

Акционерное Общество
«Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»

На правах рукописи

Лобанова Юлия Сергеевна

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

1.5.7 – Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Горшкова Наталья Васильевна

Москва 2022

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ	4
1.1. Актуальность темы.....	4
1.2. Цели и задачи работы	5
1.3. Научная новизна и практическая ценность работы.....	6
1.4. Положения, выносимые на защиту	7
2. Обзор литературы	9
2.1. Общая характеристика <i>C. glutamicum</i>	9
2.1.1. История открытия.....	9
2.1.2. Таксономическая принадлежность	9
2.1.3. Морфология, строение клеточной стенки и условия культивирования .	10
2.1.4. Строение генома, типовые штаммы <i>C. glutamicum</i>	12
2.1.5. Преимущества использования <i>C. glutamicum</i> в промышленности.....	13
2.1.6. Вещества, получаемые на основе <i>C. glutamicum</i>	16
2.2. Методы генетической инженерии <i>C. glutamicum</i>	18
2.2.1. Методы переноса ДНК.....	19
2.2.2. Плазмиды и репликоны.....	21
2.2.3. Инструменты для моделирования экспрессии генов	24
2.2.4. Методы модификации генома <i>C. glutamicum</i>	29
2.3. Гомологичная рекомбинация.....	39
2.3.1. Фаговые системы рекомбинации	41
2.3.1.1. Red система рекомбинации бактериофага λ	41
2.3.1.2. Система рекомбинации RecET Rac профага.....	44
2.4. Бактериофаг Mu: вирус и транспозон.....	45
2.5. Сайт-специфическая рекомбинация	50
2.5.1. Семейства рекомбиназ	52
2.5.2. Сайт-специфические рекомбинационные системы.....	56
2.5.2.1. λ Int/Xis система.....	56
2.5.2.2. Системы Cre/loxP и FLP/FRT	58
3. Материалы и методы	60
3.1. Бактериальные штаммы, фаги, плазмиды и условия культивирования....	60
3.2. Олигонуклеотиды.....	65
3.3. Стандартные генно-инженерные методики.....	69
3.4. Методы работы с бактериофагами	70
3.4.1. Индукция фага $\phi 16$ из лизогенного штамма	70
3.4.2. Размножение фагов $\phi 16$, $\phi 673$ и $\phi 674$	70
3.4.3. Определение титра фага	71
3.4.4. Сбор фага с чашек и его последующее концентрирование	71
3.4.5. Очистка фага ультрацентрифугированием в градиенте цезия	72
3.4.6. Выделение фаговой ДНК	72
3.4.7. Секвенирование и аннотация фаговых геномов	73
3.4.7.1. Секвенирование геномов фагов $\phi 16$, $\phi 673$, $\phi 674$	73
3.4.7.2. Инструменты для аннотации геномов	73
3.4.8. Электронная микроскопия фаговых частиц.....	74
3.4.9. Электрофорез белков капсида фага в полиакриломидном геле.....	74
3.5. Электротрансформация клеток <i>C. glutamicum</i>	74

3.5.1. Трансформация клеток плазмидной ДНК с помощью процедуры электропорации	75
3.5.2. $\text{RecE}^{564\text{T}}$ -зависимая интеграция линейного фрагмента ДНК в хромосому	75
3.5.3. Трансформация клеток геномной ДНК с помощью процедуры электропорации	76
3.6. Интеграция mini-Mu транспозона в хромосому <i>C. glutamicum</i> и определение его точки интеграции	76
3.7. Излечение штаммов от хелперных плазмид	78
3.7.1. Стандартная методика элиминирования плазмид	78
3.7.2. Элиминирование плазмиды $\text{pVC-Am}^{\text{R}}\text{-Int}_{\phi 16}\text{-SceI}$ (Int^{SceI} -хелпер)	78
3.7.3. Элиминирование плазмиды $\text{p06-Km}^{\text{R}}\text{-P}_{\text{dapA}}\text{-Cre}$ (Cre-хелпер)	78
3.8. Измерение относительной флуоресценции	79
3.9. Конструирование рекомбинантных плазмид	79
4. Результаты и обсуждение	85
4.1. Бактериофаги	86
4.1.1. Характеристика умеренного коринефага $\phi 16$	87
4.1.2. Характеристика двух новых фагов $\phi 673$ и $\phi 674$ размножающихся на <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	95
4.2. Разработатка метода прецизионной интеграции генетического материала на основе Dual-In/Out стратегии для конструирования рекомбинантного штамма <i>C. glutamicum</i>	99
4.2.1. Разработка генно-инженерного инструментария на основе сайт-специфической системы рекомбинации фага $\phi 16$	100
4.2.2. Конструирование элементов Cre-зависимой системы сайт-специфической рекомбинации фага P1.	104
4.2.3. Конструирование элементов RecET -зависимой системы гомологичной рекомбинации для создания искусственных $\text{attB}_{\phi 16}$ -сайтов в <i>C. glutamicum</i>	105
4.2.4. Конструирование искусственных $\text{attB}_{\phi 16}$ -сайтов и проверка их функциональности	108
4.2.5. Проверка возможности переноса маркированных инсерций методом электротрансформации геномной ДНК в <i>C. glutamicum</i>	109
4.2.6. Создание библиотеки mini-Mu интегрантов в <i>C. glutamicum</i>	113
4.2.7. Общая концепция предлагаемого метода для конструирования бесплазмидного безмаркерного рекомбинантного штамма <i>C. glutamicum</i>	115
4.2.8. Применение стратегии Dual-In/Out для интеграции генов флуоресцентных белков с последующим их объединением в одном штамме	117
4.2.9. Увеличение эффективности переноса модификаций методом электротрансформации геномной ДНК <i>C. glutamicum</i> в условиях гетерологичной экспрессия генов, кодирующих $\text{RecE}^{564\text{T}}$	121
4.2.10. Преимущества разработанного метода	122
Выводы	124
Список сокращений	125
Список цитируемой литературы	126

