

На правах рукописи

ЛОБАНОВА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

**Разработка эффективных методов конструирования
бесплазмидных рекомбинантных штаммов коринебактерий на
основе элементов бактериофагов**

1.5.7 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в Лаборатории №4 Акционерного Общества «научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»)

Научный руководитель:

Горшкова Наталья Васильевна,
кандидат биологических наук,
научный сотрудник АО «АГРИ»,
г. Москва

Официальные оппоненты:

Каратаев Геннадий Иванович,
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
руководитель лаборатории генетики бактерий;
Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи
г. Москва

Яненко Александр Степанович,
доктор биологических наук, профессор;
руководитель Курчатовского комплекса генетических
исследований (ККГИ)-ГосНИИгенетика;
Национальный исследовательский центр Курчатовский институт
г. Москва

Ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д 002214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2022 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Горячева И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы

Corynebacterium glutamicum, грамположительная почвенная бактерия, впервые выделенная в ходе поисков природного продуцента L-глутамата (Kinoshita et al, 1957), в настоящее время стала важным микроорганизмом крупномасштабной промышленной биотехнологии. *C. glutamicum* является ценным объектом для промышленности, поскольку сочетает в себе уникальные преимущества: гибкий клеточный метаболизм, высокая стрессоустойчивость к источнику углерода и целевому продукту, способность к поддержанию метаболической активности в условиях задержки роста, устойчивость к ингибиторам ферментации и генетическая стабильность (Lee et al, 2016). Этот микроорганизм признан безопасным и имеет статус GRAS.

В настоящее время *C. glutamicum* широко используется в производстве различных веществ от биотоплива и полимеров до кормовых добавок и ценных соединений пищевого и фармацевтического назначения (Becker et al, 2018).

Благодаря успешному применению *C. glutamicum* в биотехнологии непрерывно возрастает потребность в штаммах с желаемыми производственными свойствами, в связи с чем разработка новых удобных и эффективных методов для редактирования генома *C. glutamicum* не утратила своей актуальности и по сей день.

Как правило, при конструировании штаммов-продуцентов возникает необходимость в увеличении дозы природных генов, обеспечивающих биосинтез целевого продукта, либо введении гетерологичных генов/оперонов, осуществляющих новый путь биосинтеза, или утилизацию ранее не ассимилируемых субстратов.

Введение дополнительных генов/копий генов в коринебактерии возможно в составе плазмид. Однако их наличие в клетках может существенно влиять на клеточный метаболизм или создавать сложности, вызванные их сегрегационной нестабильностью. Помимо прочего, существует ряд законодательных ограничений на использование штаммов,

содержащих плазмиды, кодирующие детерминанты антибиотической устойчивости.

Таким образом, разработка генно-инженерного инструментария для интеграции гетерологичной ДНК в хромосому *C. glutamicum* с целью получения бесплазмидных безмаркерных штаммов-продуцентов является актуальной и практически значимой задачей. Интеграция целевой ДНК в геном *C. glutamicum* может быть осуществлена посредством RecA-зависимой системы гомологичной рекомбинации или с использованием «Рекомбиниринга», основанного на RecET Рас профага *Escherichia coli*. Также возможно введение фрагментов ДНК в составе интегративных векторов на основе элементов фаговых систем сайт-специфической рекомбинации (Oram et al, 2007). Интеграция в случайные места генома *C. glutamicum* может быть осуществлена в составе транспозона либо с помощью адаптированной системы транспозиции бактериофага Mu (Gorshkova et al, 2018).

Поскольку каждая система имеет свои преимущества и недостатки нам представлялось актуальным продемонстрировать объединение нескольких систем в одной стратегии, что позволило бы использовать преимущества и нивелировать недостатки каждой из систем. В данной работе мы представляем метод для введения целевых генов/оперонов в предварительно выбранные участки хромосомы *C. glutamicum* с помощью адаптированной нами стратегии Dual-In/Out, первоначально разработанной в АО «АГРИ» для *E. coli* (Minaeva et al, 2008). Предложенный нами метод также позволяет осуществлять последующее объединение полученных инсерций в одном штамме посредством электротрансформации геномной ДНК.

1.2. Цели и задачи работы

Целью настоящей диссертационной работы являлась разработка нового генно-инженерного подхода направленной модификации генома *C. glutamicum* для создания безмаркерных бесплазмидных рекомбинантных штаммов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести поиск новых фаговых генетических элементов для модификации генома *C. glutamicum*

2. Разработать метод прецизионной интеграции генетического материала на основе Dual-In/Out стратегии для конструирования бесплазмидного безмаркерного рекомбинантного штамма *S. glutamicum*
 - Разработать генно-инженерный инструментарий на основе сайт-специфической системы рекомбинации коринефага $\phi 16$
 - Сконструировать элементы на основе сайт-специфической системы рекомбинации Cre/lox фага P1 *E.coli*
 - Сконструировать элементы на основе RecET-зависимой системы гомологичной рекомбинации Rac профага *E.coli* для создания искусственных attB $_{\phi 16}$ -сайтов
 - Протестировать возможность переноса маркированных модификаций методом электротрансформации геномной ДНК
3. Продемонстрировать применение разработанного метода

1.3. Научная новизна и практическая ценность работы

Разработан новый генно-инженерный подход для направленной модификации генома *S. glutamicum*, позволяющий осуществлять интеграцию целевых генов/оперонов в бактериальную хромосому. Разработанный метод обеспечивает возможность прецизионного дизайна всех планируемых модификаций и является удобным и эффективным инструментом для создания бесплазмидных безмаркерных рекомбинантных штаммов на основе *S. glutamicum*.

С целью поиска новых фаговых генетических элементов для модификации генома *S. glutamicum* три новых коринефага $\phi 673$, $\phi 674$ и $\phi 16$ были охарактеризованы морфологически, а их геномы впервые полностью секвенированы и частично аннотированы.

На основе идентифицированных элементов сайт-специфической системы рекомбинации коринефага $\phi 16$ был сконструирован генно-инженерный инструментарий, используя подход «self-cloning».

Была продемонстрирована способность укороченного варианта экзонуклеазы RecE⁵⁶⁴ совместно с полноразмерной рекомбиназой RecT Rac профага осуществлять интеграцию вырезаемого маркера, фланкированного attL/R $_{\phi 16}$ -сайтами.

Отдельные генно-инженерные инструменты на основе RecE⁵⁶⁴T-зависимой гомологичной и двух сайт-специфических систем рекомбинации коринефага $\phi 16$ и Cre/lox фага P1 были объединены в стратегию Dual-In/Out для конструирования безмаркерного рекомбинантного штамма *C. glutamicum*.

Впервые была продемонстрирована возможность переноса маркированных инсерций, расположенных в локусах, предварительно идентифицированных с помощью Mu-зависимой системы транспозиции, методом электротрансформации геномной ДНК в *C. glutamicum*.

Была выявлена взаимосвязь между точками, выбранными Mu-зависимой системой для межмолекулярной транспозиции, и способностью этих локусов к эффективной RecA-зависимой гомологичной рекомбинации.

Показана возможность переноса модификаций, сконструированных в произвольно выбранных точках хромосомы, посредством электротрансформации геномной ДНК в условиях RecE⁵⁶⁴T экспрессии.

Разработанный метод был успешно применен в АО «АГРИ» для конструирования промышленных штаммов-продуцентов.

1.4. Положения, выносимые на защиту

1. Два вирулентных фага $\phi 673$, $\phi 674$ *C. glutamicum* ATCC 13032 и умеренный бактериофаг $\phi 16$ *C. glutamicum* ATCC 21792 были охарактеризованы морфологически, а их геномы впервые полностью секвенированы и аннотированы.

2. Разработан генно-инженерный инструментарий на основе сайт-специфической системы рекомбинации фага $\phi 16$ для интеграции целевых генов в хромосому.

3. Доказана способность укороченного варианта экзонуклеазы RecE⁵⁶⁴ совместно с полноразмерной рекомбиназой RecT Рас профага *E. coli* осуществлять рекомбинацию между дц линейным фрагментом ДНК и кольцевой хромосомой *C. glutamicum*.

4. Была адаптирована стратегия Dual-In/Out для прецизионной интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *C. glutamicum*.

5. Была впервые продемонстрирована возможность переноса маркированных модификаций методом электротрансформации геномной ДНК в *C. glutamicum*.

6. Было установлено, что эффективность переноса модификаций может быть существенно увеличена в условиях RecE⁵⁶⁴T экспрессии.

Публикации и апробации работы

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, все 3 в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы диссертации докладывались на конкурсе работ сотрудников АО «АГРИ» (2015, 2017, 2018), были представлены в постерном сообщении на конференции «5th Applied Synthetic Biology in Europe» (Делфт, Нидерланды, ноябрь 2020). Апробация работы проводилась на межлабораторном семинаре АО «Научно-исследовательского Института Аджиномото-Генетика».

