^S производных, содержащих уже «укороченные» транспозоны вида mini-Mu(LR)-Y в хромосоме (обозначенных 1Y, 2Y и 3Y, соответственно).

Данные флуоресценции и последующие результаты гибридизации по Саузерну, полученные с использованием «метки» на структурную часть гена *yECitrine*, под-

101

твердили сохранение ожидаемого количества «укороченных» копий mini-Mu(LR)подобных единиц после обработки хромосомы всех полученных штаммов Cre рекомбиназой (данные не показаны).

Полученные три штамма (iY, где i = 1, 2, 3, обозначает количество mini-Mu(LR)-Y единиц в хромосоме) были использованы для новой Mu-зависимой интеграции с последующей амплификацией mini-Mu-(LER)-GK единицы, которая отличалась от ранее используемой mini-Mu-(LER)-YK тем, что содержала ген *yEGFP* вместо гена *yECitrine* («Материалы и методы»). Все процессы Mu-зависимой репликативной транспозиции выполняли согласно выше разработанным и описанным протоколам («Материалы и методы»). На обоих этапах транспозиции после интеграции и амплификации в полученных штаммах была промерена относительная флуоресценция, обусловленная экспрессией белков yECitrine и yEGFP, а также проведена гибридизация по Саузерну с пробами на структурные части генов *yECitrine* и *yEGFP*, выбранными в качестве маркеров (Рисунок 25).

Все представленные данные подтверждают, что интеграция и последующая амплификация, приводящая максимально к трем копиям mini-Mu(LER)-GK единицы в хромосоме выбранного штамма - реципиента была успешно реализована, и двойные *C. glutamicum* интегранты, iY-jGK (где i, j=1, 2, 3 обозначают количество копий генов *yECitrine* и *yEGFP* в хромосоме, соответственно) были получены. Более того, позиции на хромосоме mini-Mu(LR)-Y кассет в ходе Ми-зависимой внутрихромосомальной амплификации mini-Mu(LER)-GK единиц были сохранены (зафиксированы).

4. Универсальность метода Ми-зависимой транспозиция для *C. glutamicum*. Новый интегративный вектор

В работе также была продемонстрирована репликативная транспозиция, обусловленная механизмом фага Mu, проходящая с образованием структуры коинтеграта и последующим его разрешением, с помощью той же двухплазмидной системы в хромосому широко исследуемого в лабораторных условиях штамма дикого типа *C*. *glutamicum* ATCC 13032 и его не содержащего профагов производного MB001, активно используемых для биотехнологических целей [*Baumgart et al.*, 2013]. Частоты электротрансформации реплицирующейся в клетках плазмиды и эффективности образования первичных интегрантов через механизм транспозиции фага Mu для этих



Рисунок 25- уЕСіtrіпе и уЕGFP удельная флуоресценция (А) и результаты гибридизации по Саузерну, используя *уЕСіtrіпе* (В) или *уЕGFP* (С) в качестве проб, (1) родительский штамм, содержащий одну копию mini-Mu(LR)-Y единицы, 1Y; (2) производный от клона 1Y, содержащий еще одну копию mini-Mu(LER)-GK единицы и (3–9) его производные после амплификации mini-Mu(LER)-GK единиц; (10) родительский штамм, содержащий две копии mini-Mu(LR)-Yединиц, 2Y; (11) производный клона 2Y, содержащий еще одну копию mini-Mu(LER)-GK единицы и (12–21) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы; (22 нет результатов гибридизации по Саузерну - родительский штамм, содержащий еще одну копию mini-Mu(LER)-GK единицы; (30) производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-GK единиц сохраняются при внутримолекулярной амплификации mini-Mu(LER)-GK единиц

C. glutamicum штаммов представлены в Таблице 5. Сравнительный анализ частот электропорации реплицирующейся в клетке плазмиды и эффективности транспозиции выявил, что аналогично исследованному в данной работе штамму *C. glutamicum* АТСС 13869 эффективность переноса с уже находящейся в клетках интегративной плазмиды в хромосому штаммов *C. glutamicum* АТСС 13032, MB001 в эксперименте Mu-зависимой транспозиции составляет $\approx 10^{-1}$.

	Частота электротрансфор-	Эффективность интеграции,
	мации, отнесенная к 100 нг	отнесенная к 100 нг ДНК
	ДНК	
ATCC13032	$1,5*10^{-6}$	~0,8*10 ⁻⁷
MB001	$1,2*10^{-5}$	~2*10 ⁻⁶
ATCC13869	1,1*10 ⁻³	1,4*10 ⁻⁴

Таблица 5 – Частота электротрансформации способной к автономной репликации плазмиды и эффективность Ми-зависимой транспозиции плазмиды pAH-mini(LER) в клетках *C.glutamicum* штаммов

В заключение хотелось бы добавить, что для широкого использования системы Ми-зависимой транспозиции в качестве полезного инструмента для редактирования C. glutamicum хромосомы была сконструирована более удобная плазмида pAH-mini-Mu(LER)-YS, содержащая полилинкер (MCS) для клонирования целевых генов (Рисунок 26). Маркер Km^R, расположенный на не содержащей ДНК фага Ми части плазмиды, может быть использован для отбора коинтегратов, при этом экспрессия гена sacB из Bacillus subtilis, необходимая в качестве маркера контрселекции, облегчает отбор С. glutamicum резолвантов на среде, содержащей сахарозу. Так 15-30% «резолвантов» в сравнении с 1-3% в случае использования плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-YK было отобрано на среде, содержащей 20% сахарозы [Gorshkova et al., 2017]. Маркер Sm^R, входящий в состав mini-Mu единицы на новой плазмиде, может быть использован как для прямого отбора интегрантов, так и для последующей селекции внутрихромосомальной амплификации уже интегрированной в хромосому mini-Mu(LER) единицы. Кроме того, наличие гена yECitrine помогает осуществить количественную оценку полученного числа копий mini-Mu в отобранных Sm^{HR} клонах методом флуоресценции. Все ДНК-элементы, способствующие проведению и отбору транспозиции (E, Sm^R и *yECitrine*), фланкированы *lox*66/71-сайтами, и могут быть удалены из встроенной в хромосому mini-Mu кассеты с помощью Сге рекомбиназы фага P1 с сохранением только небольшой, не содержащей маркера, части интегративной плазмиды с целевым геном в хромосоме. Таким образом, эта плазмида вполне может быть использована в качестве интегративного вектора для клонирования целевых генов и последующей Mu-зависимой транспозиции их в хромосомы различных организмов.



Рисунок 26 - Схема новой интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-YS (GenBank AN. MG014200)

5. Метилотрофы – перспективный объект биотехнологии

Метилотрофы представляют собой неоднородную группу организмов, которые обладают большим количеством специализированных ферментов, позволяющих расти на восстановленных углеродных субстратах, не имеющих С-С связи, и использовать их в качестве источника энергии и углерода. Поскольку существует огромное разнообразие метилотрофных микроорганизмов, отличающихся своим метаболизмом, а метанол из С1-соединений является наиболее перспективным сырьем для биотехнологических производств благодаря своей доступности, и может быть получен с помощью нефтехимии или через возобновляемые ресурсы, такие как биогаз, все это позволяет вести разработку производства ценных веществ на основе метилотрофных бактерий с использованием метанола в качестве субстрата.

Первый объект нашего исследования - облигатная бактерия *Methylophilus methylotrophus* AS1 использует наиболее выгодный с точки зрения расхода энергии РМФ (рибулозо-монофосфатный) цикл ассимиляции формальдегида и поэтому отличается высокой скоростью роста и выходом биомассы, что позволило в 1970-ые годы на ее базе создать крупномасштабные производства для получения одноклеточного белка (SCP) для питания людей и животных [*Senior and Windas*, 1980].

Второй объект работы - факультативный метилотроф, α-протеобактерия Methylobacterium extorquens AM1 использует сериновый цикл ассимиляции формальдегида. Из-за способности расти на широком спектре неметилотрофных С1 субстратах и легкого способа, с помощью коньюгации или электропорации, передачи ДНК в клетку, M.extorquensAM1 на протяжении более 50 лет использовался в качестве модельного для исследования С1 метаболизма и в настоящее время является хорошо изученным микроорганизмом. Значительный прогресс был достигнут в понимании биохимии, физиологии и генетики этой бактерии в связи с доступностью полного сиквенса ее генома [Chistoserdova et al., 2003], что позволило детально исследовать основные метаболические пути и обнаружить ряд новых ферментов и их функции [Chubiz et al., 2013]. Применение недавно дополнительных "omics" технологий, таких как транскриптомика, протеомика, метаболомика и флуксомика помогли описать метилотрофию на системном уровне. Все эти подходы вместе с построением полной модели метаболизма *M. extorquens* AM1 облегчили изучение и разработку рациональных стратегий, направленных на использование его в качестве перспективного объекта биотехнологии. В настоящее время микроорганизмы рода М. extorquens используются для производства различных химических веществ из метанола, таких как полигидроксибутират, аминокислота серин, редкие дикарбоновые кислоты, а также белки и спирты из этиламина. На сегодняшний день показана возможность использования *M. extorquens* в качестве реципиента для эффективного накопления, по крайней мере некоторых рекомбинантных белков, таких как GFP [Figueira et al., 2003, Bélanger et al., 2004], инсектицидный белок Cry1Aa [Choi et al., 2006], галоалкан-дегалогеназа [FitzGerald and Lidstrom., 2003], и энтероцин П [Gutierrez et al., 2005].

Разработка нового генетического инструментария для метаболической инженерии метилотрофных бактерий остается актуальной и в настоящее время. На сегодняшний день сконструированы плазмидные векторы для клонирования и экспрессии генов под контролем конститутивных и регулируемых промоторов, разработаны системы для проведения немаркированных модификаций генома, инсерционноэкспрессионные векторные системы с использованием механизма гомологичной рекомбинации, а также методы транспозонного мутагенеза [*Marx and Lidstrom*, 2004; *Koch et al.*, 2001]. Конструированию бесплазмидных рекомбинантных штаммов отдается предпочтение при создании промышленных продуцентов биологически активных веществ.