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность темы

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 стрессустойчивость к источнику углерода и целевому продукту, способность к поддержанию метаболической активности в условиях задержки роста, устойчивость к ингибиторам ферментации, генетическая стабильность (Lee et al, 2016). Этот микроорганизм признан безопасным и имеет статус «generally recognized as safe» (GRAS).

В настоящее время *C. glutamicum* широко используется в микробиологическом 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 наличие в клетках плазмид может существенно влиять на клеточный метаболизм или создавать сложности, вызванные их

сегрегационной или структурной нестабильностью. Помимо этого, существует ряд законодательных ограничений на использование штаммов, содержащих плазмиды, кодирующие детерминанты антибиотической устойчивости.

Таким образом, разработка генно-инженерных инструментов 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 с использованием генетических элементов сайт-специфической рекомбинации умеренного коринефага beta (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 каждый из указанных выше подходов имеет свои преимущества и недостатки, нам представлялось актуальным продемонстрировать объединение наиболее перспективных из них в одной стратегии, что позволило бы использовать преимущества и нивелировать недостатки каждого в отдельности. В данной работе представлен метод для введения целевых генов/оперонов в предварительно выбранные участки хромосомы с помощью разработанной нами стратегии Dual-In/Out для *C. glutamicum*. Предложенный 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 *C. 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 для создания искусственных $\text{attB}_{\phi 16}$ -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 *C. glutamicum*, позволяющий осуществлять интеграцию целевых генов/оперонов в бактериальную хромосому. Метод обеспечивает возможность прецизионного дизайна всех планируемых модификаций и является удобным и эффективным инструментом для создания бесплазмидных безмаркерных рекомбинантных штаммов на основе *C. glutamicum*.

С целью поиска новых фаговых генетических элементов для модификации генома *C. glutamicum* три новых коринефага $\phi 673$, $\phi 674$ и $\phi 16$ были охарактеризованы морфологически, а их геномы впервые полностью секвенированы и 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 Рас профага осуществлять интеграцию вырезаемого маркера, фланкированного *attL/R*_{φ16}-сайтами.

Отдельные генно-инженерные инструменты на основе RecE⁵⁶⁴-T-зависимой гомологичной и двух сайт-специфических систем рекомбинации коринефага φ16 и Cre/*lox* фага P1 были объединены в стратегию Dual-In/Out для конструирования безмаркерного рекомбинантного штамма.

Впервые была продемонстрирована возможность переноса маркированных инсерций, расположенных в локусах предварительно идентифицированных с помощью Mu-зависимой системы транспозиции, методом электротрансформации геномной ДНК в *S. 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 RecE⁵⁶⁴-T экспрессии.

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

1.4. Положения, выносимые на защиту

1. Два вирулентных фага φ673, φ674 *S. glutamicum* ATCC 13032 и умеренный бактериофаг φ16 *S. 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 φ16 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 двухцепочечным 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 и комбинации маркированных модификаций методом электротрансформации геномной ДНК в *C. glutamicum*.

6. Было установлено, что эффективность переноса модификаций может быть существенно увеличена в условиях $\text{RecE}^{564\text{T}}$ экспрессии.