Структура и объем работы

Диссертация состоит из 6 разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Работа изложена на 145 страницах, включая 21 рисунка и 4 таблицы. Список цитируемой литературы содержит 251 источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Бактериофаги

1.1. Характеристика новых литических фагов $\phi 673$ и $\phi 674$ *C. glutamicum* ATCC 13032

Геномы двух новых фагов $\phi 673$ и $\phi 674$ *C. glutamicum* ATCC 13032, полученные из ВКПМ коллекции, были впервые секвенированы и аннотированы (GenBank: MG324353, MG324354). Электронно-микроскопические исследования обоих вирионов показали, что таксономически они принадлежат к семейству *Siphoviridae* и имеют многогранную головку шириной 50 нм и несокращающийся хвостовой отросток длиной 250 нм (Рисунок 1).

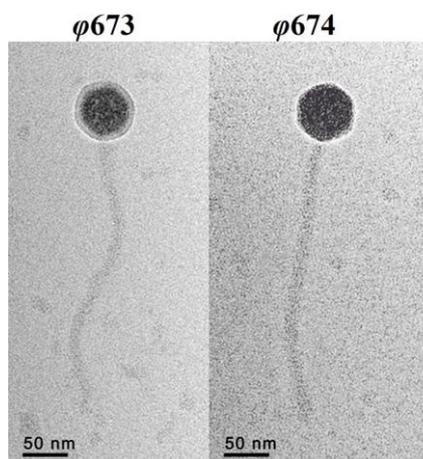


Рисунок 1 – Электронная микрофотография $\phi 673$ и $\phi 674$. Бар, 50 нм

Геномы $\phi 673$ и $\phi 674$ представлены линейными двухцепочечными молекулами ДНК длиной 44530 п. н. ($G+C = 51,1\%$) и 43193 п. н. ($G+C = 50,7\%$) с идентичными 3'-выступающими липкими концами, состоящими из 13 нуклеотидов. Геномы фагов $\phi 673$ и $\phi 674$ демонстрировали высокую степень гомологии (85,2% идентичности). Два основных структурных белка каждого вириона, основной белок капсида ($gp_{\phi 673 5}$ и $gp_{\phi 674 5}$) и основной белок хвоста ($gp_{\phi 673 11}$ и $gp_{\phi 674 11}$), были обнаружены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и идентифицированы посредством масс-спектрометрического метода анализа.

На основании биоинформатического анализа было предсказано 56 и 54 ORF для $\phi 673$ и $\phi 674$, соответственно (Рисунок 2). Основываясь на гомологии с известными фаговыми белками, наличии функциональных

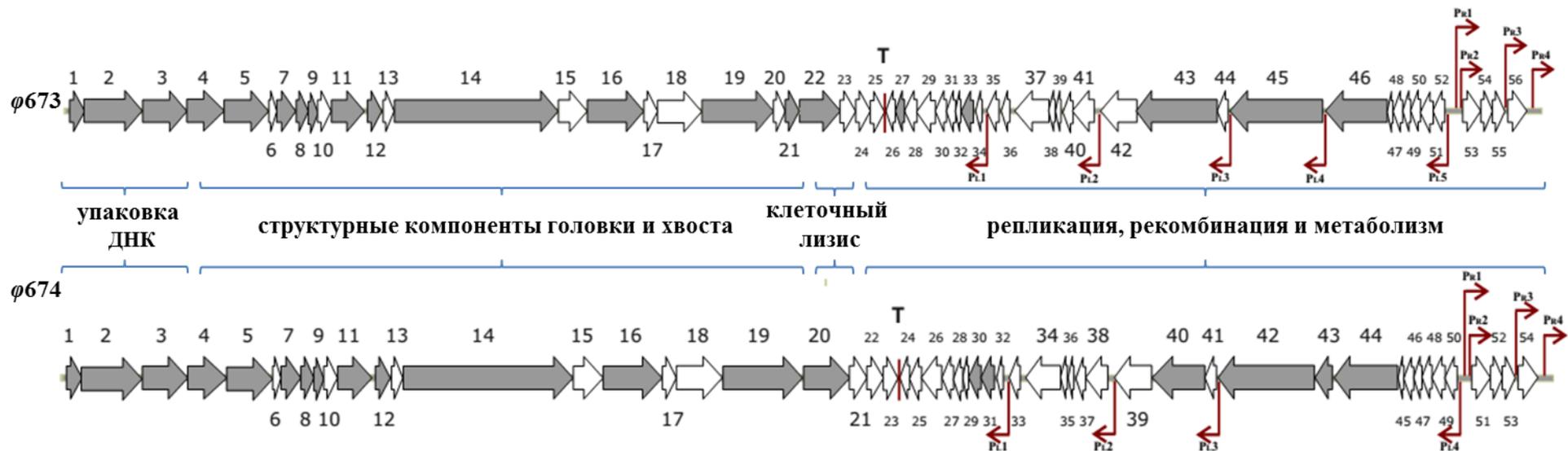


Рисунок 2 – Геномная организация фагов $\phi 673$ и $\phi 674$. ORF пронумерованы последовательно слева направо и указаны стрелками в направлении транскрипции. ORF, кодирующие белки, которым назначены известные биологические функции, изображены темными стрелками, а те, которые не имеют известной функции, - светлыми. Открытые рамки считывания, соединенные скобками, обозначают предполагаемые функциональные модули в фаговых геномах. Модуль упаковки ДНК: малая ($gr_{\phi 6731}$ и $gr_{\phi 6741}$) и большая ($gr_{\phi 6732}$ и $gr_{\phi 6742}$) субъединицы терминазы, порталный белок ($gr_{\phi 6733}$ и $gr_{\phi 6743}$). Модуль структурных компонентах головки и хвоста: протеаза созревания головки ($gr_{\phi 6734}$ и $gr_{\phi 6744}$), основные белки капсида и хвоста ($gr_{\phi 6735}$, $gr_{\phi 6745}$ и $gr_{\phi 67311}$, $gr_{\phi 67411}$), белки соединяющие головку и хвост ($gr_{\phi 6737}$, 8, 9 и $gr_{\phi 6747}$, 8, 9), шаперон сборки хвоста ($gr_{\phi 67312}$ и $gr_{\phi 67412}$), белок хвостовой рулетки ($gr_{\phi 67314}$ и $gr_{\phi 67414}$), белок хвоста ($gr_{\phi 67316}$ и $gr_{\phi 67416}$) и белок хвостовой фибриллы ($gr_{\phi 67319}$, 21 и $gr_{\phi 67419}$). Модуль клеточного лизиса: лизоцимоподобный белок ($gr_{\phi 67322}$ и $gr_{\phi 67420}$). Модуль репликации, рекомбинации и метаболизма: хеликаза ($gr_{\phi 67343}$ и $gr_{\phi 67440}$), белок репликации ДНК RepA праймаза/хеликаза ($gr_{\phi 67345}$ и $gr_{\phi 67442}$), ДНК-полимераза I ($gr_{\phi 67346}$ и $gr_{\phi 67444}$) и эндонуклеаза HNH ($gr_{\phi 67333}$ и $gr_{\phi 67430}$, 31, 43), регулятор транскрипции ($gr_{\phi 67327}$). Положения и направления промоторов указаны тонкими стрелками, а внутренние терминаторы обозначены прямоугольниками

доменов и взаимном расположении, предполагаемые биологические функции были приписаны продуктам 20 предсказанных ORF в каждом фаге. Геномы обоих фагов были разделены на четыре функциональных модуля: упаковка ДНК, структурные компоненты головки и хвоста, клеточный лизис и модуль репликации, рекомбинации и метаболизма. Девять и восемь предполагаемых промоторов было предсказано в геномах $\phi 673$ и $\phi 674$, соответственно. Один идентичный двунаправленный Rho-независимый терминатор транскрипции идентифицирован в геноме обоих фагов. Несмотря на то, что оба фага не содержали генов сайт-специфической системы рекомбинации, являясь вирулентными, некоторые идентифицированные регуляторные элементы, такие как промоторы и терминатор, использовались в этой и других работах, проводимых в нашем институте.

1.2. Характеристика умеренного коринефага $\phi 16$

В текущей работе умеренный фаг $\phi 16$, индуцированный из природного лизогена *S. glutamicum* ATCC 21792 (Moreau et al, 1995), был охарактеризован морфологически, а его геном впервые полностью секвенирован и частично аннотирован (GenBank:KY250482). Электронно-микроскопическое исследование вириона $\phi 16$ подтвердило его принадлежность к семейству *Siphoviridae* (Рисунок 3). Фаг имеет гексагональной формы головку 73 нм в диаметре и несокращающийся хвостовой отросток толщиной 14 нм и длиной 336 нм.