5.1 Система интеграции/амплификации mini-Mu элементов в хромосому *Methylophilus methylotrophus* AS-1, разработанная ранее

Предпосылкой для адаптации системы транспозиции фага Ми для М. methylotrophus AS1 было предположение о достаточно частой встречаемости в клетках различных прокариот [Swinger and Rice, 2004] представителей семейства ДНКизгибающих белков (DNA bending proteins), гомологичных E.coli HU, IHF. В экспериментах, в которых автор диссертации принимала непосредственное и активное участие, была проведена необходимая модификация компонентов колийной системы Ми- зависимой транспозиции и достигнута интеграция целевых фрагментов ДНК в геном *M. methylotrophus* AS1 с последующим увеличением числа интегрированных копий в хромосоме с высокой эффективностью [Abalakina et al., 2008]. Модифицированная система также включала две плазмиды: первая, хелперная, имеющая репликон широкого круга хозяев, а также гены факторов транспозиции MuA и MuB; вторая, не способная к репликации интегративная, с mini-Mu транспозоном, содержащим между L- и R-концевыми участками ДНК фага Ми целевой ген. Для селекции интегрантов был использован ген устойчивости к канамицину (Km^R), а амплификантов - гены устойчивости к стрептомицину (*strA-strB*, или маркер Sm^R). Что касается энхансера Е, то были созданы различные генетические конструкции интегративной плазмиды, когда Е располагался между L- и R-концами в той же ориентации, как и в геноме фага Ми, в этом случае мы говорим, что в составе плазмиды был расположен элемент mini-Mu(LER)-типа, если Е отсутствовал, то интегративная плазмида содержала mini-Mu(LR) элемент (Рисунок 27). В работе также использовались различные хелперные плазмиды. Так на рТР310 экспрессия генов факторов интеграции, MuA и MuB, обеспечивалась с собственной регуляторной области генома фага Mu, а потому Е-элемент входил в состав этой «E-plus»-хелперной плазмиды [Akhverdyan et al., 2011]. В составе же другого хелпера, плазмиды p17TP310, экспрессия MuAB осуществлялась с конститутивного промотора P_{17Mme} , и поэтому Е-элемент отсутствовал в «E-minus» p17TP310 [*Abalakina et al.*, 2008].



Рисунок 27 - Схематическое изображение интегративных плазмид: pAH-mini-Mu(LR); pAH-mini-Mu(LER) (*Akhverdyan et al.*, 2011), производные pAH162 (*Haldimann and Wanner*, 2001), содержат *pir*+ зависимый репликон (*oriR*γ)

Было отмечено, что преимущественным механизмом транспозиции mini-Mu элемента из интегративной плазмиды в хромосому *M. methylotrophus* AS1 является репликативная транспозиция, приводящая к образованию коинтегратов между хромосомой и плазмидой с последующим их разрешением по механизму общей рекомбинации.

Было продемонстрировано, что в отличие от колийной системы Ми-зависимой транспозиции для обеспечения возможности высокоэффективной (с частотой 2х10⁻²) амплификации mini-Mu(LER) в бактериальной хромосоме в присутствии факторов транспозиции необходимо введение в состав интегрируемого mini-Mu транспозона энхансерного элемента (Е) [*Токмакова*, 2010].

5.2 Реализация стратегии интеграции/амплификации/фиксации различных mini-Mu(LER)единиц в геноме *M.methylotrophus* AS1

Разработанная для коринебактерий стратегия интеграции/амплификации/фиксации различных mini-Mu(LER) единиц, содержащих в своем составе вырезаемый энхансерный элемент, с использованием механизма транспозиции фага Mu базировалась на различиях в эффективностях внутрихромосомальной репликативной транспозиции mini-Mu(LER) и mini-Mu(LR) единиц, первоначально обнаруженных в грамотрицательных бактериях [*Akhverdyan et al.*, 2011]. Для демон-
страции универсального характера новой системы мы применили ту же стратегию и к ранее изученным грамотрицательным метилотрофным бактериям *Methylophilus methylotrophus* AS1 и *Methylobacterium extorquens* AM1.

Согласно ранее представленным результатам [*Токмакова*, 2010] все процессы проводили с использованием хелперной плазмиды p17TP310, сконструированной ранее на базе вектора pRK310IncPα-группы, не имеющей в своем составе энхансер [*Akhverdyan et al.*, 2011] (Рисунок 28), и описанной в данной работе интегративной-плазмиды pAH-mini-Mu(LER) (Рисунок 29).



Рисунок - 28 - Схематическое изображение хелперной плазмиды, производной плазмиды pRK310 IncPαгруппы (*Ditta et al.*, 1985), имеет репликон (*ori*V) p17TP310 (E-minus), экспрессия MuA MuB генов находится под конститутивным контролем промотора P_{17Mme} (*Abalakina et al.*, 2008)

В качестве дополнительного элемента разработанной системы для возможного вырезания фрагмента mini-Mu транспозона, фланкированного lox66/lox71 последовательностями, преобразуя, таким образом, *in vivo* интегрированные в хромосому *M. methylotrophus* AS1 mini-Mu(LER) единицы в mini-Mu(LR) единицы, была сконструирована плазмида pT-P_{lac}-cre на базе вектора широкого круга хозяев IncP α -группы несовместимости pRK310 [*Ditta et al.*, 1985], в составе которой экспрессия гена, кодирующего Cre-рекомбиназу фага P1, осуществлялась под контролем P_{lac} промотора («Материалы и методы»).



Рисунок 29 - Схематическое изображение новой интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(L[exE]R) (*Akhverdyan et al.*, 2011)

Интеграцию, а затем амплификацию mini-Mu(LER)-GK транспозона проводили в условиях индукции факторов транспозиции, согласно ранее разработанной методике [*Токмакова*, 2010]. Результаты подтверждали генетическими методами, измерением флуоресценции и Саузерн-гибридизацией. После вырезания из состава хромосомы отобранных на высокой концентрации стрептомицина (2 мг/мл) клонов, содержащих одну или две копии mini-Mu(LER)-GK единицы в геноме, фрагментов с маркерами устойчивости к антибиотикам и энхансерной областью с помощью сайтспецифической Сге рекомбиназы, экспрессирующейся с хелперной плазмиды $pT-P_{lac}$ *cre*, по той же схеме («Материалы и методы») была последовательно осуществлена интеграция и амплификация новой mini-Mu(LER)-YK единицы. Количество содержащихся в хромосоме копий генов *yEGFP* и *yECitrine* в случайно отобранных клонах предварительно оценивали, регистрируя уровни удельной флуоресценции (Рисунок 30А). Для подтверждения предварительных выводов была проведена ДНКгибридизация по Саузерну (Рисунок 30Б).

Было установлено, что в результате Ми-зависимой внутрихромосомальной транспозиции количество копий mini-Mu(LER)-YK кассеты увеличилось до 2-5 на геном бактерии, в то время как количество mini-Mu(LR)-G единиц не изменилось. Была отмечена корреляция между регистрируемым в клетках уровнем флуоресценции yEGFP, yECitrine и числом копий *yEGFP*, *yECitrine* генов в хромосоме.

Таким образом, возможности этого метода, объединяющего в себе две различные системы – mini-Mu транспозицию и *cre/lox* рекомбинацию, с помощью которых осуществляются последовательные селективные процессы Ми-зависимой интеграции-амплификации нескольких гетерологичных генов В хромосоме М. methylotrophusAS1 и удаление на промежуточной стадии, перед следующим раундом интеграции-амплификации, селективных маркеров и энхансерной последовательности из всех содержащихся в хромосоме копий mini-Mu с целью сохранения количества и локализации интегрированных на первом этапе копий целевого гена, продемонстрированы на примере модельных генов yEGFP и yECitrine, кодирующих, соответственно, зеленый и желтый флуоресцентные белки.

Было также показано, что, при необходимости, в качестве альтернативного маркера детерминантам устойчивости к антибиотикам для тестирования точного количества копий mini-Mu в хромосоме при его амплификации могут служить зеленый и желтый флуоресцентные белки.



Рисунок 30- Удельная флуоресценция уЕGFP и уЕСіtrine (A) и результаты гибридизации по Саузерну клонов *M. methylotrophus* AS1, содержащих в хромосоме копии mini-Mu(LR)-G и mini-Mu(LER)-YK транспозонов одновременно (геномную ДНК обрабатывали *Sph*I эндонуклеазой), используя *yEGFP* (Б-1) или *yECitrine* (Б-2) в качестве проб, (1) *M. methylotrophus* AS1 дикий штамм; (2) производный клона 1G, содержащий одну копию mini-Mu(LR)-G единицы и еще одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы и (3–8) его производные после амплификации mini-Mu(LER)-YK единицы (3–8) его производные после амплификации mini-Mu(LER)-YK единицы; (9) производный клона 2G, содержащий две копии mini-Mu(LR)-G единиц и еще одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы; *Sph*I эндонуклеаза имеет уникальный сайт узнавания в структуре mini-Mu единицы, который не затрагивает *yECitrine* и *yEGFP*; позиция и количество исходных копий mini-Mu(LR)-G единиц сохраняются при внутримолекулярной амплификации mini-Mu(LER)-YK единиц

5.3 Адаптация системы транспозиции бактериофага Mu для интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *M.extorquens*AM1

Следующим направлением нашей работы было исследование возможности использования системы транспозиции бактериофага Mu с целью интеграции целевых генов в хромосому другой метилотрофной бактерии *M.extorquens* AM1. Используя описанные выше хелперную и интегративную плазмиды, мы смогли продемонстрировать возможность транспозиции mini-Mu(LER)-GK единицы в хромосому *M.extorquens* AM1.

Эффективность интеграции составила 50-100 колоний на 1мкг плазмидной ДНК. Интеграцию подтверждали с помощью ПЦР, используя праймеры Р37/Р38 на ген Km^R. Предварительную оценку эффективности транспозиции проводили, оцени-

111

вая уровень экспрессии гена *уEGFP* в случайно отобранных 8 клонах с помощью флуориметрии (Рисунок 31).