2. Обзор литературы

2.1. Общая характеристика *C. glutamicum*

2.1.1. История открытия

Впервые бактерия *C. glutamicum* была выделена из почвы в ходе поиска природного продуцента глутамата исследователями из компании Куоуа Накко в 1956 году (Kinoshita et al, 1957). Потребность в глутамате как вкусовой добавке возникла в результате открытия японского химика Кикунэе Икеда, который обнаружил, что бурые водоросли *Laminaria japonica*, которые традиционно использовались японцами в пищу, обладают характерным вкусом (Ikeda, 1909). При анализе состава водорослей К. Икеда выявил вещество, ответственное за так называемый вкус «умами», им была уже известная на тот момент глутаминовая кислота. В начале 20 века глутаминовую кислоту получали методом гидролиза растительных белков, а к середине века основным способом получения стал химический синтез из акрилонитрила. Микробиологический метод стал возможен благодаря исследованиям Абэ и его коллег из Куоуа Накко, которые провели таксономические исследования 208 штаммов в поисках микроорганизмов - природных продуцентов глутамата. Наиболее эффективным продуцентом оказался *Micrococcus glutamicum* (что и было отражено в его видовом названии), способный синтезировать 0,25 молей глутамата из одного моля глюкозы (Abe et al, 1967; Kinoshita et al, 1957). Этот и множество других штаммов, исходно неверно отнесенных к родам *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* и *Arthrobacter*, позднее, благодаря прогрессу в таксономии, связанному, в том числе с анализом последовательности 16S рДНК, были отнесены к *C. glutamicum* (Liebl et al, 1991).

2.1.2. Таксономическая принадлежность

Согласно современной систематике, вид *C. glutamicum* относится к роду *Corynebacterium*, семейству - *Corynebacteriaceae*, подпорядку *Corynebacterineae*, порядку - *Actinomycetales*, подклассу *Actinobacteridae*, классу - *Actinobacteria*,

типу - Actinobacteria и домену - Bacteria (Bernard, 2015). Семейство Corynebacteriaceae филогенетически родственно таким семействам, как Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Segniliparaceae, Tsukamurellaceae и Dietziaceae (Nouioui et al, 2018). Помимо рода Corynebacterium семейство Corynebacteriaceae включает в себя еще один род - Turicella. Сам род Corynebacterium, который в настоящее время насчитывает 88 подтвержденных видов, очень разнообразен (Bernard, 2012). Одни виды являются патогенами человека (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*), другие вызывают инфекции у животных и птиц (*C. amycolatum*, *C. falsenii*), третьи, питающиеся мертвой органикой, относятся к сапрофитам. Многие виды непатогенных коринебактерий в норме населяют кожу, слизистые и дыхательные пути человека (*C. xerosis*, *C. amycolatum*). Коринебактерий выделяют из различных источников, таких как продукты питания (*C. flavescens*, *C. casei*), окружающая среда (*C. callunae*, *C. efficiens*), в том числе и вода (*C. doosanense*, *C. marinum*). Для биотехнологического производства широко используются *C. efficiens* и *C. glutamicum*. Виды *C. casei* и *C. flavescens* разрешены для использования в пищевой промышленности.

2.1.3. Морфология, строение клеточной стенки и условия культивирования

C. glutamicum, как и все представители рода Corynebacterium - это неподвижные некислотоустойчивые неспорообразующие грамположительные бактерии, клетки которых окрашиваются неравномерно, и иногда содержат гранулы. Клетки коринебактерий представляют собой полиморфные палочки - от тонких слегка изогнутых до овальных укороченных, иногда с заостренными булабовидными концами, что и послужило основанием для названия рода (коринеформная означает «булабовидная»). Средний размер клетки коринебактерий составляет 0,3-0,8×1,5-8,0 мкм.

Многослойная клеточная стенка коринебактерий характерна для всех бактерий, отнесенных к подпорядку Corynebacterineae, и является отличительной особенностью данной группы организмов. Цитоплазматическая мембрана состоит из двойного слоя фосфолипидов, содержит также и другие полярные липиды, жирные кислоты, разнообразные белки и является основным

диффузным барьером клетки. Цитоплазматическая мембрана покрыта оболочкой из трех слоев: пептидогликана (N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота), арабиногалактана (арабиноза и галактоза) и внутреннего слоя миколатной мембраны. Все три слоя ковалентно связаны друг с другом и образуют единственную огромную трехмерную молекулу, которая окружает цитоплазматическую мембрану, поддерживает форму клетки и обеспечивает постоянство осмотического давления. Далее располагается внешний слой миколатной мембраны. Эти два слоя мембраны, состоящие из миколовых кислот и гликолипидов, не связаны ковалентно, их взаимодействие вызвано гидрофобными силами, и, аналогично наружной мембране грамотрицательных бактерий, формирует второй барьер проницаемости, что и является главной особенностью клеточной стенки этих бактерий. К внешней стороне миколатной мембраны примыкает так называемый S-слой, состоящий из полисахаридов и белка SP2 (Bayan et al, 2003; Puech et al, 2001).