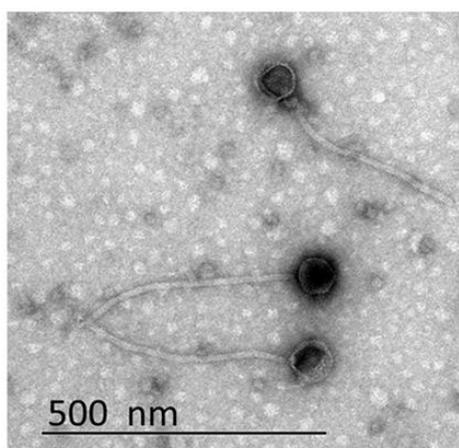


Рисунок 3 – Электронная микрофотография фага $\phi 16$. Бар, 500 нм

Геном $\phi 16$ представлен одной линейной двухцепочечной молекулой ДНК длиной 58200 п. н. (G+C = 52,2%) с 3'- выступающими липкими

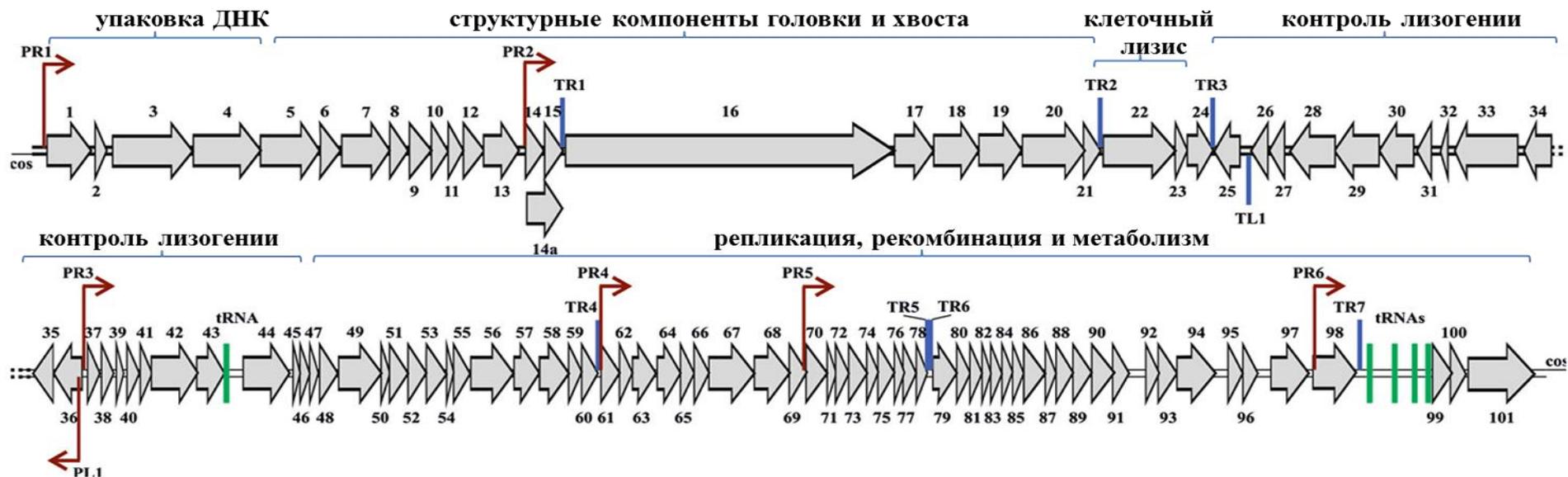


Рисунок 4 – Структурная организация генома фага $\phi 16$. ORF(s) пронумерованы последовательно слева направо и обозначены стрелками (или треугольниками), указывающие направление транскрипции. ORF(s), объединенные скобками, относятся к одному функциональному модулю. Модуль упаковки ДНК: малая и большая субъединицы терминазы (gp2 и gp3, соответственно); Модуль структурных компонентов головки и хвоста: протеаза созревания головки (gp5), основные белки капсида (gp7) и хвоста (gp13), белок-рулетка (gp16), белок хвостовой фибриллы (gp20); Модуль клеточного лизиса: эндолизин (gp22), холин (gp23); Модуль контроля лизогении: интегразы (gp28), функциональная интегразы (gp33), белок исключаящий суперинфекцию (gp34), транскрипционный регулятор (gp36) и функциональная эксцизионаза (gp47). Модуль репликации, рекомбинации и метаболизма: ParB-подобной белок (gp42), HNH эндонуклеаза (gp52), регулятор транскрипции (gp56), белок связывания одноцепочечной ДНК (gp58), глутаредоксин (gp62), эндодезоксирибонуклеаза RusA (gp63), метилтрансфераза (gp64), белок, участвующий в разделении хромосом (gp68), олигорибонуклеаза (gp94) и АТФаза (gp101). Положение и направление промоторов указаны тонкими стрелками; внутренние терминаторы и тРНК изображены синими и зелеными прямоугольниками, соответственно

концами, состоящими из 14 нуклеотидов. Четыре основных структурных белка вириона были выявлены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и определены масс-спектрометрическим методом анализа как основные белки капсида (gp7) и хвоста (gp13) и два структурных белка с неизвестной функцией (gp6, gp12). С помощью биоинформатического анализа в геноме фага $\phi 16$ была предсказана 101 предполагаемая ORF и 5 генов тРНК (Lys (UUU), Arg (UCU), Asn (GUU), Tyr (GUA) и Trp (CCA)) (Рисунок 4). Только 27 продуктам предполагаемых генов была приписана биологическая функция. Геном фага $\phi 16$ был разделен на функциональные модули: упаковка ДНК, структурные компоненты головки и хвоста, клеточный лизис, контроль лизогении, а также модуль репликации, рекомбинации и метаболизма. Были предсказаны семь предполагаемых промоторов и восемь однонаправленных внутренних терминаторов транскрипции. В дополнение к ранее описанной интегразе (gp33) (Moreau et al, 1999) была идентифицирована эксцизионаза (gp47). В связи с чем, новый генно-инженерный инструментарий для *S. glutamicum* может быть разработан на основе сайт-специфической системы рекомбинации фага $\phi 16$.

2. Разработатка метода прецизионной интеграции генетического материала на основе Dual-In/Out стратегии для конструирования рекомбинантного штамма *S. glutamicum*

Поскольку недостающий генетический элемент, а именно, ген эксцизионазы фага $\phi 16$ был идентифицирован в результате проведенного исследования коринефагов, предлагаемая нами для *S. glutamicum* стратегия Dual-In/Out, состоящая из четырех этапов и приводящая к созданию бесплазмидных безмаркерных рекомбинантных штаммов, может базироваться на следующих системах: RecET-зависимой системе гомологичной рекомбинации λ рас фага *E. coli* и двух сайт-специфических системах: коринефага $\phi 16$ и Cre/loxP фага P1 *E. coli*.

2.1. Разработка генно-инженерного инструментария на основе сайт-специфической системы рекомбинации фага $\phi 16$

Для конструирования промышленных штаммов-производителей предпочтительно применять методы редактирования генома, основанные на

использовании природных генетических элементов данного микроорганизма либо близкородственного ему.

С целью создания генно-инженерного инструментария на основе элементов сайт-специфической системы рекомбинации коринефага $\phi 16$, используя подход «self-cloning», были сконструированы несколько плазмид: интегративная и две хелперные.

Интегративная плазида $pCRIM-Cm^R-attP_{\phi 16}$ (Рисунок 5) была сконструирована на базе репликона $p15a$ *E. coli*, содержала ген устойчивости к хлорамфениколу под контролем сильного фагового промотора P_{GAI} (Pátek et al, 1996), последовательность $attP$ фага $\phi 16$ (27583-27997, KY250482), а также сайт множественного клонирования (MCS), окруженный терминаторами T_{L3} , T_{674} .