Рисунок 31 -Значения удельной флуоресценции уEGFP клонов *M. extorquens* AM1, отобранных в результате первичной интеграции mini-Mu(LER)-GK транспозона в хромосому: клон 1 - исходный штамм *M. extorquens* AM1; клоны 2-9 - первичные интегранты

Таким образом, экспериментально было показано, что белки *M. extorquens* AM1 способны выполнять функцию своих аналогов из клеток *E. coli* не только при формировании транспозосомы, но и обеспечивать все последующие стадии репликативной транспозиции mini-Mu. Это позволяет использовать Mu-зависимую транспозицию рекомбинантной ДНК в бактериальный геном в практических целях.

К сожалению, содержащиеся на интегративной плазмиде, в mini-Mu единице, гены *strAB* и *kan*(Tn5) даже в одной копии сообщали клеткам *M. extorquens* AM1 высокую устойчивость к соответствующим антибиотикам - выше 2 мг/мл для стрептомицина и выше 500 мкг/мл для канамицина, а, следовательно, использовать их в качестве маркеров отбора множественной транспозиции было нецелесообразно.

В то же время было замечено, что одна копия гена *tetA* в хромосоме *M*. *extorquens* AM1 не позволяет клеткам расти на среде, содержащей тетрациклин выше 60 мкг/мл, одновременно тот же ген *tetA*, содержащийся на плазмиде средней копийности, сообщал клеткам *M. extorquens* AM1 устойчивость к концентрациям тетрациклина в среде до 300мкг/мл. Поэтому можно попробовать использовать этот ген в качестве маркера отбора внутрихромосомальной транспозиции и осуществить селекцию амплификантов на высокой концентрации тетрациклина. Мы планируем продемонстрировать возможность внутрихромосомальной транспозиции, приводящей к амплификации исходной mini-Mu(LER) кассеты в хромосоме *M. extorquens* AM1, а в дальнейшем применить разработанную для *C. glutamicum* стратегию фиксации интегрированных и амплифицированных mini-Mu(LER) элементов для осуществления множественной транспозиции нескольких гетерологичных генов в хромосоме бактерии.

выводы

- 1. Ми-зависимая система интеграции/амплификации рекомбинантной ДНК в бактериальную хромосому, разработанная ранее для *E. coli* и некоторых других грамотрицательных бактерий (например, *Methylophilus methylotrophus* AS-1), была модифицирована и впервые использована для интеграции mini-Mu элементов ДНК в геном трех штаммов граммположительных *Corynebacterium glutamicum* с последующей их амплификацией и фиксацией положения в геноме. Эта система включает три рекомбинантные плазмиды:
 - «хелперную», обеспечивающую экспрессию генов MuAB факторов транспозиции, способную к автономной репликации в клетках *C. glutamicum*, но удаляемую из популяции в неселективных условиях культивирования (в отсутствии антибиотика);
 - «интегративную», с условно зависимой (oriR6Kγ) репликацией, содержащую mini-Mu(LR) элемент, т.е., фланкированный L и R концами ДНК фага Mu интегрируемый ген и селективные маркеры, или mini-Mu(LER) элемент, содержащий дополнительно энхансер E, причем E введен так, что практически весь mini-Mu(LER) элемент за исключением целевого гена с флангами MuL/R может быть удален в результате сайт-специфической рекомбинации между локусами *lox66/lox71* с формированием *lox72* сайта Crepeкoмбиназой фага P1;
 - «хелперную», обеспечивающую экспрессию гена *cre* фага P1, способную к автономной репликации в клетках *C. glutamicum*, но утрачивающуюся в неселективных условиях культивирования (в отсутствии антибиотика).
- 2. Показано, что при электротрансформации клеток *C. glutamicum*, содержащих «хелперную» плазмиду с экспрессирующимися генами MuAB, «интегративной» плазмидой может происходить интеграция mini-Mu элемента в хромосому бактериальной клетки, в основном (более 95% случаев), по механизму репликативной транспозиции с образованием коинтеграта с возможным последующим его RecA-зависимым разрешением. При этом частота интеграции зависит от штамма-реципиента, оптимизированных условий электротрансформации и составляет в типичных экспериментах ≈2.10⁻⁴ на клетку штамма ATCC 13869.
- 3. В качестве маркеров отбора первичной интеграции и амплификации использовались гены устойчивости к канамицину (Km^R) и к стрептомицину (Sm^R), соответственно, введенные в состав mini-Mu(LR)- или mini-Mu(LER)-элемента интегративной плазмиды. Для простоты отбора клонов, содержащих желаемое количество копий mini-Mu(LER)-элемента в бактериальной хромосоме, эффек-

тивно были использованы гены *yECitrine* и *yEGFP*, кодирующие желтый и зеленый флуоресцентные белки.

- 4. Показано, что эффективность репликативной транспозиции mini-Mu(LER) элемента в присутствии факторов MuAB в клетках коринебактерий зависит от присутствия и ориентации E, а при его наличии эффективность существенно выше, чем для mini-Mu(LR) элемента, особенно при амплификации *in vivo* в хромосоме, имеющей сниженную плотность суперспирализации вследствие взаимодействия с клеточными белками. Последнее наблюдение позволило реализовать стратегию фиксации интегрированных и амплифицированных mini-Mu(LER) элементов в результате Cre-зависимого вырезания *in vivo* их Eсодержащих ДНК фрагментов с преобразованием их в mini-Mu(LR) элементы, практически неспособных к дальнейшей амплификации в используемых экспериментальных условиях. Возможности разработанной системы продемонстрированы на примере созданных штаммов, содержащих различное количество копий mini-Mu элементов с генами флуоресцентных белков, тестируемых генетическими методами, флуоресценцией и Саузерн-гибридизацией.
- 5. Ранее разработанная система интеграции/амплификации mini-Mu элементов в хромосому грамотрицательных Methylophilus methylotrophus AS-1 была дополнена новыми элементами для реализации стратегии преобразования интегрированных mini-Mu(LER) элементов в mini-Mu(LR) за счет Сге-зависимого вырезания Е-содержащего фрагмента ДНК и, тем самым, фиксации укороченной кассеты в месте ее интеграции. Кроме того, полноразмерная система Muзависимого редактирования бактериального генома была успешно адаптирована к еще одному представителю метилотрофов Methylobacterium extorquens AM1, представляющему интерес для использования в качестве реципиента в промышленно ориентированных исследованиях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- п.н. пара нуклеотидов
- т.п.н. тысяча пар нуклеотидов
- ЦТК цикл трикарбоновых кислот
- ПФП пентозофосфатный путь
- ЭМП путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса путь
- ФЕП фосфоенолпируват
- ПЦР полимеразная цепная реакция
- Кт, Кт^R– канамицин, маркер устойчивости к канамицину
- Тс, Тс^R– тетрациклин, маркер устойчивости к тетрациклину
- Тс^{нк}-маркер устойчивости к высокой концентрации тетрациклина
- Sm, Sm^R стрептомицин, маркер устойчивости к стрептомицину
- Sm^{HR}-маркер устойчивости к высокой концентрации стрептомицина

Gm- гентамицин

- Ст-хлорамфеникол
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- РНК рибонуклеиновая кислота
- ОП оптическая плотность культуры
- ак.о. аминокислотные остатки
- Е энхансерная последовательность
- NTG-нитрозогуанодин
- IPTG изопропил-β-D-тиогалактопиранозид
- $AT\Phi-$ аденозин-5'- трифосфат
- G гуанин
- С цитозин
- А-аденин
- Т тимин
- SD-последовательность последовательности Шайна-Дальгарно
- RBS сайт связывания рибосомы
- FD –ДНК, фланкирующая геном фага Ми

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Абалакина Е.Г., Токмакова И.Л., Горшкова Н.В., Смирнов С.В., Ахвердян В.З., Машко С.В., Йомантас Ю.В. Использование системы транспозиции бактериофага Ми для интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *Methylophilus methylotrophus* // Биотехнология. – 2008. – №. 3. – С. 13-26.

2. Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., Каплан А.М., Лобанов А.О., Вавиолва Е.Ю., Козлов Ю. Разработка mini-Mu системы, обеспечивающей эффективную интеграцию генетического материала в хромосому бактерии *Escherichia coli* и его амплификацию // Биотехнология. – 2007. – №. 3. – С. 3-20.

3. Саврасова Е.А., Ахвердян В.З., Лобанов А.О., Каплан А.М., Козлов Ю.И. Создание mini-Mu системы, лишенной селективных маркеров, для интеграции генов в хромосому бактерии *Escherichia coli* // Биотехнология. – 2007. – №. 4. – С. 3-17.

4. Токмакова И.Л. Разработка методов направленной модификации бактериальной хромосомы для метаболической инженерии облигатного метилотрофа *Methylophilus Methylotrophus* AS1: Дис. канд. биол. наук. – М., 03.01.03. – 2010. – 133 с.

5. Зименков Д.В., Скороходова А.Ю., Каташкина Ж.И., Минаева Н.И., Саврасова Е.А., Бирюкова И.В., Дорошенко В.Г., Ахвердян В.З., Машко С.В. Области хромосомы *E. coli*, предпочтительные для встраивания генов при использовании, системы интеграции на основе фага Ми // Биотехнология. – 2004. – №. 6. – С. 3-18.

6. Abalakina E.G., Tokmakova I.L., Gorshkova N.V., Gak E.R., AkhverdyanV.Z., Mashko S.V., Yomantas Y.A.V. Phage Mu-driven two-plasmid system for integration of recombinant DNA in the *Methylophilus methylotrophus* genome // Applied microbiology and biotechnology. $-2008. - V. 81. - N_{\odot} \cdot 1. - P. 191-200.$

7. Abremski K., Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein // Journal of Biological Chemistry. $-1984. - V. 259. - N_{\odot}. 3. - P. 1509-1514.$

8. Adham S.A., Campelo AB., Ramos A., Gil JA. Construction of a xylanaseproducing strain of *Brevibacterium lactofermentum* by stable integration of an engineered *xysA* gene from *Streptomyces halstedii* JM8 // Applied and environmental microbiology. $-2001. - V. 67. - N_{\odot}. 12. - P. 5425-5430.$

9. Akhverdyan V.Z., Gak E.R., Tokmakova I.L., Stoynova N.V., Yomantas Y.A.V., Mashko S.V. Application of the bacteriophage Mu-driven system for the integration/amplification of target genes in the chromosomes of engineered Gram-negative bacteria—mini review // Applied microbiology and biotechnology. $-2011. - V. 91. - N_{\odot}. 4. - P. 857-871.$

10. Albert H., Dale E.C., Lee E., Ow D.W. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome // The Plant Journal. $-1995. - V.7. - N_{\odot}.4. - P. 649-659.$

11. Amador E., Martín J.F., Castro J.M. A *Brevibacterium lactofermentum* 16S rRNA gene used as target site for homologous recombination // FEMS microbiology letters. $-2000. - V. 185. - N_{\odot}. 2. - P. 199-204.$

12. Ankri S., Reyes O., Leblon G. Improved electro-transformation of highly DNA-restrictive corynebacteria with DNA extracted from starved *Escherichia coli* // FEMS microbiology letters. $-1996. - V. 140. - N_{\odot}. 2-3. - P. 247-251.$

13. Attwood M.M., Harder W. A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium spp* // Antonie van Leeuwenhoek. – 1972. – V. 38. – №. 1. – P. 369-377.