На сегодняшний день *C. glutamicum* является хорошо изученной почвенной бактерией, имеющей большое значение для биотехнологии. *C. glutamicum* - факультативно-анаэробная бактерия, которая при наличии кислорода способна получать энергию за счет дыхания, а при ограничении кислорода - переключаться на анаэробный путь получения энергии (брожение). Таким образом, *C. glutamicum* может расти как в аэробных, так и анаэробных условиях, но высокой клеточной плотности достигает только при культивировании в аэробных условиях. *C. glutamicum* растет при температуре 24–37 °С в средах с показателем рН 6,0–8,5 (оптимальными являются температура 30–32 °С и рН 6,8–7,2). В лабораторных условиях *C. glutamicum* выращивается на различных средах: МПА (мясопептонный агар), L-среда, ВНІВ (агар с сердечно-мозговым экстрактом) и т.д. *C. glutamicum* образует колонии округлой формы с ровными краями интенсивно желтого цвета. Колонии обладают нетягучей консистенцией, клетки легко отделяются друг от друга. При оптимальной температуре (30 °С) отдельные колонии появляются на 1 - 2 сутки, при росте на минимальной среде *C. glutamicum* нуждается в биотине.

В качестве источника углерода *C. glutamicum* может использовать множество органических соединений, таких как различные сахара (моносахариды: глюкоза, фруктоза и рибоза; дисахариды: сахароза, мальтоза и манноза) и спирты (инозитол и этанол). Кроме того, *C. glutamicum* может расти на многих органических кислотах (глюконат, лактат, ацетат, пропионат, пируват или цитрат), а также на некоторых аминокислотах (L-глутамат и L-глутамин). Для роста и суперпродукции клеткам, помимо источника углерода, необходимы также азот и сера (сверхсинтез серосодержащих аминокислот). Источниками азота могут служить соли аммония или органические соединения, такие как мочевины и аминокислоты, *C. glutamicum* не способен усваивать нитратный азот. В качестве источника серы широко используется неорганический сульфат, несмотря на то, что его ассимиляция требует высокой окислительно-восстановительной способности для его восстановления до биологически совместимого сульфида. Альтернативными источниками серы, ассимилируемыми *C. glutamicum*, являются цистеин, сульфонаты или сложные эфиры сульфоновой кислоты (Wittmann, 2010).

2.1.4. Структура генома и типовые штаммы *C. glutamicum*

Геном *C. glutamicum* представлен одной кольцевой хромосомой длиной \approx 3,3 миллиона пар оснований с умеренно высоким G+C составом (53.8%, *C. glutamicum* ATCC 13032), различные штаммы могут содержать одну или несколько криптоплазмид. Одним из первых выделенных штаммов *C. glutamicum* был штамм дикого типа – природный продуцент глутамата (ранее известный как “*Micrococcus glutamicus*”, M534), он был депонирован как *C. glutamicum* ATCC 13032 и с момента открытия активно изучались его физиологические свойства, метаболизм, а также разрабатывался геноинженерный инструментарий. Геном именно этого штамма был впервые полностью секвенирован двумя независимыми группами в 2003 году (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski et al, 2003) и стал доступен в базах данных KEGG (<http://www.kegg.jp>) и CoryneRegNet (<http://www.coryneregnet.de>). На сегодняшний день более 200 типовых штаммов *C. glutamicum* заложены в

Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection (ATCC); <http://www.actt.org>). В базе данных NCBI доступны геномы 69 штаммов *C. glutamicum*, последовательность 29 из которых полностью определена и аннотирована, геномы остальных 40 штаммов представлены частично. В этой базе данных также представлены нуклеотидные последовательности криптических плазмид, присутствующих в различных штаммах коринебактерий (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/469/>).