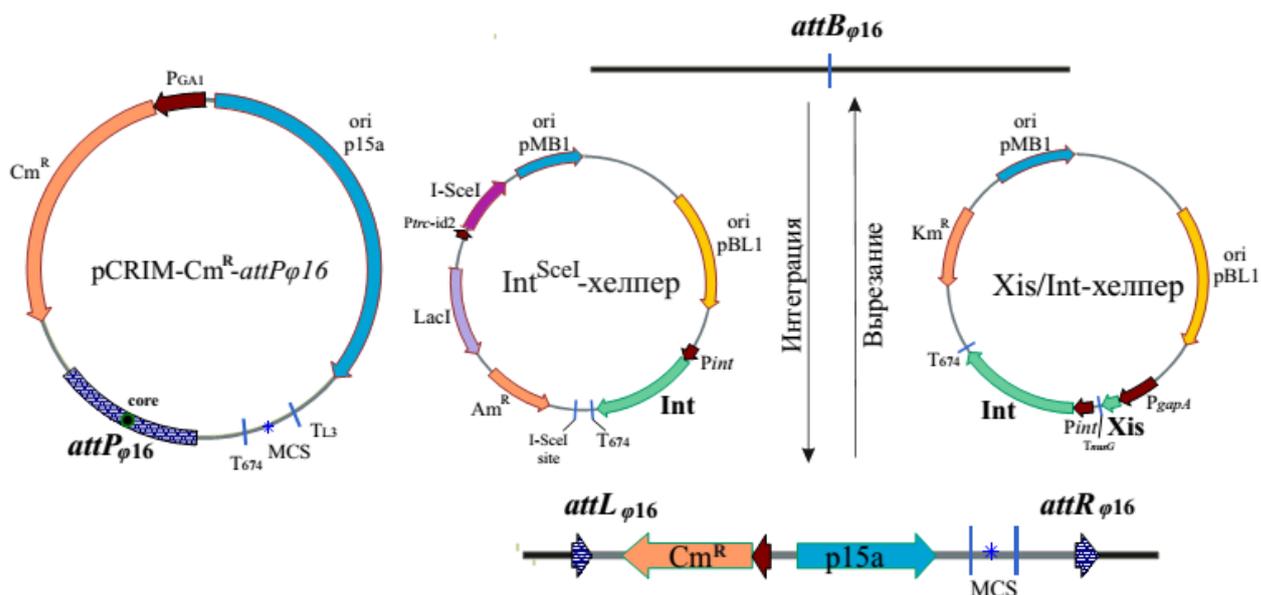


Рисунок 5 – Схематическое изображение генно-инженерного инструментария, разработанного на основе элементов сайт-специфической системы рекомбинации фага $\phi 16$

Для интеграции плазмиды $pCRIM-Cm^R-attP_{\phi 16}$ в $attB_{\phi 16}$ -сайт на хромосоме *S. glutamicum* была получена специальная плазида-помощник $pVC-Am^R-Int_{\phi 16}$ (Int-хелпер) на основе шаттл-вектора $pVC7N$ (Hashiro et al, 2019), которая содержала ген интегразы фага $\phi 16$ (ORF33) под контролем природного промотора (29085-29279, KY250482), а также ген устойчивости к апрамицину в качестве селективного маркера. Для облегчения процедуры излечения штаммов от вспомогательной плазмиды в рамках стратегии Dual-In/Out в состав Int-хелпера был клонирован ген мегануклеазы *I-SceI* под

контролем IPTG-индуцируемого $P_{trc-id2}(P_{trc}/O_{lac-id}-O_{lac})$ промотора (Скороходова и др, 2006), строго регулируемого LacI, и соответствующий сайт рестрикции. В результате чего была получена плаزمида pVC-Am^R-Int_{φ16}-SceI (Int^{SceI}-хелпер, ОК651222), способная к IPTG-индуцибельному самоэлиминированию (Рисунок 5).

Для осуществления сайт-специфического вырезания была сконструирована дополнительная хелперная плазмида pVC-Km^R-(Xis/Int)_{φ16} (Xis/Int-хелпер, ОК651223). Xis/Int-хелпер как и хелпер для интеграции был создан на основе вектора pVC7N, кодировал ген устойчивости к канамицину для прямого отбора трансформантов и, помимо гена интегразы φ16 (ORF33) под контролем природного промотора, содержал конститутивно экспрессирующийся с коринебактериального промотора P_{gapA} ген эксцизназы фага φ16 (ORF47) (Рисунок 5). При введении Xis/Int-хелпера в ранее полученный штамм с интегрированной pCRIM-Cm^R-attP_{φ16} плазмидой эффективность сайт-специфического вырезания составляла более 95% (95 Cm^S из 100 протестированных клонов).

Таким образом, был разработан удобный и эффективный генно-инженерный инструментарий на основе элементов сайт-специфической системы рекомбинации фага φ16, состоящий из одной интегративной и двух хелперных плазмид (Рисунок 5).

2.2. Конструирование элементов Cre-зависимой системы сайт-специфической рекомбинации фага P1

Для дальнейшего применения pCRIM-Cm^R-attP_{φ16} плазмиды в рамках Dual-In/Out стратегии в нее были введены два рекомбинантных *lox*-сайта (*lox66/71*) для последующего Cre-зависимого вырезания маркированной векторной части из хромосомы бактерии. Вновь полученная модифицированная плазмида pCRIM-Cm^R-*lox*-attP_{φ16} (Рисунок 6А) была интегрирована в природный *attB*_{φ16} с помощью Int^{SceI}-хелпера. Cre-опосредованное вырезание осуществлялось с помощью вспомогательной плазмиды p06-Km^R-P_{dapA}-Cre, представленной на Рисунке 6Б (Cre-хелпер, ОК651224). Cre-хелпер являлся Km^R производным ранее описанной плазмиды p06-Cm^R-P_{dapA}-Cre (Gorshkova et al, 2018), которая была сконструирована на нестабильном варианте репликона pCG1 *C. glutamicum*, а также содержала репликон p15a *E.coli*, ген устойчивости к канамицину и

ген *cre* рекомбиназы фага P1 под контролем конститутивного коринебактериального промотора P_{dapA} средней силы. В штамм с ранее интегрированной $pCRIM-Cm^R-lox-attP_{\phi 16}$ плазмидой был введен Cre-хелпер. Эффективность Cre-зависимого вырезания маркированной векторной части, окруженной *lox66/71* сайтами, составила более 97% (97 Cm^S из 100 протестированных клонов). Таким образом, были сконструированы элементы на основе сайт-специфической системы Cre/*lox* фага P1 (Рисунок 6).

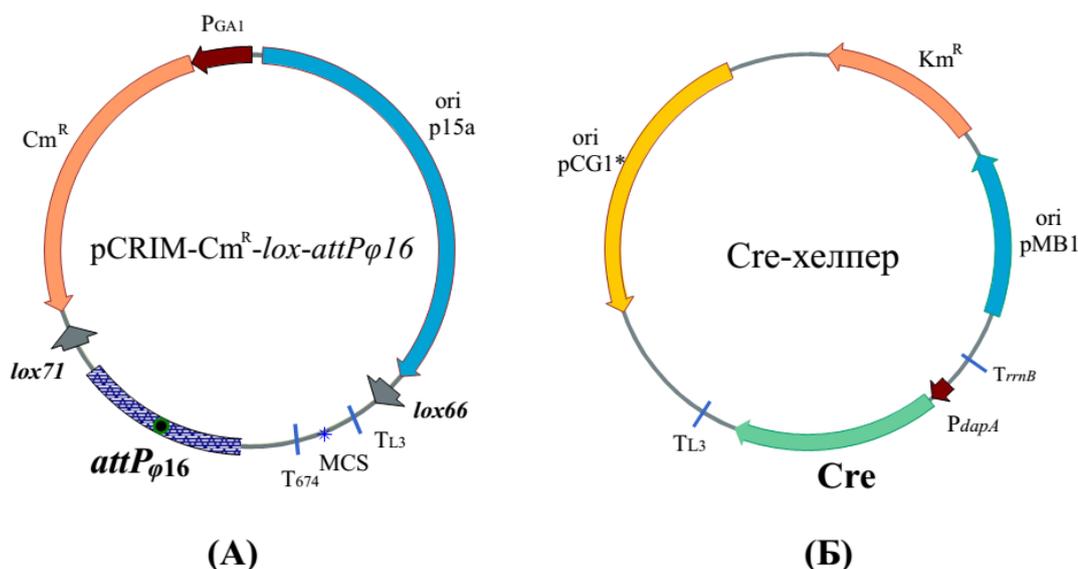


Рисунок 6 – Схемы плазмид $pCRIM-Cm^R-lox-attP_{\phi 16}$ (А) и Cre-хелпера (Б)

2.3. Конструирование элементов RecET-зависимой системы гомологичной рекомбинации для создания искусственных $attB_{\phi 16}$ -сайтов в *C. glutamicum*

В предлагаемой нами стратегии интеграцию маркированного предшественника $attB_{\phi 16}$ -сайта в составе линейного фрагмента предполагалось осуществлять при помощи RecET-зависимой системы рекомбинации λ с профага *E. coli*. Возможность RecET-опосредованной рекомбинации между целевым хромосомным локусом и линейным фрагментом ДНК (с плечами гомологии 800-1000 п. н.) была ранее продемонстрирована в *C. glutamicum* (Huang et al, 2017; Luo et al, 2021; Li et al, 2021). Стоит отметить, что во всех приведенных работах использовался только полноразмерный ген *recE* профага λ с, кодирующий белок длиной 866 ак. о., наряду с геном *recT*.