14. Au T.K., Agrawal P., Harshey R.M. Chromosomal integration mechanism of infecting Mu virion DNA // Journal of bacteriology. $-2006. - V. 188. - N_{\odot}. 5. - P. 1829-1834.$

15. Backman K., Betlach M., Boyer H.W., Yanofsky S. Genetic and physical studies on the replication of ColE1-type plasmids // Cold Spring Habor Laboratory Press.– 1979. – V. 43. – P. 69-76.

16. Baker T.A., Mizuuchi M., Mizuuchi K. MuB protein allosterically activates strand transfer by the transposase of phage Mu // Cell. $-1991. - V. 65. - N_{\odot}. 6. - P.$ 1003-1013.

17. Baker T.A., Mizuuchi K. DNA-promoted assembly of the active tetramer of the Mu transposase // Genes & development. $-1992. - V. 6. - N_{\odot}. 11. - P. 2221-2232.$

18. Baker T.A., Luo L. Identification of residues in the Mu transposase essential for catalysis // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-1994. - V. 91. - N_{\odot}$. 14. -P. 6654-6658.

19. Barak I., Koptides M., Jucovic M., Sisova, M., Timko J. Construction of a promoter-probe shuttle vector for *Escherichia coli* and *Brevibacteria* // Gene. $-1990. - V.95. - N_{\odot}. 1. - P. 133-135.$

20. Bardonnet N., Blanco C. Improved vectors for transcriptional signal screening in *Corynebacteria* // FEMS microbiology letters. – 1991. – V. 84. – №. 1. – P. 97-102.

21. Baumgart M., Unthan S, Rückert C, Sivalingam J, Grünberger A, Kalinowski J, Bott M, Noack S, Frunzke J. Construction of a prophage-free variant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032-a platform strain for basic research and industrial biotechnology // Applied and environmental microbiology. – 2013. – P. AEM. P. 6006-6015.

22. Bayan N., Houssin C., Chami M., Leblon G. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications // Journal of biotechnology. $-2003. - V. 104. - N_{\odot}. 1-3. - P.$ 55-67.

23. Becker J., Klopprogge C., Wittmann C. Metabolic responses to pyruvate kinase deletion in lysine producing *Corynebacterium glutamicum* // Microbial Cell Factories. $-2008. - V. 7. - N_{\odot}. 1. - P. 8.$

24. Becker J., Klopprogge C., Schröder H., WittmannC. Metabolic engineering of the tricarboxylic acid cycle for improved lysine production by *Corynebacterium glutamicum* // Applied and environmental microbiology. – 2009. – V. 75. – №. 24. – P. 7866-7869.

25. Becker J., Zelder O., Häfner S., Schröder H., Wittmann C. From zero to hero—design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for llysine production //Metabolic engineering. $-2011. - V. 13. - N_{\odot}. 2. - P. 159-168.$ 26. Becker J., Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels–*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory // Current opinion in bio-technology. $-2012. - V. 23. - N_{\odot}. 4. - P. 631-640.$

27. Bélanger L., Figueira M.M., Bourque D., Morel L., Béland M., Laramée L., Groleau D., Miguez C. B. Production of heterologous protein by *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation // FEMS Microbiology Letters. -2004. - V. 231. $- N_{2}. 2. - P. 197-204.$

28. Bernard K.A. Corynebacterium: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria . -2015. - P. 1-23

29. Billman-Jacobe H., Hodgfon ALM., Lightowlers AIM., Wood PR., Radford AJ. Expression of ovine gamma interferon in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* // Applied and environmental microbiology. – 1994. – V. 60. – No. 5. – P. 1641-1645.

30. Binder S., Siedler S., Marienhagen J., Bott M., Eggeling L. Recombineering in *Corynebacterium glutamicum* combined with optical nanosensors: a general strategy for fast producer strain generation // Nucleic acids research. $-2013. - V.41. - N_{\odot}.12. - P. 6360-6369.$

31. Borujeni A.E, Salis H.M. Translation initiation is controlled by RNA folding kinetics via a ribosome drafting mechanism // Journal of the American Chemical Society. -2016. -V. 138. $-N_{\odot}$. 22. -P. 7016-7023.

32. Bowers L. M., Krüger R. and Filutowicz M. Mechanism of origin activation by monomers of R6K-encoded pi protein // Journal of molecular biology. $-2007 - V.368 - N_{\odot} \cdot 4 - P. 928-938$.

33. Buchinger S. Strösser J., Rehm N., Hänssler E., HansS., Bathe B., Schomburg D., Krämer R, Burkovski A. A combination of metabolome and transcriptome analyses reveals new targets of the *Corynebacterium glutamicum* nitrogen regulator AmtR // Journal of biotechnology. $-2009. - V. 140. - N_{\odot}. 1-2. - P. 68-74.$

34. Cadenas R.F., Fernandez-Gonzalez C., Martin J.F., Gil J.A. Construction of new cloning vectors for *Brevibacterium lactofermentum* // FEMS microbiology letters. – 1996. – V. 137. – \mathbb{N}_{2} . 1. – P. 63-68.

35. Chaconas G., Harshey R.M., Sarvetnick N., Bukhari A.I. Predominant endproducts of prophage Mu DNA transposition during the lytic cycle are replicon fusions // Journal of molecular biology. $-1981. - V. 150. - N_{\odot}. 3. - P. 341-359.$

36. Chaconas G., Harshey R.M. Transposition of phage Mu DNA / Craig N. L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A. M. // Mobile DNA II. – American Society of Microbiology, 2002. – P. 384-402.

37. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W., Prasher D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // Science. – 1994. – V. 263. – №. 5148. – P. 802-805.

38. Chevalier J. Pommier, M., Cremieux, A., Michel, G. Influence of Tween 80 on the mycolic acid composition of three cutaneous corynebacteria // Microbiology. – 1988. – V. 134. – No. 9. – P. 2457-2461.

39. Chistoserdova L., Chen S.W., Lapidus A., Lidstrom M.E. Methylotrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view // Journal of Bacteriology. $-2003. - V. 185. - N_{\odot}. 10. - P. 2980-2987.$

40. Choi W., Harshey R.M. DNA repair by the cryptic endonuclease activity of Mu transposase // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-2010. - V. 107. - N_{2}. 22. - P. 10014-10019.$

41. Choi W., Jang S., Harshey R.M. Mu transpososome and RecBCD nuclease collaborate in the repair of simple Mu insertions // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-2014. - V. 111. - N_{\odot}. 39. - P. 14112-14117.$

42. Choi Y. J., Bourque D., Morel L., Groleau D., Miguez C. B. Multicopy integration and expression of heterologous genes in *Methylobacterium extorquens* ATCC 55366 // Appl. and environ. microbiol. – 2006. – V. 72. – P. 753-759.

43. Chubiz L.M., Purswani J., Carroll S.M. and Marx C.J. A novel pair of inducible expression vectors for use in *Methylobacterium extorquens* // BMC research notes. $-2013. - V. 6. - N_{\odot}. 1. - P. 183.$

44. Cleto S., Jensen J.V.K, Wendisch V.F., Lu T.K. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi) // ACS synthetic biology. $-2016. - V. 5. - N_{\odot}. 5. - P. 375-385.$

45. Coros C.J., Sekino Y., Baker T.A., Chaconas G. Effect of mutations in the C-terminal domain of Mu B on DNA binding and interactions with Mu A transposase // Journal of Biological Chemistry. $-2003. - V. 278. - N_{\odot}. 33. - P. 31210-31217.$

46. Correia A., Martin J.F., Castro J.M. Targeted integration of foreign genes into repetitive sequences of the *Brevibacterium lactofermentum* chromosome // FEMS microbiology letters. $-1996. - V. 142. - N_{\odot}. 2-3. - P. 259-264.$

47. Craigie R., Mizuuchi M., Mizuuchi K. Site-specific recognition of the bacteriophage Mu ends by the Mu A protein // Cell. $-1984. - V. 39. - N_{\odot}. 2. - P. 387-394.$

48. Craigie R., Mizuuchi K. Transposition of Mu DNA: joining of Mu to target DNA can be uncoupled from cleavage at the ends of Mu // Cell. $-1987. - V. 51. - N_{\odot}. 3. - P. 493-501.$

49. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-2000. - V. 97. - N_{\odot}. 12. - P. 6640-6645.$

50. Demain A.L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe // Biotechnology advances. $-2000. - V. 18. - N_{\odot}. 6. - P. 499-514.$

51. Dillon S.C., Dorman C.J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression // Nature Reviews Microbiology. $-2010. - V. 8. - N_{\odot}. 3. - P. 185.$

52. Ditta G., Schmidhauser T., Yakobson E., Lu P., Liang X. W., Finlay D. R., Guiney D., Helinski D.R. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression // Plasmid. – 1985. – V. 13. – N_{2} . 2. – P. 149-153.

53. Eggeling L., Morbach S., Sahm H. The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* // Journal of biotechnology. $-1997. - V. 56. - N_{\odot}. 3. - P. 167-182.$

54. Eggeling L., Bott M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum.* – CRC press – 2005 –. P. 632

55. Eikmanns B.J. Kleinertz E., Liebl W., Sahm H. A family of *Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing // Gene. – 1991. – V. 102. – N_{2} . 1. – P. 93-98.