Наряду с *C. glutamicum* ATCC 13032, полный геномный сиквенс известен для широко используемого типового штамма *C. glutamicum* R (Yukawa et al, 2007). На базе этого штамма были созданы основанные на брожении микробиологические процессы получения этанола и органических кислот, сконструированы соответствующие продуценты; культивирование проводилось в условиях недостатка кислорода. Среди прочих, полностью секвенированы геномы таких типовых штаммов как *C. glutamicum* ATCC 14067 (“*Brevibacterium flavum*” ATCC 14067) (Lv et al, 2012), *C. glutamicum* ATCC 13869 (“*B. lactofermentum*” ATCC 13869) (Yang and Yang, 2017) и *C. glutamicum* ATCC 21831 (Park et al, 2014), на основе которых созданы промышленно значимые продуценты широкого спектра веществ (Lee et al, 2016). Кроме последовательностей типовых штаммов, в базе NCBI представлена полная нуклеотидная последовательность штамма с редуцированным геномом MB001 (Baumgart et al, 2013). MB001 является излеченным от профагов производным *C. glutamicum* ATCC 13032, созданным для использования в качестве базового штамма для фундаментальных исследований и промышленной биотехнологии. На основе MB001 получен штамм с еще более уменьшенным геномом (Unthan et al, 2015), а также штамм, генерирующий миниклетки, применяемый в системах доставки лекарств (Lee et al, 2015).

2.1.5. Преимущества использования *C. glutamicum* в промышленности

C. glutamicum обладает множеством фундаментальных физиологических свойств, которые делают его промышленно значимым организмом. В связи с

отсутствием патогенности и неспособностью к спорообразованию вид *C. glutamicum* имеет статус GRAS (Generally Recognized as Safe), то есть признан безопасным микроорганизмом для человека и животных, что позволяет использовать его в качестве продуцента аминокислот и прочих веществ пищевого, кормового, а также фармацевтического назначения. *C. glutamicum* демонстрирует быстрый рост до высокой клеточной плотности (Hartbrich et al, 1996) и не предъявляет жестких требований к составу среды и условиям культивирования. Ряд штаммов обладает способностью поддерживать метаболическую активность в условиях задержки роста и не подвергаться автолизу (Inui et al, 2004). *C. glutamicum* имеет пластичный метаболизм и способен продуцировать широкий круг ценных вторичных метаболитов. *C. glutamicum*, являясь факультативно-анаэробной бактерией, позволяет конструировать продуценты широкого спектра веществ, являющихся продуктами как аэробного, так и анаэробного путей биосинтеза (Wendisch et al, 2016). *C. glutamicum* обладает высокой природной устойчивостью к токсичности целевого продукта как, например, биотопливо или органические кислоты (Buschke et al, 2013).

Геном *C. glutamicum* достаточно стабилен, что является важным критерием при выборе организма для конструирования продуцента. Стабильность генома *C. glutamicum* как и прочих представителей рода *Corynebacterium*, по всей вероятности, обусловлена отсутствием системы репарации рекомбинации *recBCD*, ответственной за ряд геномных перестроек, как было показано в случае *E. coli* (Nakamura et al, 2003).

C. glutamicum обладает большим потенциалом для производства рекомбинантных белков благодаря своим превосходным культуральным характеристикам. Существенным преимуществом *C. glutamicum* по сравнению с *E. coli* является отсутствие продукции эндотоксинов (Song et al, 2012). И в отличие от дрожжей, в частности *Pichia pastoris*, *C. glutamicum* не осуществляет такой посттрансляционной модификации как гликозилирование, которое часто приводит к неожиданным изменениям в структуре и функции белка, что делает его предпочтительным хозяином для экспрессии ряда белков, не нуждающихся

в гликозилировании, например, таких как различные фрагменты антител (Liu et al, 2017a). Известно также, что большинство видов, принадлежащих к *Corynebacterium*, обладают низкой протеазной активностью в отличие от многих других почвенных бактерий родов *Streptomyces* и *Bacillus* (Suzuki et al, 2009), а также дрожжей.

Было установлено, что *C. glutamicum* содержит в своем геноме только один ген *etpr* (cg1243, cgR1176), кодирующий внеклеточную трипсиноподобную протеазу (Yukawa et al, 2007). Для секреции нативных белков *C. glutamicum* имеет два независимых пути: общий секреторный (Sec-зависимый) путь, предназначенный для транспорта белков, не прошедших посттрансляционный фолдинг и двойной аргининовый транслокационный путь (TAT-зависимый), обеспечивающий проведение через мембрану белков, полностью принявших характерную для их активной формы пространственную конформацию. Протеомный анализ *C. glutamicum* показал, что примерно 10% белков, кодируемых *C. glutamicum* дикого типа, могут секретироваться (Kalinowski et al, 2008). На сегодняшний день оба механизма секреции *C. glutamicum* хорошо изучены и показано, что сверхэкспрессия компонентов обоих путей способна усиливать секрецию как гомологичных, так и гетерологичных белков (Kikuchi et al, 2009).