В настоящем исследовании укороченный вариант белка $RecE^{564}$ впервые был использован для осуществления рекомбинации в *C. glutamicum*.

Решение использовать укороченный вариант RecE было основано на стремлении устранить часть гетерологичного гена с неоптимальной для *Corynebacteria* трансляцией в области 367-433 ак. о. (по данным инструмента %MinMax (Rodrigues et al, 2018)), но при этом сохранить специфическую рекомбинирующую активность, характерную для полноразмерного RecE (Fu et al, 2012). RecE⁵⁶⁴, являясь наиболее «длинным» из описанных ранее укороченных производных RecE (например, RecE⁵⁸⁸, RecE⁵⁹⁵, RecE⁶⁰², RecE⁶⁰⁶ (Zhang et al, 1998; Muuyers et al, 2000; Fu et al, 2012)), однозначно должен был сохранить *exo* VIII нуклеазную активность, связанную с экзонуклеазным доменом, охватывающим последние 260 аминокислот на С-конце RecE (Chu et al, 1989; Zhang et al, 2009).

Таким образом, была сконструирована вспомогательная плазида pVC-Am^R-LacI-P_{trc-id2}-RecE⁵⁶⁴T, представленная на Рисунке 7А (RecET-хелпер, ОК651221). RecET-хелпер был создан на основе вышеупомянутого шатл-вектора pVC7N и содержал ген устойчивости к апрамицину в качестве селективного маркера. RecET-хелпер экспрессировал укороченный вариант гена экзонуклеазы RecE (Chu et al, 1989; Zhang et al, 2009), содержащий в дополнение к стартовому Met кодону только 564–866 ак. о. полноразмерного белка (Zhang et al, 2009), а также полноразмерный ген RecT Рас профага *E. coli*. Экспрессия обоих генов, стоящих в опероне, находилась под контролем IPTG-индуцируемого P_{trc-id2} промотора (Скорородова и др, 2006), строго регулируемого LacI.

С целью создания искусственных *attB*_{φ16}-сайтов в выбранных участках хромосомы посредством RecET-зависимой гомологичной рекомбинации был разработан дизайн линейных фрагментов (Рисунок 7Б). Линейный фрагмент содержал окруженный терминаторами T_{L3} и T₆₇₄ маркер устойчивости к антибиотику, фланкированный *attL/R*_{φ16} рекомбинантными сайтами для последующего вырезания, и плечи гомологии длиной 0,8 т. п. н. В качестве матрицы для амплификации центральной части линейного фрагмента была использована одна из двух специально сконструированных плазмид pUCIDT-Ap^R-L-Cm^R-R или pUCIDT-Ap^R-L-Sm^R-R, не способных реплицироваться в *S. glutamicum* (ОК651225, ОК651226). Для сборки линейного фрагмента центральная часть, содержащая маркер, была объединена с плечами гомологии с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами.

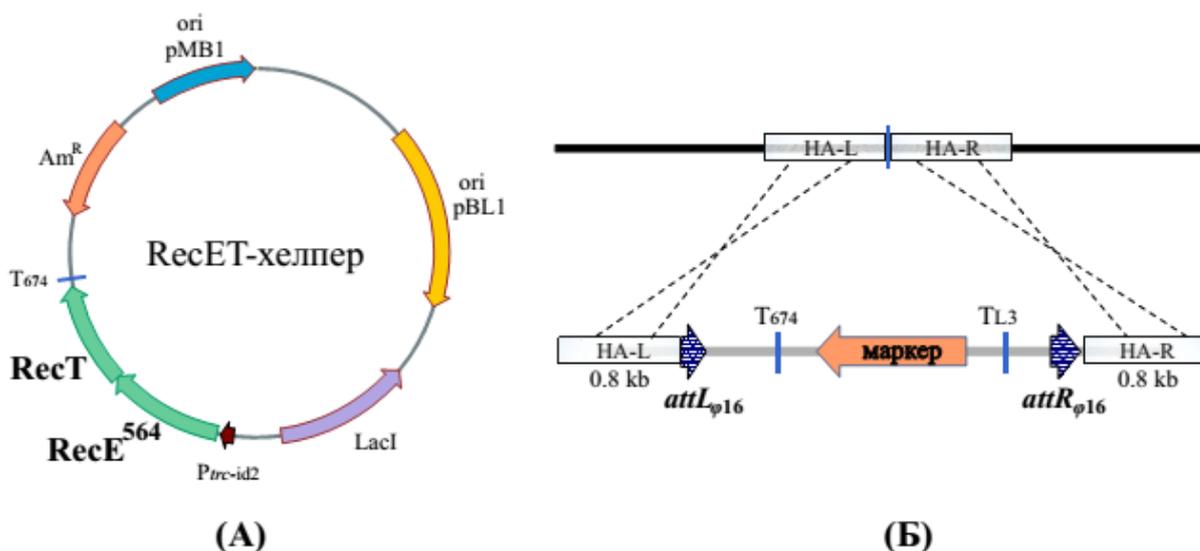


Рисунок 7 – Схематическое изображение RecET-хелпера (А) и линейного фрагмента для создания искусственного $attB_{\phi 16}$ -сайта (Б)

В результате были получены три линейных фрагмента, условно обозначенные как **ds#542Sm**, **ds#1741Sm** и **ds#1865Sm**, нацеленные на разные участки хромосомы, интеграция в которые не приводила к гибели клетки. В названии точки интеграции было отражено ее положение в геноме относительно ориджина репликации, так, например, точка **#542** находилась на расстоянии 542 т. н. п. от старта репликации. Точные координаты были представлены в **Таблице 1**. Интеграция всех линейных фрагментов, используемых в данном исследовании, производилась «в точку» между двумя соседними нуклеотидами, то есть не сопровождалась удалением или заменой какой-либо нуклеотидной последовательности.

Для осуществления интеграции *C. glutamicum* 13869, содержащий RecET-хелпер, был электропорирован линейными фрагментами, в результате чего были получены три независимых штамма (**13869#542::Sm**, **13869#1741::Sm** и **13869#1865::Sm**), содержащие вырезаемый маркер в соответствующих точках хромосомы. В проведенных нами экспериментах тестируемый RecET-хелпер успешно осуществлял рекомбинацию между линейными фрагментами и кольцевой хромосомой *C. glutamicum* с частотой $\approx 6,8 \times 10^{-6}$ (≈ 750 клонов / 2 мкгДНК / $1,1 \times 10^8$ клеток, выживших после электропорации). Результаты настоящего исследования однозначно подтверждают возможность использования укороченного RecE⁵⁶⁴ совместно с RecT в *C. glutamicum* для осуществления гомологичной рекомбинации, как

минимум, между линейным фрагментом (с длиной гомологичных плеч 800 п. н.) и кольцевой бактериальной хромосомой.

2.4. Конструирование искусственных $attB_{\phi 16}$ -сайтов и проверка их функциональности

Для создания искусственных $attB_{\phi 16}$ в качестве «платформ» для последующей интеграции три ранее полученные штамма, содержащие маркер, фланкированный $attL/R_{\phi 16}$ -сайтами (**13869#542::Sm**, **13869#1741::Sm** и **13869#1865::Sm**), были электропорированы Xis/Int-хелпером. Эффективность вырезания маркера составила более 95% во всех трех случаях и была равна эффективности вырезания интегративной плазмиды из нативного $attB_{\phi 16}$ -сайта, что однозначно подтверждает функциональность тестируемых $attL/R_{\phi 16}$ рекомбинантных сайтов. Таким образом, каждый из полученных штаммов **13869#542::B**, **13869#1741::B** и **13869#1865::B** содержал два $attB_{\phi 16}$ -сайта: один природный и один искусственно созданный.

Чтобы продемонстрировать возможность интеграции во вновь созданные искусственные $attB_{\phi 16}$ -сайты штаммы **13869#542::B**, **13869#1741::B** и **13869#1865::B**, содержащие Int^{SceI} -хелпер, были электропорированы интегративной плазмидой pCRIM-Cm^R-*lox-attP* _{$\phi 16$} . Во всех трех штаммах примерно в 80% случаев плазида встраивалась с равной вероятностью в один из двух $attB_{\phi 16}$ -сайтов, а остальные 20% клонов содержали плазмиду, интегрированную сразу в оба сайта. Этот факт однозначно подтверждает равнозначность природного и искусственно созданных $attB_{\phi 16}$ -сайтов для сайт-специфической интеграции.