56. Figueira M. et al. Methylotrophic bacterium for the production of recombinant proteins and other products // National Research Council, Canada: US patent 09998631. -2003.

57. Fitzgerald K.A., Lidstrom M.E. Overexpression of a heterologous protein, haloalkane dehalogenase, in a poly- β -hydroxybutyrate-deficient strain of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens AM1* // Biotechnology and bioengineering. – 2003. – V. 81. – No. 3. – P. 263-268.

58. Fitzpatrick R., O'Donohue M., Joy J, Heery D.M., Dunican L.K. Construction and characterization of *recA* mutant strains of *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium lactofermentum* // Applied microbiology and biotechnology. – 1994. – V. 42. – No. 4. – P. 575-580.

59. Fränzel B., Poetsch A., Trötschel C., Persicke M., Kalinowski J., Wolters D.A. Quantitative proteomic overview on the *Corynebacterium glutamicum* L-lysine producing strain DM1730 // Journal of proteomics. $-2010. - V.73. - N_{\odot}. 12. - P. 2336-2353.$

60. Ge J., Lou Z., Harshey R.M. Immunity of replicating Mu to self-integration: a novel mechanism employing MuB protein // Mobile DNA. $-2010. - V. 1. - N_{2}. 1. - P.$ 8.

61. Ge J., Lou Z., Cui H., Shang L., Harshey R.M. Analysis of phage Mu DNA transposition by whole-genome *Escherichia coli* tiling arrays reveals a complex relationship to distribution of target selection protein B, transcription and chromosome architectural elements // Journal of biosciences. $-2011. - V. 36. - N_{\odot}. 4. - P. 587-601.$

62. Gorshkova N.V., Lobanova J.S., Tokmakova I.L., Smirnov S.V., Akhverdyan V.Z., Krylov A.A., Mashko S.V. Mu-driven transposition of recombinant mini-Mu unit DNA in the *Corynebacterium glutamicum* chromosome // Applied microbiology and biotechnology. $-2018. - V. 102. - N_{\odot}. 6. - P. 2867-2884.$

63. Groenen M.A.M., van de Putte P. Analysis of the ends of bacteriophage Mu using site-directed mutagenesis // Journal of molecular biology. $-1986. - V. 189. - N_{\odot}$. 4. -P. 597-602.

64. Groisman E.A., Casadaban M.J. Mini-mu bacteriophage with plasmid replicons for *in vivo* cloning and *lac* gene fusing // Journal of bacteriology. $-1986. - V. 168. - N_{\text{O}} \cdot 1. - P. 357-364.$

65. Gueguen E., Rousseau P., Duval-Valentin G., Chandler M. The transpososome: control of transposition at the level of catalysis // Trends in microbiology. $-2005. - V. 13. - N_{\odot}. 11. - P. 543-549.$

66. Guillouet S., Rodal A.A., An G.H., Lessard P.A., Sinskey A.J. Expression of the *Escherichia coli* catabolic threonine dehydratase in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on isoleucine production // Applied and environmental microbiology. – 1999. – V. 65. – No. 7. – P. 3100-3107.

67. Gunji Y., Tsujimoto N., Shimaoka M., Ogawa-Miyata Y., Sugimoto S., Yasueda H. Characterization of the L-lysine biosynthetic pathway in the obligate methylotroph *Methylophilus methylotrophus* // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. $-2004. - V. 68. - N_{\odot}. 7. - P. 1449-1460.$

68. Gutiérrez J., Bourque D., Criado R., Choi Y.J., Cintas L.M., Hernandez P. E., and Miguez C.B. Heterologous extracellular production of enterocin P *from Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens* // FEMS microbiology letters. $-2005. - V. 248. - N_{\odot}. 1. - P. 125-131.$

69. Haapa S., Taira S., Heikkinen E., Savilahti H. An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons *in vitro*: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications // Nucleic acids research. – 1999. – V. 27. – N_{2} . 13. – P. 2777-2784.

70. Haldimann A., Wanner B.L. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria // Journal of bacteriology. $-2001. - V. 183. - N_{\odot}. 21. - P. 6384-6393.$

71. Hall S.D., Kolodner R.D. Homologous pairing and strand exchange promoted by the *Escherichia coli* RecT protein // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-1994. - V. 91. - N_{\odot}. 8. - P. 3205-3209.$

72. Han Y.W., Mizuuchi K. Phage Mu transposition immunity: protein pattern formation along DNA by a diffusion-ratchet mechanism // Molecular cell. -2010. - V. 39. $- N_{\odot}$. 1. - P. 48-58.

73. Harshey R.M., Bukhari A.I. Infecting bacteriophage Mu DNA forms a circular DNA-protein complex // Journal of molecular biology. $-1983. - V. 167. - N_{\odot}. 2. - P.$ 427-441.

74. Harshey R.M. Switch in the transposition products of Mu DNA mediated by proteins: Cointegrates versus simple insertions // Proceedings of the National Academy of Sciences. -1983. -V. 80. -No. 7. -P. 2012-2016.

75. Harshey R.M., Jayaram M. The Mu transpososome through a topological lens // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. $-2006. - V. 41. - N_{\odot}. 6. - P.$ 387-405.

76. Harshey R.M. The Mu story: how a maverick phage moved the field forward // Mobile DNA. -2012. -V. 3. $-N_{2}$. 1. -P. 21.

77. Harshey R.M. Transposable Phage Mu. // Mobil DNA –2014 – P. 669-691.

78. Hayashi M., Ohnishi J., Mitsuhashi S., Yonetani Y., Hashimoto S., Ikeda M. Transcriptome analysis reveals global expression changes in an industrial L-lysine producer of *Corynebacterium glutamicum* // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2006. – V. 70. – No. 2. – P. 546-550.

79. Hillen W., Berens C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance // Annual Reviews in Microbiology. $-1994. - V. 48. - N_{\odot}. 1. - P.$ 345-369.

80. Hochheim J. Novel Genetic Tools for Production Strain Development of *Corynebacterium glutamicum //* Health. – 2017. – V. 83. – P. 1-63.

81. Horton R.M. PCR-mediated recombination and mutagenesis // Molecular biotechnology. $-1995. - V. 3. - N_{\odot}. 2. - P. 93-99.$

82. Huang Y., Li L., Zhao N., Han S., Lin Y., Zheng S. Recombineering using RecET in *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 via a self-excisable cassette // Scientific reports. $-2017. - V.7. - N_{\odot}. 1. - P. 7916.$

83. Ikeda M., Katsumata R. A novel system with positive selection for the chromosomal integration of replicative plasmid DNA in *Corynebacterium glutamicum* // Microbiology. $-1998. - V. 144. - N_{\odot}. 7. - P. 1863-1868.$

84. Ikeda M., Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes // Applied microbiology and biotechnology. $-2003. - V. 62. - N_{\odot}. 2-3. - P. 99-109.$

85. Ikeda M., Ohnishi J., Hayashi M., Mitsuhashi S. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. $-2006b. - V. 33. - N_{\odot}. 7. - P. 610-615.$

86. Ilyina T.V., Koonin E.V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaebacteria // Nucleic acids research. – 1992. – V. 20. – \mathbb{N}_{2} . 13. – P. 3279-3285.

87. Inui M., Kawaguchi H., Murakami S., Vertes A.A., Yukawa H. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygendeprivation conditions // Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2004a. – V. 8. – No. 4. – P. 243-254.

88. Inui M., Murakami S, Okino S., Kawaguchi H., Vert` es A.A., Yukawa H. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions // Journal of molecular microbiology and biotechnology. $-2004b. - V. 7. - N_{\odot}. 4. - P. 182-196.$

89. Ishikawa K., Toda-Murakoshi Y., Ohnishi F., Kondo K., Osumi T., Asano K. Medium composition suitable for L-lysine production by *Methylophilus methylotrophus* in fed-batch cultivation // Journal of bioscience and bioengineering. $-2008. - V. 106. - N_{\odot}. 6. - P. 574-579.$

90. Jäger W., Schafer A., Puhler A., Labes G., Wohlleben W. Expression of the *Bacillus subtilissacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans* // Journal of bacteriology. – 1992. – V. 174. – №. 16. – P. 5462-5465.

91. Jang K.H., Britz M.L. Improved electrotransformation frequencies of *Corynebacterium glutamicum* using cell-surface mutants // Biotechnology Letters. $-2000. - V. 22. - N_{\odot}. 7. - P. 539-545.$

92. Jang S., Sandler S.J., Harshey R.M. Mu insertions are repaired by the doublestrand break repair pathway of *Escherichia coli* // PLoS genetics. $-2012. - V. 8. - N_{2}. 4. - P.$.

93. Jensen V.K.J. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of glutamate derivatives: Dissertation / Jensen V.K.J. – Bielefeld – Universität Bielefeld – 2015. – 116 p.

94. Jiang H., Harshey R.M. The Mu Enhancer Is Functionally Asymmetric Both *in cis* and *in trans.* – 2001.V. 276. – P. 4373-4381

95. Jiang Y., Qian F., Yang J., Liu Y., Dong F., Xu C., Sun B., Chen B., Xu X., Li Y., Wang R., Yang S. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum* // Nature communications. – 2017. – V. 8. – P. 15179.

96. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. – 2012. – P. 1225829.

97. Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B.J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Krämer R., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Möckel B., Pfefferle W., Pühler A., Rey D.A., Rückert C., Rupp O., Sahm H., Wendisch V.F., Wiegräbe I., Tauch A. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence

and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins // Journal of biotechnology. $-2003. - V. 104. - N_{\odot}. 1-3. - P. 5-25.$

98. Kallscheuer N. *Corynebacterium glutamicum* - a novel platform for the production of plant polyphenols: Ph.D. thesis / Kallscheuer Nicolai. – Jülich, 2017. – 99 p.

99. Katsumata R., Ozaki A., Oka T., Furuya A. Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA // Journal of bacteriology. -1984. - V. $159. - N_{\odot}. 1. - P. 306-311.$

100. Kim K., Harshey R.M. Mutational analysis of the *att* DNA-binding domain of phage Mu transposase // Nucleic acids research. – 1995. – V. 23. – №. 19. – P. 3937-3943.