Несомненным преимуществом для биотехнологии является способность *C. glutamicum* ассимилировать широкий круг соединений в качестве источника углерода. Спектр природных субстратов *C. glutamicum* включает сахара, органические кислоты и спирты, но для промышленных производственных процессов в качестве источников углерода используются в основном глюкоза (из гидролизатов крахмала) на предприятиях Северной Америки или сахароза и фруктоза (из патоки) в Европе, Южной Америке и Азии. *C. glutamicum* обладает высокой стрессоустойчивостью к источнику углерода (Leßmeier and Wendisch, 2015), а также устойчивостью к ферментационным ингибиторам (Sakai et al, 2007), что позволило сконструировать рекомбинантные штаммы, способные использовать несколько дешевых альтернативных источников углерода. Благодаря повышению уровня экспрессии природных генов были получены

штаммы, способные расти и продуцировать на таких доступных источниках углерода как малат, фумарат и сукцинат. Введение гетерологичных генов позволило культивировать *C. glutamicum* на лигноцеллюлозных отходах, содержащих значительное количество арабинозы, ксилозы и целлобиозы, крахмале без предварительной дорогостоящей стадии гидролиза, сахарах молочной сыворотки - лактозе и галактозе, глюкозамине из хитина и хитозана, на глицерине - побочном продукте производства биодизеля, а также метаноле (Zahoor et al, 2012; Wendisch et al, 2016).

C. glutamicum обладает уникальной способностью совместно утилизировать смешанные источники углерода, что имеет большое значение для биотехнологии. Коутилизация субстратов, присущая *C. glutamicum*, отсутствует у других промышленно значимых организмов, таких как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, которые демонстрируют такое нежелательное для биотехнологического процесса явление как диауксия роста, связанное с последовательным потреблением субстратов, вызванное катаболитной репрессией. Явление коутилизации субстратов *C. glutamicum* было подробно изучено в отношении совместного использования ацетата и глюкозы и аналогично для многих других сочетаний источников углерода. Более того, коутилизация также наблюдается при введении в *C. glutamicum* дополнительных гетерологичных путей утилизации углерода. Была показана совместная утилизация глицерина с глюкозой, соединений лигноцеллюлозы с глюкозой, арабинозы с глюкозой, ксилозы и арабинозы с глюкозой и целлобиозы вместе с ксилозой и глюкозой (Zahoor et al, 2012). Редким исключением из правила коутилизации является потребление глюкозы раньше L-глутаминовой кислоты или этанола, и ацетата - перед этанолом.

2.1.6. Вещества, получаемые на его основе *C. glutamicum*

На сегодняшний день *C. glutamicum* занимает важное место в биотехнологии благодаря множеству своих вышеупомянутых физиологических свойств. Становление *C. glutamicum* одним из ведущих промышленных микроорганизмов было обусловлено его способностью синтезировать и

секретировать большое количество аминокислот, производство которых является одним из важнейших направлений биотехнологии (Becker and Wittmann, 2017). Аминокислоты имеют множество потенциальных применений, таких как кормовые и пищевые добавки, материалы для фармацевтических препаратов и полимеров. История вида *C. glutamicum* как продуцента началась с промышленного производства L-глутамата (Kinoshita et al, 1957), одной из самых распространенных пищевых добавок. Спустя несколько лет *C. glutamicum* был использован для производства L-лизина, незаменимой аминокислоты, применяемой в основном в качестве кормовой добавки (Nakayama et al, 1966). На сегодняшний день на основе *C. glutamicum* производят и многие другие L- аминокислоты, в том числе метионин, аргинин и аланин, а также цистеин, гистидин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, пролин, серин, триптофан, тирозин и валин (Lee et al, 2016).

Помимо протеиногенных, *C. glutamicum* является продуцентом некоторых небелковых аминокислот, например, орнитина (Udaka and Kinoshita, 1958) и цитруллина (Ikeda et al, 2009), имеющих широкий спектр потенциальных применений в различных областях, в том числе в медицине и в спортивном питании. γ -аминомасляная кислота (ГАМК) является важной аминокислотой и может служить составляющей фармацевтических препаратов, пищевых продуктов и биоразлагаемых пластиков (Jorge et al, 2017a). За счет экспрессии гетерологичных генов *C. glutamicum* может синтезировать L-пипеколиновую кислоту, используемую в качестве предшественника иммунодепрессантов или пептидных антибиотиков (Perez-Garcia et al, 2016), а также эктоин, широко применяемый в косметической промышленности (Becker et al, 2013).

Толерантность *C. glutamicum* к значительным внеклеточным концентрациям D-аминокислот позволила сконструировать продуценты D-аргинина, D-лизина, D-орнитина, D-серина (Stäbler et al, 2011).