2.5. Проверка возможности переноса маркированных инсерций методом электротрансформации геномной ДНК в *C. glutamicum*

Использование стратегии Dual-In/Out также подразумевает возможность применения принципа «строительных блоков» для удобного и быстрого конструирования штамма. Принцип предполагает создание библиотеки штаммов с различным расположением искусственных $attB_{\phi 16}$ -сайтов и набора интегративных плазмид с целевыми кассетами. Таким образом, любая кассета может быть интегрирована в любой $attB_{\phi 16}$ -сайт из библиотеки, а локализованные в разных положениях кассеты из параллельно сконструированных штаммов могут быть объединены в один. Следовательно,

необходимо было разработать удобный метод переноса интегрированных кассет в *C. glutamicum*.

Двумя основными методами переноса мутаций в генной инженерии бактерий являются общая трансдукция и электротрансформация геномной ДНК. В связи с отсутствием известных трансдуцирующих коринебактериальных фагов в данной работе была протестирована возможность переноса маркированных инсерций в *C. glutamicum* методом электротрансформации геномной ДНК.

Для этого геномная ДНК была выделена из трех Sm^R штаммов, ранее полученных с помощью RecE⁵⁶⁴T-зависимой интеграции маркера в точки **#542**, **#1741**, **#1865**. Кроме того, для увеличения числа тестируемых точек с целью получения более достоверной статистики геномная ДНК была также извлечена из еще трех Sm^R штаммов, заложенных в нашей лабораторной коллекции. Каждый из штаммов лабораторной коллекции был получен в результате Mu-зависимой транспозиции в *C. glutamicum* ATCC 13869, содержащий одну копию mini-Mu(LER) единицы в различных положениях (**#258**, **#1883** и **#2123**). В качестве реципиента для переноса маркированных модификаций был использован Sm^R штамм **13869B::L-pCRIM-Cm-R** для исключения эффекта контаминации. В качестве отрицательного контроля была использована геномная ДНК, выделенная из интегранта, содержащего сразу две копии mini-Mu(LER) кассеты (клон № 10) в результате межмолекулярной амплификации (Gorshkova et al, 2018). В связи с чем, хромосомный участок, расположенный между двумя mini-Mu единицами был развернут, что означало отсутствие нормальных плеч для прохождения рекомбинации. Трансформанты отбирались на чашках с двумя антибиотиками Cm и Sm (устойчивость к Sm обеспечивалась донорной хромосомной ДНК, а устойчивость к Cm кодировалась штаммом-реципиентом). В результате все три mini-Mu единицы, интегрированные в точки **#258**, **#1883** и **#2123**, были успешно перенесены методом электротрансформации геномной ДНК в отличие от трех маркеров, расположенных в произвольно выбранных точках (**#542**, **#1741** и **#1865**) (Таблица 1). Помимо прочего, хромосома штамма **13869B::L-pCRIM-Cm-R**, служившего реципиентом в первом эксперименте, была выделена, и

модификация была успешно перенесена в реципиентный штамм **13869#258::mini-Mu(LER)**, содержащий одну Sm^R копию mini-Mu единицы.

Таблица 1 - Библиотека маркированных точек и эффективность их переноса посредством хромосомной электротрансформации

Точка #	Интегрированная кассета	Позиция в геноме	Эффективность переноса (клонов/20мкг ДНК/10 ⁸ клеток)
<i>C. glutamicum</i> ATCC13869 (GenBank AP017557.2)			
#2483 (<i>attB</i> _{ϕ16})	L-pCRIM-Cm-R (2.6 т. п. н.)	2,483,498- 2,483,526	648±73
#542	L-Sm-R (1.8 т. п. н.)	542,642	0±0
#1741		1,741,544	0±0
#1865		1,865,443	0±0
#35	mini-Mu(LER), Sm ^R (3.7 т. п. н.)	35,028	415±42
#198		198,108	16±3
#209		209,618	381±64
#258		258,090	98±18
#400		400,172	564±94
#668		668,996	676±102
#1213		1,213,827	638±96
#1275		1,275,483	487±68
#1883		1,883,247	429±62
#2123		2,123,379	349±58
#484		L-Cm-R (1.4 т. п. н.)	484,726
#2370	2,370,010		527±56
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 (GenBank NC003450.3)			
#2565 (<i>attB</i> _{ϕ16})	L-pCRIM-Cm-R (2.6 т. п. н.)	2,565,640- 2,565,668	376±62
#177	mini-Mu(LER), Sm ^R (3.7 т. п. н.)	177,343	210±31
#544		544,701	7±3
#657		657,238	24±4
#2020		2,020,649	16±7
#2393		2,393,647	120±19
#3244		3,244,425	14±5
<i>C. glutamicum</i> MB001 (GenBank CP005959.1)			
#2333 (<i>attB</i> _{ϕ16})	L-pCRIM-Cm-R (2.6 т. п. н.)	2,333,853- 2,333,881	548±83
#190	mini-Mu(LER), Sm ^R (3.7 т. п. н.)	190,010	15±6
#837		837,920	36±10
#1128		1,128,498	121±19
#1320		1,320,683	30±6
#1540		1,540,151	593±80
#2684		2,684,273	470±66

Стало очевидно, что не все участки хромосомы способны к эффективной RecA-зависимой рекомбинации в *C. glutamicum*. Эксперимент также выявил закономерность, что кассеты расположенные в точках,

выбранных Mu-зависимой системой транспозиции, были успешно перенесены методом электротрансформации геномной ДНК.

2.6. Создание библиотеки mini-Mu интегрантов в *C. glutamicum*

Для подтверждения гипотезы, что mini-Mu единицы, явившиеся результатом первичной межмолекулярной Mu-зависимой транспозиции, могут быть перенесены с достаточной эффективностью, было решено расширить выборку тестируемых точек. С этой целью была осуществлена Mu-зависимая интеграция mini-Mu единиц в *C. glutamicum* ATCC 13869. Интеграция была выполнена с использованием интегративной плазмиды pAN-mini-Mu(LER)-YS (MG014200) и хелпера для Mu-транспозиции pVK-lacI^Q-P_{tac}-MuAB (MG014199).

После осуществления Mu-зависимой интеграции и последующего разрешения коинтеграторов геномная ДНК была выделена из семи случайных Sm^R Km^S независимых клонов, несущих mini-Mu единицу в различных положениях на хромосоме (Таблица 1). Определение точек интеграции mini-Mu транспозона в хромосоме *C. glutamicum* было проведено согласно описанному протоколу (Gorshkova et al, 2018), точные координаты были представлены в Таблице 1. Выделенная геномная ДНК была электропорирована в реципиентный штамм **13869B::L-pCRIM-Cm-R**. Аналогично предыдущим экспериментам клоны были отобраны на чашке с двумя антибиотиками. Как и предполагалось, все тестируемые маркированные mini-Mu единицы были успешно перенесены методом электротрансформации геномной ДНК. Однако эффективность переноса существенно различалась в зависимости от конкретной точки и варьировалась в диапазоне 16-670 колоний на 20 мкг геномной ДНК и 10⁸ выживших после электротрансформации клеток (Таблица 1). Отрицательный контроль (без добавления геномной ДНК) содержал только 1-3 спонтанных Sm^R клон. Кроме того, аналогичные библиотеки штаммов, полученные с помощью Mu-зависимой транспозиции, были созданы для таких важных промышленных штаммов как *C. glutamicum* ATCC13032 (NC003450.3) и MB001 (CP005959.1) (Таблица 1). Для каждого штамма библиотека была представлена шестью клонами, содержащими маркированные mini-Mu единицы, интегрированные в различные участки хромосомы. Было продемонстрировано, что все шесть из шести mini-Mu единицы как для *C.*

glutamicum ATCC13032, так и для MB001 были способны переноситься посредством электротрансформации геномной ДНК с их собственными непредсказуемыми частотами. Эффективность переноса могла варьироваться вплоть до 1-2 порядков в зависимости от точки интеграции mini-Mu единицы в одних и тех же условиях.

На основании полученных данных была выявлена закономерность, что участки ДНК, доступные для интеграции mini-Mu единиц в результате межмолекулярной транспозиции, могут быть успешно рекомбинированы. Представленные в данной главе результаты убедительно свидетельствуют о возможности применения метода электротрансформации геномной ДНК в *S. glutamicum* для определенных локусов. Таким образом, метод электротрансформации геномной ДНК был впервые продемонстрирован для *S. glutamicum*.