101. Kim I.K., Jeong W.K., Lim S.H., Hwang I.K., Kim Y.H. The small ribosomal protein S12P gene *rpsL* as an efficient positive selection marker in allelic exchange mutation systems for *Corynebacterium glutamicum* // Journal of microbiological methods. – $2011. - V. 84. - N_{\odot}. 1. - P. 128-130.$

102. Kingsford C.L., Ayanbule K., Salzberg S.L. Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake // Genome biology. $-2007. - V. 8. - N_{\odot}. 2. - P. R22.$

103. Kinoshita S., Udaka S., Shimono M. Studies on the amino acid fermentation // The Journal of general and applied microbiology. $-1957. - V. 3. - N_{\odot}. 3. - P. 193-205.$

104. Kirchner O., Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acidproducing bacterium *Corynebacterium glutamicum* // Journal of biotechnology. – 2003. – V. 104. – No. 1-3. – P. 287-299.

105. Kjeldsen K.R., Nielsen J. *In silico* genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network // Biotechnology and bioengineering. $-2009. - V. 102. - N_{\odot}. 2. - P. 583-597.$

106. Knoppová M., Phensaijai M., Veselý M., Zemanová M, Nešvera J., Pátek M. Plasmid vectors for testing *in vivo* promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* // Current microbiology. – 2007. – V. 55. – \mathbb{N}_{2} . 3. – P. 234-239.

107. Koch B., Jensen L.E., Nybroe O. A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site // Journal of Microbiological Methods. $-2001. - V. 45. - N_{\odot}$. 3. -P. 187-195.

108. Krause H.M., Higgins N.P. Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu repressor and *Escherichia coli* integration host factor // Journal of Biological Chemistry. $-1986. - V. 261. - N_{\odot}. 8. - P. 3744-3752.$

109. Krementsova E., Giffin M.J., Pincus D., Baker T.A. Mutational analysis of the Mu transposase contributions of two distinct regions of domain ii to recombination // Journal of Biological Chemistry. $-1998. - V. 273. - N_{\odot}. 47. - P. 31358-31365.$

110. Krömer J.O., Sorgenfrei O, Klopprogge K, Heinzle E, Wittmann C. In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome // Journal of bacteriology. $-2004. - V. 186. - N_{\odot}. 6. - P. 1769-1784.$

111. Krömer J.O., Wittmann C, Schröder H, Heinzle E. Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* // Metabolic engineering. – 2006. – V. 8. – №. 4. – P. 353-369.

112. Krylov A.A., Kolontaevsky E.E., Mashko S.V. Oligonucleotide recombination in corynebacteria without the expression of exogenous recombinases // Journal of microbiological methods. -2014. -V. 105. -P. 109-115.

113. Kuo C.F., Zou A., Jayaram M., Getzoff E., Harshey R. DNA-protein complexes during attachment-site synapsis in Mu DNA transposition // The EMBO journal. $-1991. - V. 10. - N_{\odot}. 6. - P. 1585-1591.$

114. Lamberg A., Nieminen S., Qiao M., Savilahti H. Efficient insertion mutagenesis strategy for bacterial genomes involving electroporation of *in vitro*-assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu // Applied and environmental microbiology. $-2002. - V. 68. - N_{\odot}. 2. - P. 705-712.$

115. Lanckriet A., Timbermont L., Happonen L.J., Pajunen M.I., Pasmans F., Haesebrouck F., Ducatelle R., Savilahti H., Van Immerseel F. Generation of single-copy transposon insertions in *Clostridium perfringens* by electroporation of phage Mu DNA transposition complexes // Applied and environmental microbiology. $-2009. - V.75. - N_{\odot}.9. - P. 2638-2642.$

116. Larsen J.E.L., Albrechtsen B., Valentin-Hansen P. Analysis of the terminator region after the *deoCABD* opcron of *Escherichia coli* K-12 using a new class of single copy number operon-fusion vectors // Nucleic acids research. – 1987. – V. 15. – \mathbb{N}_{2} . 13. – P. 5125-5140.

117. Lausberg F., Chattopadhyay A.R., Heyer A., Eggeling L., and Freudl R. A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression // Plasmid. $-2012. - V. 68. - N_{\odot}. 2. - P. 142-147.$

118. Lavoie B.D., Chaconas G. Immunoelectron microscopic analysis of the A, B, and HU protein content of bacteriophage Mu transpososomes // Journal of Biological Chemistry. $-1990. - V. 265. - N_{\odot}. 3. - P. 1623-1627.$

119. Lavoie B.D., Chan B.S., Allison R.G., Chaconas G. Structural aspects of a higher order nucleoprotein complex: induction of an altered DNA structure at the Mu-host junction of the Mu type 1 transpososome // The EMBO Journal. – 1991. – V. $10. - N_{\odot}$. 10. - P. 3051-3059.

120. Lavoie B.D., Chaconas G. Transposition of phage Mu DNA // Current topics in microbiology and immunology. $-1995. - V. 1. - N_{\odot}. 204. - P. 83-102.$

121. Lawley T.D., Burland V., Taylor D.E. Analysis of the complete nucleotide sequence of the tetracycline-resistance transposon Tn10 // Plasmid. $-2000. - V. 43. - N_{\odot}$. 3. -P. 235-239.

122. Lee I., Harshey R.M. Importance of the conserved CA dinucleotide at Mu termini1 // Journal of molecular biology. $-2001. - V. 314. - N_{\odot}. 3. - P. 433-444.$

123. Lee I., Harshey R.M. The conserved CA/TG motif at Mu termini: T specifies stable transpososome assembly // Journal of molecular biology. $-2003. - V. 330. - N_{\odot}$. 2. -P. 261-275.

124. Le Marrec C., Michotey V., Blanco C., Trautwetter A.A temperate bacteriophage specific for '*Arthrobacter aureus*', whose integrative functions work in other corynebacteria // Microbiology. $-1994. - V. 140. - N_{\odot}. 11. - P. 3071-3077.$

125. Letek M., Valbuena N., Ramos A., Ordonez E., Gil J.A., Mateos L.M. Characterization and use of catabolite-repressed promoters from gluconate genes in *Corynebacterium glutamicum* // Journal of bacteriology. – 2006. – V. 188. – №. 2. – P. 409-423.

126. Leung P.C., Teplow D.B., Harshey R.M. Interaction of distinct domains in Mu transposase with Mu DNA ends and an internal transpositional enhancer // Nature. – 1989. – V. 338. – No. 6217. – P. 656-658.

127. Levchenko I., Luo L., Baker T.A. Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone // Genes & development. – 1995. – V. 9. – №. 19. – P. 2399-2408.

128. Liu J., Wang Y., Lu Y., Zheng P., Sun J. and Ma Y. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum* // Microbial cell factories. $-2017. - V. 16. - N_{\odot}. 1. - P. 205.$

129. Magnus J.B., Oldiges M., Takors R. The identification of enzyme targets for the optimization of a value producing *Corynebacterium glutamicum* strain using a kinetic model // Biotechnology progress. $-2009. - V. 25. - N_{\odot}. 3. - P. 754-762.$

130. Marx C.J., Lidstrom M.E. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria // Microbiology. $-2001. - V. 147. - N_{\odot}. 8. - P. 2065-2075.$

131. Marx C.J., Lidstrom M.E. Development of an insertional expression vector system for *Methylobacterium extorquens* AM1 and generation of null mutants lacking *mtdA* and/or *fch* // Microbiology. $-2004. - V. 150. - N_{\odot}. 1. - P. 9-19.$

132. Mhammedi-Alaoui A., Pato M., Gama M.J., Toussaint A. A new component of bacteriophage Mu replicative transposition machinery: the *Escherichia coli* ClpX protein // Mol microbiol.– 1994. – V. 11. – P. 1109-1116.

133. Mizuno N., Dramicanin M., Mizuuchi M., Adam J., Wang Y., Han Y.W., Yang W., Steven A.C., Mizuuchi K., Ramon-Maiques S. MuB is an AAA+ ATPase that forms helical filaments to control target selection for DNA transposition // Proceedings of the National Academy of Sciences. -2013. -V. 110. -N. 27. -P. E2441-E2450.

134. Mizuuchi K. *In vitro* transposition of bacteriophage Mu: a biochemical approach to a novel replication reaction // Cell. – 1983. – V. 35. – No. 3. – P. 785-794.

135. Mizuuchi M., Mizuuchi K. Efficient Mu transposition requires interaction of transposase with a DNA sequence at the Mu operator: implications for regulation // Cell. $-1989. - V.58. - N_{\odot}.2. - P.399-408.$

136. Mizuuchi K. Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of Mu and other elements // Annual review of biochemistry. $-1992. - V. 61. - N_{\odot}. 1. - P. 1011-1051.$

137. Mizuuchi K. Polynucleotidyl transfer reactions in site-specific DNA recombination // Genes to Cells. $-1997. - V. 2. - N_{\odot}. 1. - P. 1-12.$

138. Mizuuchi K., Baker T.A. Chemical mechanisms for mobilizing DNA // Mobile DNA II. – American Society of Microbiology, 2002. – P. 12-23.

139. Moreau S., LeMarrec C., Blanco C., Trautwetter A.Analysis of the integration functions of $\varphi 304L$: an integrase module among corynephages // Virology. – 1999a. – V. 255. – No. 1. – P. 150-159.

140. Moreau S., Blanco C., Trautwetter A. Site-specific integration of corynephage $\varphi 16$: construction of an integration vector // Microbiology. - 1999b. - V. 145. - No. 3. - P. 539-548.

141. Morgan G.J., Hatfull G.F., Casjens S., Hendrix R.W. Bacteriophage Mu genome sequence: analysis and comparison with Mu-like prophages in *Haemophilus, Neisseria and Deinococcus1* // Journal of molecular biology. $-2002. - V. 317. - N_{\odot}. 3. - P. 337-359.$

142. Morinaga Y., Tsuchiya M., Miwa K., Sano K. Expression of *Escherichia coli* promoters in *Brevibacterium lactofermentum* using the shuttle vector pEB003 // Journal of biotechnology. $-1987. - V. 5. - N_{\odot}. 4. - P. 305-312.$

143. Mosberg J.A., Lajoie M.J., Church G.M. Lambda red recombination in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate // Genetics. -2010 - V.186 - P.791-9.