Было разработано несколько производственных процессов для получения различных органических кислот, имеющих широкий спектр потенциальных применений. Среди прочих были получены продуценты лактата, сукцината, гликолята, оксо-изокапроата, пирувата и оксо-изовалерата (Becker et al, 2018).

Возможность производства спиртов с помощью *C. glutamicum* была продемонстрирована на примере создания штаммов, продуцирующих этанол, изобутанол, 1,2-пропандиол, 1,3-пропандиол, 1-пропанол и этиленгликоль (Becker et al, 2018).

На базе штаммов-продуцентов L-орнитина и L-лизина были сконструированы продуценты диаминов, таких как путресцин (1,4-диаминобутан) и кадаварин (1,5-диаминопентан), применяемых в качестве полимерного строительного блока. (Kind and Wittmann, 2011). Также сообщалось о создании продуцентов полигидроксиалканоатов (ПГА), используемых для производства пластмасс и биосовместимых медицинских материалов (Lee et al, 2016).

Группа ароматических соединений, производимых на основе *C. glutamicum*, очень разнообразна, она включает в себя как ароматические аминокислоты и протокатехиновую кислоту, так и более сложные молекулы - виолацеин, флавоноиды и стильбены с показанной противоопухолевой, антибактериальной, противовирусной и противовоспалительной активностью. (Becker et al, 2018).

C. glutamicum широко используется в качестве платформенного микроорганизма для экспрессии гетерологичных белков. С помощью *C. glutamicum* получают как промышленные ферменты, так и белки фармацевтического назначения (Liu et al, 2017a). В *C. glutamicum* успешно экспрессируются различные белки, такие как трансклутаминаза, эпидермальный фактор роста человека (hEGF), амилаза, зелёный флуоресцентный белок (GFP), глутаматдекарбоксилаза, нитрилгидратаза и Fab (Liu et al, 2017a). Была создана новая система экспрессии белков / пептидов CORYNEX с использованием *C. glutamicum* в качестве хозяина (Matsuda et al, 2014).

2.2. Методы генетической инженерии *C. glutamicum*

В связи с успешным применением *C. glutamicum* в биотехнологии возникла потребность в штаммах с желаемыми производственными свойствами, что и послужило предпосылкой к разработке генно-инженерных инструментов.

Разработка эффективных методов переноса ДНК и векторов клонирования, полученных на базе эндогенных плазмид (Ozaki et al, 1984; Santamaría et al, 1984), стала стартовой точкой для развития генной инженерии *C. glutamicum* и позволила уйти от классического подхода - мутагенеза и последующего скрининга. Благодаря первым генетическим инструментам на базе различных плазмид стало возможным изменять экспрессию, нарушать или заменять гены *C. glutamicum*, что позволило положить начало исследованиям метаболических путей. Учитывая отсутствие какой-либо очевидной естественной или химически-индуцированной системы захвата ДНК, сходной с традиционными методами трансформации *E. coli* или *B. subtilis*, развитие генной инженерии *C. glutamicum* было невозможно без разработки эффективных методов переноса ДНК.

2.2.1. Методы переноса ДНК

Для введения генетического материала в клетки *C. glutamicum* был разработан ряд методов, таких как трансформация протопластов и сферопластов с использованием шатл-векторов (Katsumata et al, 1984), трансдукция космидного вектора, который возможно было упаковывать в фаговую частицу путем инфицирования фагом fA1 *C. glutamicum*, содержащего космиду (Miwa et al, 1985). Был также продемонстрирован конъюгативный перенос ДНК от грамотрицательных *E. coli* к грамположительным *C. glutamicum* (Schäfer et al, 1990). Однако наиболее удобным методом переноса рекомбинантной ДНК в клетки *C. glutamicum* на сегодняшний день считается электротрансформация. Основным принцип электропорации заключается в создании временных пор в стенке бактериальной клетки под действием электрического поля, через которые различные внеклеточные молекулы могут получить доступ к цитоплазме клетки. Поскольку клеточная стенка *C. glutamicum* представляет собой серьезный барьер для переноса рекомбинантной ДНК, были разработаны методы для ее ослабления. Было показано, что добавление в среду для выращивания ряда соединений способствует получению более «электрокомпетентных» клеток. Сообщалось, что рост клеток *C. glutamicum* в

присутствии пенициллина G, известного ингибитора синтеза клеточной стенки, увеличивал эффективность электротрансформации примерно на 2 порядка по сравнению с контролем (Kurusu et al, 1990). Другие методы ослабления клеточной стенки включают в себя добавление ампициллина (Bonnassie et al, 1990) или глицина, которые частично нарушают поперечную сшивку цепей пептидогликана (Hammes et al, 1973). Утверждается, что выращивание в присутствии изониазида (INH) уменьшает среднюю длину углеродных цепей миколиновых кислот, тогда как добавление Tween 80 изменяет общий состав коринемиколовых кислот и степень их ненасыщенности (Chevalier et al, 1988). Фаза роста культуры является важным фактором для получения электрокомпетентных клеток, в подавляющем большинстве описанных методик предпочтение отдается ранней и среднеэкспоненциальной фазе (Liebl et al, 1989).