2.7. Общая концепция предлагаемого метода для конструирования бесплазмидного безмаркерного рекомбинантного штамма *S. glutamicum*

В данной работе мы представляем метод для введения целевых фрагментов ДНК (генов, оперонов) в предварительно выбранные участки хромосомы *S. glutamicum* с помощью разработанной нами стратегии Dual-In/Out для создания безмаркерного бесплазмидного штамма-продуцента. Метод также подразумевает возможность последующего объединения полученных вставок посредством электротрансформации геномной ДНК. Предлагаемая стратегия Dual-In/Out состоит из четырех последовательных этапов (Рисунок 8). Конструирование продуцента начинается с создания искусственного $attB_{\phi 16}$ -сайта, используемого в качестве «платформы» для дальнейшей интеграции желаемой кассеты в штамм *S. glutamicum* с предварительно удаленным природным $attB_{\phi 16}$ -сайтом. На первом этапе Dual-In/Out стратегии осуществляется $\text{RecE}^{564\text{T}}$ -зависимая интеграция маркера, фланкированного $attL/R_{\phi 16}$ -сайтами (первый «In» в названии стратегии Dual-In/Out). На втором этапе происходит $\phi 16$ -Xis/Int-зависимое вырезание маркера с образованием искусственного $attB_{\phi 16}$ (первый «Out»). Третий этап представляет собой $\phi 16$ -Int-опосредованную интеграцию целевой кассеты в составе нерепликативной плазмиды, содержащей $attP_{\phi 16}$ -сайт, в сконструированный $attB_{\phi 16}$ (второй «In»). На четвертом этапе происходит

Cre-зависимое удаление маркированной векторной части, окруженной модифицированными *lox66/71*-сайтами (второй «Out»).

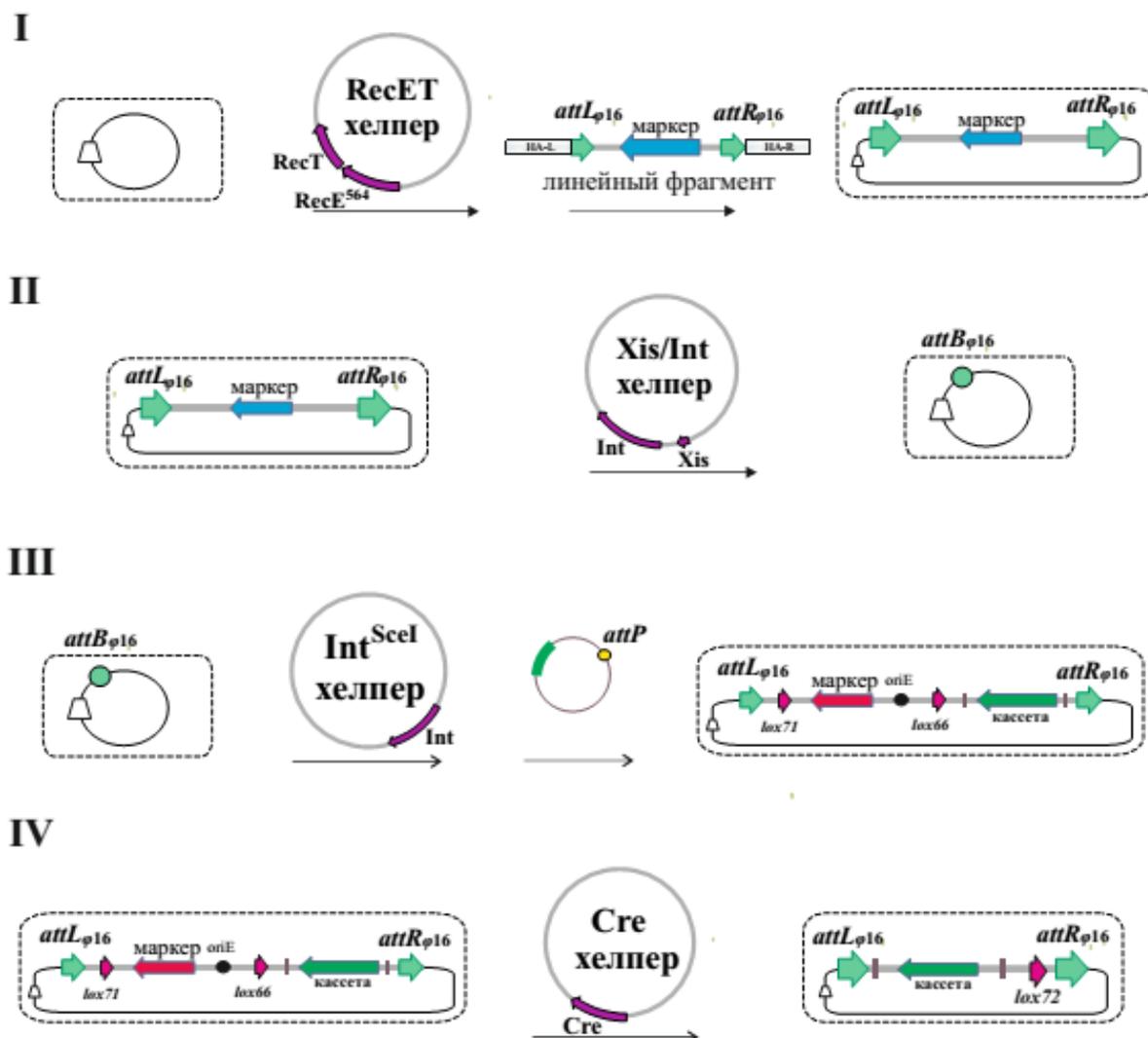


Рисунок 8 – Схематическое изображение Dual-In/Out стратегии, разработанной для введения гетерологичной ДНК в заданную точку на хромосоме *C. glutamicum*

Для создания возможности дальнейшего комбинирования кассет искусственные *attB*_{φ16}-сайты было предложено конструировать в точках, предварительно идентифицированных с помощью системы транспозиции бактериофага Mu, которая позволяла безошибочно определять области, способные к эффективному переносу с помощью электропорации геномной ДНК.

При конструировании штамма-производителя с помощью Dual-In/Out стратегии элиминирование хелперных плазмид занимает значительную долю времени. Для преодоления данной проблемы в представленной стратегии

вспомогательные плазмиды, используемые на первых трех этапах, были сконструированы на одном репликоне pBL1 (RecET-хелпер, Xis/Int-хелпер, Int^{SceI}-хелпер), однако содержали разные гены устойчивости к антибиотикам. Таким образом, после подтверждения модификации с помощью ПЦР необходимый для следующего этапа хелпер мог быть немедленно введен и отобран на соответствующем антибиотике без предварительного удаления предыдущего, что значительно сокращало время конструирования. Так как на четвертом этапе стратегии использовался Cre-хелпер, созданный на совместимом с pBL1 варианте репликона pCG1, последняя из трех плазмид, Int-хелпер, была модифицирована. В Int-хелпер был введен ген эндонуклеазы I-SceI под индуцибельным промотором и соответствующий сайт рестрикции, что позволяло осуществлять индуцибельное самоэлиминирование в 50% случаев. Используемый на последнем этапе стратегии Cre-хелпер, сконструированный на ранее отобранном нестабильном варианте репликона pCG1, удалялся 100% при первом же пересеве.

2.8. Применение стратегии Dual-In/Out для интеграции генов флуоресцентных белков с последующим их объединением в одном штамме

Функциональность метода была продемонстрирована на примере введения генов флуоресцентных белков в сконструированные в различных положениях искусственные *attB*_{φ16}-сайты с последующим объединением всех инсерций в одном штамме. Этот метод был продемонстрирован для геномной инженерии двух промышленно значимых штаммов *C. glutamicum* ATCC13869 (**13869**) и *C. glutamicum* ATCC13032 (**13032**). С помощью разработанной для *C. glutamicum* стратегии Dual-In/Out был получен безмаркерный бесплазмидный штамм **13869ΔB#400::G#668::R#2370::G**, геном которого содержал 2 копии гена уEGFP и одну копию гена TurboRFP, а также **13032B::G#2393::R**, содержащий одну копию гена уEGFP, интегрированного в природный *attB*_{φ16}-сайт и одну копию гена TurboRFP в точке #2393. Измерение флуоресценции проводили после каждого этапа объединения кассет, результаты измерений представлены на Рисунке 9.

Как видно из Рисунка 9, детектируемый уровень флуоресценции для штаммов, содержащих одну копию интегрированного гена уEGFP или TurboRFP в хромосоме, практически не зависел от его точки интеграции или

от наличия/отсутствия гена, кодирующего второй флуоресцентный белок. Напротив, штамм, несущий две интегрированные копии гена уEGFP, демонстрировал двукратное повышение уровня флуоресценции.