144. Montaño S.P., Pigli Y.Z., Rice P.A. The Mu transpososome structure sheds light on DDE recombinase evolution // Nature. – 2012. – V. 491. – №. 7424. – P. 413-417.

145. Naigamwalla D.Z., Chaconas G. A new set of Mu DNA transposition intermediates: alternate pathways of target capture preceding strand transfer // The EMBO journal. $-1997. - V. 16. - N_{\odot}. 17. - P. 5227-5234.$

146. Nakai H., Doseeva V., Jones J.M. Handoff from recombinase to replisome: insights from transposition // Proceedings of the National Academy of Sciences. -2001. -V.98. $-N_{\odot}$. 15. -P.8247-8254.

147. Nakamura Y. et al. The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system // Gene. -2003. - V. 317. - P. 149-155.

148. Nakamura J.S., Hirano and Ito H. L-glutamic acid producing microorganism and a method for producing L-glutamic acid U.S.: patent US20060141588A1–2006.

149. Nakayama C., Teplow D. B., Harshey R. M. Structural domains in phage Mu transposase: identification of the site-specific DNA-binding domain // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-1987. - V. 84. - N_{\odot}. 7. - P. 1809-1813.$

150. Nešvera J., Pátek M. Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications // Applied microbiology and biotechnology. $-2011. - V.90. - N_{\odot}. 5. - P. 1641-1654.$

151. North S.H., Nakai H. Host factors that promote transpososome disassembly and the PriA-PriC pathway for restart primosome assembly // Molecular microbiology. $-2005. - V.56. - N_{\odot}.6. - P. 1601-1616.$

152. North S.H., Kirtland S.E., Nakai H. Translation factor IF2 at the interface of transposition and replication by the PriA-PriC pathway // Molecular microbiology. $-2007. - V. 66. - N_{\odot}. 6. - P. 1566-1578.$

153. Nunn D.N., Lidstrom M.E. Isolation and complementation analysis of 10 methanol oxidation mutant classes and identification of the methanol dehydrogenase structural gene of *Methylobacterium* sp. strain AM1 // Journal of bacteriology. $-1986. - V. 166. - N_{\odot}. 2. - P. 581-590.$

154. Ohnishi J., Mitsuhashi S., Hayashi M., Ando S., Yokoi H., Ochiai K., Ikeda M. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant // Applied microbiology and biotechnology. $-2002. - V.58. - N_{\odot}.2. - P. 217-223.$

155. Oram M., Woolston J.E., Jacobson A.D., Holmes R.K., Oram D.M. Bacteriophage-based vectors for site-specific insertion of DNA in the chromosome of corynebacteria // Gene. $-2007. - V. 391. - N_{\odot}. 1. - P. 53-62.$ 156. Ozaki A., Katsumata R., Oka T., Furuya A. Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum* // Molecular and General Genetics MGG. – 1984. – V. 196. – N_{2} . 1. – P. 175-178.

157. Pajunen M.I., Pulliainen A.T., Finne J., Savilahti H. Generation of transposon insertion mutant libraries for Gram-positive bacteria by electroporation of phage Mu DNA transposition complexes // Microbiology. $-2005. - V. 151. - N_{\odot}. 4. - P. 1209-1218.$

158. Pátek M., Eikmanns B.J., Pátek J., Sahm H. Promoters from *Corynebacterium* glutamicum: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif // Microbiology. $-1996. - V. 142. - N_{\odot}. 5. - P. 1297-1309.$

159. Pátek M. Regulation of gene expression / Eggeling L., Bott M. :Handbook of *Corynebacterium glutamicum //* CRC Press – 2005.

160. Pátek M., Holátko J., Busche T., Kalinowski J. and Nešvera J. *Corynebacterium glutamicum* promoters: a practical approach // Microbial biotechnology. $-2013. - V. 6. - N_{\odot}. 2. - P. 103-117.$

161. Pathania S., Jayaram M., Harshey R.M. Path of DNA within the Mu transpososome: transposase interactions bridging two Mu ends and the enhancer trap five DNA supercoils // Cell. $-2002. - V. 109. - N_{\odot}. 4. - P. 425-436.$

162. Pato M.L., Banerjee M. Genetic analysis of the strong gyrase site (SGS) of bacteriophage Mu: localization of determinants required for promoting Mu replication // Molecular microbiology. $-2000. - V. 37. - N_{\odot}. 4. - P. 800-810.$

163. Pato M.L. Replication of Mu prophages lacking the central strong gyrase site // Research in microbiology. $-2004. - V. 155. - N_{\odot}. 7. - P. 553-558.$

164. Park J.U., Jo J.H., Kim Y.J., Chung S.S., Lee J.H., Lee H.H. Construction of heat-inducible expression vector of *Corynebacterium glutamicum* and *C. ammoniagenes*: fusion of lambda operator with promoters isolated from *C. ammoniagenes* // Journal of microbiology and biotechnology. $-2008. - V. 18. - N_{\odot}. 4. - P. 639-647.$

165. Plassmeier J., Persicke M., Pühler A., Sterthoff C., Rückert C. and Kalinowski J. Molecular characterization of PrpR, the transcriptional activator of propionate catabolism in *Corynebacterium glutamicum* // Journal of biotechnology. $-2012. - V. 159. - N_{\odot}. 1-2. - P. 1-11.$

166. Pósfai G., Koob M., Hradecna Z., Hasan N., Filutowicz M., Szybalski W. *In vivo* excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome // Nucleic acids research. $-1994. - V. 22. - N_{\odot}. 12. - P. 2392-2398.$

167. Puech V., Chami M., Lemassu A., Laneelle M.A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daffe M. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane // Microbiology. $-2001. - V. 147. - N_{\odot}. 5. - P. 1365-1382.$

168. Ravasi P., Peiru S., Gramajo H., Menzella H.G. Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum* // Microbial cell factories. $-2012. - V. 11. - N_{\odot}. 1. - P. 147.$

169. Rice P., Kiyoshi M. Structure of the bacteriophage Mu transposase core: a common structural motif for DNA transposition and retroviral integration // Cell. – 1995. – V. 82. – No. 2. – P. 209-220.

170. Roldan L.A.S., Baker T.A. Differential role of the Mu B protein in phage Mu integration vs. replication: mechanistic insights into two transposition pathways // Molecular microbiology. $-2001. - V. 40. - N_{\odot}. 1. - P. 141-155.$

171. Rubens C.E., McNeill W.F., Farrar W.E. Transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequence in *Pseudomonas aeruginosa* which mediates resistance to gentamicin and four other antimicrobial agents // Journal of bacteriology. $-1979. - V. 139. - N_{\odot}$. 3. - P. 877-882.

172. Sahm H., Eggeling L., de Graaf A.A. Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum* // Biological chemistry. $-2000. - V. 381. - N_{\odot}$. 9-10. - P. 899-910.

173. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual., 3rd edn. // Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York. – 2001.

174. Savilahti H., Rice P.A., Mizuuchi K. The phage Mu transpososome core: DNA requirements for assembly and function // The EMBO journal. $-1995. - V. 14. - N_{\odot}$. 19. - P. 4893-4903.

175. Sawitzke J.A., Thomason L.C., Costantino N., Bubunenko M., Datta S., Court D.L.Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond //Methods Enzymol. –2007. – V.421. – P.171-199.

176. Schafer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. – 1994. – V. 145. – No. 1. – P. 69-73.

177. Senior P.J., Windass J. The ICI single cell protein process // Biotechnology Letters. $-1980. - V. 2. - N_{\odot}. 5. - P. 205-210.$

178. Shapiro J.A. Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements // Proceedings of the National Academy of Sciences. $-1979. - V. 76. - N_{\odot}. 4. - P. 1933-1937.$

179. Sheff M.A., Thorn K.S. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. $-2004. - V. 21. - N_{\odot}. 8. - P. 661-670.$

180. Shen J., Chen J., Jensen PR., Solem C. A novel genetic tool for metabolic optimization of *Corynebacterium glutamicum*: efficient and repetitive chromosomal integration of synthetic promoter-driven expression libraries // Applied microbiology and biotechnology. $-2017. - V. 101. - N_{\odot}. 11. - P. 4737-4746.$

181. Shinfuku Y., Sorpitiporn N., Sono M., Furusawa C., Hirasawa T., Shimizu H. Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum* // Microbial Cell Factories. $-2009. - V. 8. - N_{\odot}. 1. - P.$ 43.

182. Siebert D., Wendisch V.F. Metabolic pathway engineering for production of 1, 2-propanediol and 1-propanol by *Corynebacterium glutamicum* // Biotechnology for biofuels. $-2015. - V. 8. - N_{\odot}. 1. - P. 91.$

183. Sokolsky T.D., Baker T.A. DNA gyrase requirements distinguish the alternate pathways of Mu transposition // Molecular microbiology. $-2003. - V. 47. - N_{2}. 2. - P.$ 397-409.

184. Sonnen H., Thierbach G., Kautz S., Kalinowski J., Schneider J., Pühler A., Kutzner H.J. Characterization of pGA1, a new plasmid from *Corynebacterium* glutamicum LP-6 // Gene. $-1991. - V. 107. - N_{\odot}. 1. - P. 69-74.$

185. Stephanopoulos G., Aristidou A.A., Nielsen J. Metabolic engineering: principles and methodologies // Academic Press. – 1998. – 749 p.

186. Stoll S.M., Ginsburg D.S., Calos M.P. Phage TP901-1 site-specific integrase functions in human cells // Journal of bacteriology. $-2002. - V. 184. - N_{\odot}. 13. - P.$ 3657-3663.

187. Surette M.G., Buch S.J., Chaconas G. Transpososomes: stable protein-DNA complexes involved in the in vitro transposition of bacteriophage Mu DNA // Cell. – 1987. – V. 49. – N_{2} . – P. 253-262.

188. Surette M.G., Lavoie B.D., Chaconas G. Action at a distance in Mu DNA transposition: an enhancer-like element is the site of action of supercoiling relief activity by integration host factor (IHF) // The EMBO journal. – 1989. – V. 8. – N_{2} . 11. – P. 3483-3489.