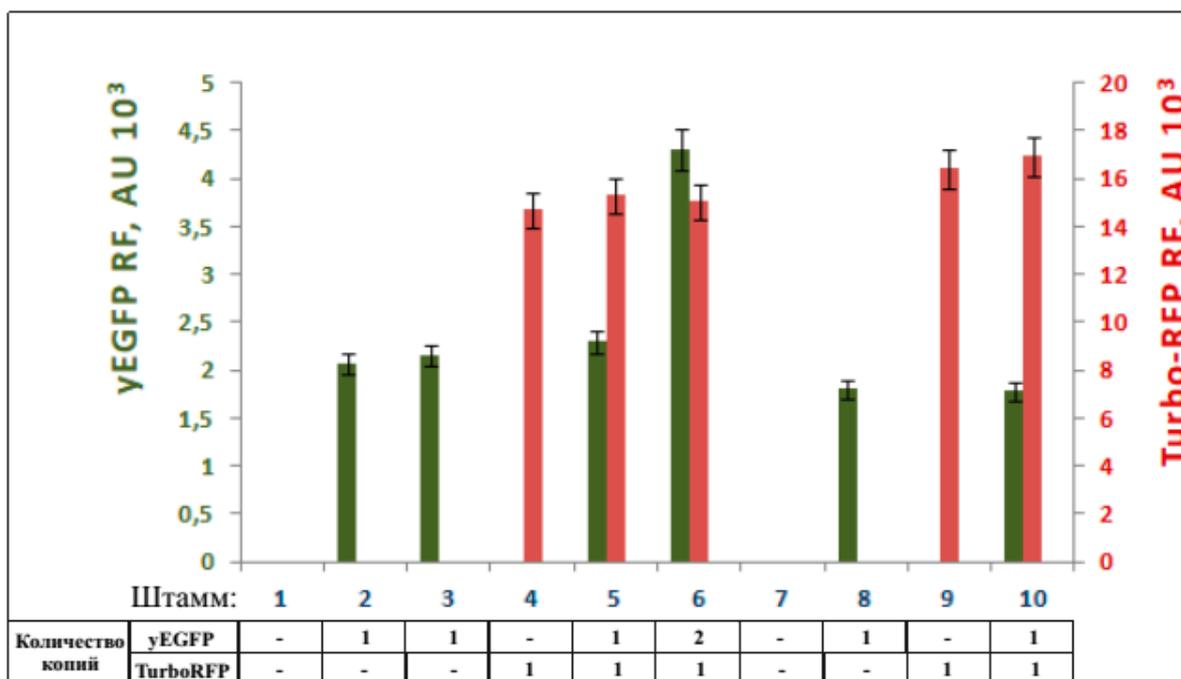


Рисунок 9 – Относительная интенсивность флуоресценции уEGFP и TurboRFP. Родительский штамм 13869 (1), производные 13869 штамма с различной комбинацией генов уEGFP и TurboRFP: 13869ΔB#400::G (2) 13869ΔB#2370::G (3), 13869ΔB#669::R (4), 13869ΔB#400::G#669::R (5), 13869ΔB#400::G#669::R#2370::G (6) и родительского штамма 13032 (7), и его производные 13032B::G (8), 13032ΔB#2393::R (9), 13032B::G#2393::R (10). Количество копий каждого гена флуоресцентного белка указано под соответствующим штаммом. На графиках показаны средние значения трех экспериментов, и во всех случаях стандартное отклонение не превышает 15%

Таким образом, применение разработанного нами метода было продемонстрировано на примере интеграции генов флуоресцентных белков и их последующего объединения для *S. glutamicum* ATCC 13869 и ATCC 13032 штаммов.

2.9. Увеличение эффективности переноса модификаций методом электротрансформации геномной ДНК *S. glutamicum* в условиях гетерологичной экспрессии генов, кодирующих RecE^{564T}

Поскольку известно, что экспрессия генов, кодирующих RecET, повышает уровень гомологичной рекомбинации между линейным ПЦР фрагментом и хромосомой *S. glutamicum*, можно было предположить, что в

этих же условиях основная часть меченых фрагментов хромосомной ДНК может быть успешно рекомбинирована.

Дополнительно проведенный эксперимент показал, что в условиях экспрессии RecE^{564T} частота переноса mini-Mu единицы, расположенной в точке #198 хромосомы *C. glutamicum* ATCC 13869, увеличилась на порядок (Таблица 2), что подтвердило наше предположение. Было решено повторить аналогичный эксперимент для трех «неудачных» Sm-маркированных точек (#542, #1741 и #1865), которые ранее не удалось перенести стандартным методом электротрансформации геномной ДНК. В результате 20 мкг геномной ДНК было электропорировано в реципиентный штамм, что привело к получению нескольких сотен трансформантов (Таблица 2). ПЦР полностью подтвердил ожидаемую структуру ДНК вновь полученных клонов.

Таблица 2 – Эффективность переноса маркированных модификаций посредством стандартной электротрансформации геномной ДНК и в условиях RecE^{564T} экспрессии в реципиентных клетках

Точка #	Интегрированная кассета	Позиция в геноме	Эффективность переноса (клонов/20мкг ДНК)	
			Стандартные условия	RecE ^{564T} экспрессия в реципиентных клетках
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13869 (GenBank AP017557.2)				
198	mini-Mu(LER), Sm ^R (3.7 т.п.н.)	198,108	16±3	207±25
542	L-Sm-R (1.8 т.п.н.)	542,642	0	506±51
1741		1,741,544	0	547±63
1865		1,865,443	0	619±75

По всей вероятности, из-за структуры нуклеоида некоторые участки хромосомы проявляют сниженный уровень RecA-зависимой гомологичной рекомбинации, а также, возможно, частично защищены от Mu-зависимой транспозиции. Однако структурная организация данных областей нуклеоида не препятствует функционированию белков RecE^{564T}-зависимой системы гомологичной рекомбинации. Было показано, что гетерологичная экспрессия RecE^{564T} в клетках *C. glutamicum*, усиливая гомологичную рекомбинацию, способствует увеличению эффективности переноса генетических модификаций, находящихся в произвольно выбранных участках хромосомы *C. glutamicum*. Таким образом, метод позволяет переносить любые

модификации в случае, когда допустима экспрессия генов RecE⁵⁶⁴T-системы в штамме-продуценте.

2.10. Преимущества разработанного метода

Предложенный метод на основе стратегии Dual-In/Out позволяет осуществить прецизионную интеграцию генетического материала в хромосому *C. glutamicum*, а также объединить сконструированные модификации посредством электротрансформации геномной ДНК для получения безмаркерных бесплазмидных рекомбинантных штаммов.

Разработанный метод, нивелируя недостатки ранее существовавших подходов, объединяет их преимущества, такие как высокая эффективность, возможность прецизионной множественной интеграции протяженных кассет, в отсутствие геномных перестроек.

Мы надеемся, что разработанный нами метод будет активно использоваться для создания различных штаммов на основе *C. glutamicum* и внесет свой вклад в расширение генно-инженерного инструментария для коринебактерий.

Выводы

1. Коринефаги $\phi 673$, $\phi 674$ и $\phi 16$ были охарактеризованы морфологически, а их геномы впервые полностью секвенированы и аннотированы. Впервые идентифицирован и охарактеризован ген эксцизназы фага $\phi 16$.
2. Разработан метод и сконструирован генетический инструментарий для прецизионной интеграции гетерологичного материала в хромосому *C. glutamicum* на основе стратегии Dual-In/Out, которая объединяет несколько систем: (i) RecE^{654T}-зависимую систему гомологичной рекомбинации Rac профага *E. coli*; две сайт-специфические системы (ii) коринефага $\phi 16$; (iii) Cre/loxP фага P1 *E. coli*.
3. Впервые продемонстрирована возможность переноса и объединения маркированных инсерций в одном реципиентом штамме *C. glutamicum* посредством электротрансформации геномной ДНК.
4. Было показано, что гетерологичная экспрессия RecE^{564T} в клетках *C. glutamicum*, усиливая гомологичную рекомбинацию, существенно увеличивает эффективность переноса генетических модификаций.
5. Функциональность метода была продемонстрирована для двух промышленно значимых штаммов *C. glutamicum* ATCC 13869 и ATCC 13032.

Список публикаций

1. Lobanova J.S., Gak E.R., Andreeva I.G., Rybak K.V., Krylov A.A., Mashko S.V. (2017). Complete nucleotide sequence and annotation of the temperate corynephage ϕ 16 genome. *Arch Virol.* 162(8): 2489–2492.
2. Gorshkova N.V., Lobanova J.S., Tokmakova I.L., Smirnov S.V., Akhverdyan V.Z., Krylov A.A., Mashko S.V. (2018). Mu-driven transposition of recombinant mini-Mu unit DNA in the *Corynebacterium glutamicum* chromosome. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102(6): 2867–2884.
3. Yomantas Y.A.V., Abalakina E.G., Lobanova J.S., Mamontov V.A., Stoyanova N.V., Mashko S.V. (2018). Complete nucleotide sequences and annotations of ϕ 673 and ϕ 674, two newly characterised lytic phages of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Arch Virol.* 163(9):2565-2568.