189. Surette M.G., Chaconas G. A protein factor which reduces the negative supercoiling requirement in the Mu DNA strand transfer reaction is *Escherichia coli* integration host factor // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – V. 264. – No. 5. – P. 3028-3034.

190. Surette M.G., Chaconas G. The Mu transpositional enhancer can function *in trans*: requirement of the enhancer for synapsis but not strand cleavage // Cell. $-1992. - V. 68. - N_{\odot}. 6. - P. 1101-1108.$

191. Suzuki N., Nonaka H., Tsuge Y., Inui M., Yukawa H. New multiple-deletion method for the *Corynebacterium glutamicum* genome, using a mutant *lox* sequence // Applied and environmental microbiology. $-2005. - V.71. - N_{\odot}. 12. - P. 8472-8480.$

192. Suzuki N., Okai N., Nonaka H., Tsuge Y., Inui M., Yukawa H. Highthroughput transposon mutagenesis of *Corynebacterium glutamicum* and construction of a single-gene disruptant mutant library // Applied and environmental microbiology. – $2006. - V. 72. - N_{\odot}. 5. - P. 3750-3755.$

193. Swinger K.K., Rice P.A. IHF and HU: flexible architects of bent DNA // Current opinion in structural biology. $-2004. - V. 14. - N_{\odot}. 1. - P. 28-35.$

194. Symonds N. Phage Mu. – Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 1987.

195. Szpirer C.Y., Faelen M., Couturier M. Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1 // Journal of bacteriology. $-2001. - V. 183. - N_{\odot}. 6. - P. 2101-2110.$

196. Tateno T., Fukuda H., Kondo A. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis* α -amylase using *cspB* promoter and signal sequence // Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – V. 77. – No. 3. – P. 533-541.

197. Tauch A., Homann I., Mormann S., Ruberg S., Billault A., Bathe B., Brand S., Brockmann-Gretza O., Ruckert C., Schischka N., Wrenger C., Hoheisel J., Mockel B., Huthmacher K., Pfefferle W., Puhler A., Kalinowski J. Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library // Journal of biotechnology. – 2002a. – V. 95. – №. 1. – P. 25-38.

198. Tauch A., Götker S, Pühler A, Kalinowski J, Thierbach G. The alanine racemase gene *alr* is an alternative to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains // Journal of biotechnology. – 2002b. – V. 99. – No. 1. – P. 79-91.

199. Tauch A., Pühler A., Kalinowski J., Thierbach G. Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics // Journal of biotechnology. $-2003. - V. 104. - N_{\odot}. 1-3. - P. 27-40.$

200. Taylor L. Bacteriophage-induced mutation in *E. coli*. // Proceedings of the National Academy of Sciences. –1963–V.50. –P.1043-51.

201. Toussaint A. Transposable Mu-like phages in *Firmicutes*: new instances of divergence generating retroelements // Research in microbiology. $-2013. - V. 164. - N_{\odot}$. 4. -P. 281-287.

202. Tsuchiya M., Morinaga Y. Genetic control systems of *Escherichia coli* can confer inducible expression of cloned genes in coryneform bacteria // Nature Biotechnology. $-1988. - V. 6. - N_{\odot}. 4. - P. 428.$

203. Tsuge Y., Suzuki N., Inui M., Yukawa H. Random segment deletion based on IS31831 and *Cre/loxP* excision system in *Corynebacterium glutamicum* // Applied microbiology and biotechnology. $-2007. - V. 74. - N_{\odot}. 6. - P. 1333-1341.$

204. Udaka S. Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus* // Journal of bacteriology. -1960. - V. 79. $- N_{\odot}$. 5. - P. 754.

205. Vašicová P., Patek M., Nesvera J., Sahm H. and Eikmanns B. Analysis of the *Corynebacterium glutamicumdapA* promoter // Journal of bacteriology. -1999. - V.181. $- N_{2}$. 19. - P. 6188-6191.

206. Vertès A.A., Inui M., Yukawa H. Manipulating corynebacteria, from individual genes to chromosomes // Applied and environmental microbiology. $-2005. - V. 71. - N_{\odot}. 12. - P. 7633-7642.$

207. Vertès A.A., Inui M., Yukawa H. Postgenomic approaches to using corynebacteria as biocatalysts // Annual review of microbiology. -2012. - V. 66. - P. 521-550.

208. Vieira J. and Messing J. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins // Gene. – 1991. – V. 100. – P. 189-194.

209. Wang Z., Harshey R.M. Crucial role for DNA supercoiling in Mu transposition: a kinetic study // Proceedings of the National Academy of Sciences. -1994. - V.91. $- N_{\odot}$. 2. - P. 699-703.

210. Watson M.A., Chaconas G. Three-site synapsis during Mu DNA transposition: a critical intermediate preceding engagement of the active site // Cell. – 1996. – V. $85. - N_{\odot}$. 3. - P. 435-445.

211. Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. Molecular biology of the gene: 5th ed. // Cold Spring Harbor Laboratory Press. –2004. – P. 316–334

212. Wehmeier L., Brockmann-Gretza O., Pisabarro A., Tauch A., Puhler A., Martın J.F., Kalinowski J. A *Corynebacterium glutamicum* mutant with a defined deletion within the *rplK* gene is impaired in (p) ppGpp accumulation upon amino acid starvation // Microbiology. $-2001. - V. 147. - N_{\odot}. 3. - P. 691-700.$

213. Wendisch V.F., Jorge, J. M., Pérez-García, F., Sgobba, E. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum* // World Journal of Microbiology and Biotechnology. $-2016. - V. 32. - N_{\odot}. 6. - P. 105.$

214. Wieschalka S., Blombach B., Bott M., Eikmanns B.J. Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum* // Microbial biotechnology – 2013. – V.6. – P. 87-102.

215. Witthoff S., Schmitz K., Niedenführ S., Nöh K., Noack S., Bott M., Marienhagen J. Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the Metabolization of Methanol // Applied and environmental microbiology. – 2015. – P. AEM. 03110-14.

216. Wittmann C. Analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in *Corynebacterium glutamicum* // Adv Biochem Engin Biotechnol– 2010. – V. 120. – P. 21-49.

217. Wittmann C., Becker J. The L-lysine story: from metabolic pathways to industrial production / Wendisch VF // In Microbiology Monographs: Amino Acid Biosynthesis. Heidelberg, Ger.: Springer, 2007. P. 39-70.

218. Xu D., Tan Y., Huan X., Hu X., Wang X. Construction of a novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer //Journal of microbiological methods. $-2010. - V. 80. - N_{\odot}. 1. - P. 86-92.$

219. Yamauchi M., Baker T.A. An ATP–ADP switch in MuB controls progression of the Mu transposition pathway // The EMBO journal. – 1998. – V. 17. – №. 18. – P. 5509-5518.

220. Yin Z., Harshey R.M. Enhancer-independent Mu transposition from two topologically distinct synapses // Proceedings of the National Academy of Sciences. -2005. -V. 102. $-N_{\odot}$. 52. -P. 18884-18889.

221. Yin Z., Suzuki A., Lou Z., Jayaram M., Harshey R.M. Interactions of phage Mu enhancer and termini that specify the assembly of a topologically unique interwrapped transpososome // Journal of molecular biology. $-2007. - V. 372. - N_{\odot}. 2. - P. 382-396.$

222. Yomantas Y. V., Tokmakova I.L., Gorshkova N.V., Abalakina E.G., Kazakova S.M., Gak E.R., Mashko S.V. Aromatic amino acid auxotrophs constructed by recombinant marker exchange in *Methylophilus methylotrophus* AS1 cells expressing the *aroP*-encoded transporter of *Escherichia coli*. // Applied and environmental microbiology. $-2010. - V. 76. - N_{\odot}. 1. - P. 75-83.$

223. Yuan J.F., Beniac D.R., Chaconas G., Ottensmeyer F.P. 3D reconstruction of the Mu transposase and the Type 1 transposome: a structural framework for Mu DNA transposition // Genes & development. $-2005. - V. 19. - N_{\odot}. 7. - P. 840-852.$

224. Zahoor A., Lindner S.N., Wendisch V.F. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products // Computational and structural biotechnology journal. – 2012. – V. 3. – No. 4. – P. e201210004.

225. Zhang Y., Shang X., Lai S., Zhang G., Liang Y. and Wen T. Development and application of an arabinose-inducible expression system by facilitating inducer uptake in *Corynebacterium glutamicum* // App.and environmental microbiology. – 2012 – V. 78. – P. 5831-5838.

226. Zupancic T., Kitte J.D., Baker B.D., Miller C.J., Palmer D.T., Asai Y., Inui M., Vertes A., Kobayashi M., Kurusu Y., Yukawa H. Isolation of promoters from *Brevibacterium flavum* strain MJ233C and comparison of their gene expression levels in

B. flavum and Escherichia coli // FEMS microbiology letters. – 1995. – V. 131. – №. 2. – P. 121-126

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне признателен д.б.н., профессору Лившицу В.А. за доброе отношение и постоянную поддержку при выполнении данной работы. Автор также благодарит к.б.н. Йомантаса Ю.А.В. и к.б.н. Абалакину Е.Г. за обучение и плодотворную совместную работу по разработке системы интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому метилотрофной бактерии *Methylophilus methylotrophus* AS-1 на основе системы транспозиции фага Mu. Также автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Гаку Е. Р. и к.б.н. Токмаковой И.Л., совместно с которыми была продолжена работа по совершенствованию разработанной системы интеграции/ амплификации в геном *Methylophilus methylotrophus* AS-1 и начато исследование возможности транспозиции Mu бактериофага в геноме грамположительной бактерии *C. glutamicum* АТСС 13869. Автор благодарит к.б.н. Смирнова С. В. и к.б.н. Крылова А. А. за плодотворное обсуждение результатов и сотрудничество в написании статьи. Автор признателен также Оводовой Ю.А., Плехановой Н.С., Лобановой Ю.С. за оказание практической помощи на этапе выполнения данной работы, поддержку и дружескую атмосферу.

Особую благодарность автор выражает своему руководителю д.б.н., профессору Машко С.В. за мудрое руководство и советы, способствовавшие выполнению данной диссертационной работы.