Помимо физического барьера, образованного клеточной стенкой, гетерологичной ДНК необходимо также преодолеть биологический барьер, представленный *mrg*- и *mcr*-подобной системой рестрикции и модификации коринебактерий (Vertès et al, 1993). Разнообразные практические методы были разработаны для достижения эффективности вплоть до 5×10^7 трансформантов на 1 мкг ДНК. Для повышения эффективности трансформации *S. glutamicum* выделение трансформирующей ДНК производится из штаммов *E. coli* с недостаточным метилированием (*dam*-/*dcm*-), из голодных культур *E. coli*, выращенных в условиях недостатка питательных веществ или штаммов *E. coli*, модифицирующих трансформирующую ДНК под действием метилтрансферазы из *S. glutamicum* (Schäfer et al, 1997). Альтернативно, для трансформации используется синтетическая ДНК, полученная *in vitro* с помощью ПЦР-амплификации (Ankri et al, 1996). Для увеличения эффективности трансформации гетерологичной ДНК используются мутантные штаммы *S. glutamicum* с дефицитом рестрикции (Liebl et al, 1989), также применяется обработка тепловым шоком для инактивации рестрикционной системы (van der Rest et al, 1999). Благодаря своей эффективности, простоте и воспроизводимости метод электропорации в настоящее время широко применяется для переноса плазмидной и других типов ДНК в *S. glutamicum*.

2.2.2. Плазмиды и репликоны

Первые природные плазмиды были обнаружены в ряде коринебактериальных штаммов, продуцирующих аминокислоты (Ozaki et al, 1984; Santamaría et al, 1984). Все известные на сегодняшний день нативные плазмиды *C. glutamicum* объединены в четыре семейства на основании их способа репликации и уровня гомологии аминокислотной последовательности RepA белка. Представители семейств pBL1 и pCG1 реплицируются по типу катящегося кольца, тогда как плазмиды pXZ10142 и pCRY4 семейств используют тета-(Θ) тип репликации (Tauch et al, 2003). С момента обнаружения криптических плазмид, ознаменовавшего новую эру рекомбинантной ДНК технологии, за последние несколько десятилетий было создано множество векторов клонирования для генной инженерии *C. glutamicum*. Большинство автономно реплицирующихся векторов *C. glutamicum* содержат репликоны небольших криптических средне и высококопийных плазмид pBL1 (Santamaría et al, 1984), pCG1 (Ozaki et al, 1984) и pGA1 (Sonnen et al, 1991), а также минимальный репликон низкокопийной плазмиды pNG2 с широким кругом хозяев (Radford and Hodgson, 1991).

Типичный вектор клонирования, используемый для анализа генов и манипуляций с геномом *C. glutamicum* представляет собой *C. glutamicum* – *E. coli* шатл – вектор, содержащий селективный маркер и сайт множественного клонирования, часто расположенный во фрагменте гена *lacZ* (*lacZ α*) для удобства прямого отбора рекомбинантных плазмид (синие / белые колонии) в соответствующем штамме *E. coli*. В качестве селективных маркеров для отбора трансформантов часто выступают гены устойчивости к антибиотикам. Широко используются гетерологичные гены антибиотической устойчивости к канамицину, хлорамфениколу, эритромицину и гентамицину, происходящие от грамотрицательных бактерий, а также эндогенные детерминанты устойчивости к стрептомицину / спектиномицину и тетрациклину, обнаруженные в больших криптических плаزمиде *C. glutamicum* pCG4 и pAG1 (Baritugo et al, 2018; Tauch et al, 2003). В связи с ограничением использования в промышленных масштабах штаммов, содержащих плазмиды, несущие гены антибиотической устойчивости,

были предложены альтернативные селективные маркеры, как, например, ген *alr*, кодирующий аланинрацемазу, которая обеспечивает рост штаммов Δalr *C. glutamicum* в отсутствие D-аланина (Tauch et al, 2002).

Экспрессионные плазмидные векторы, представляющие собой частный случай векторов клонирования, стали важным инструментом для генной инженерии *C. glutamicum*. Экспрессия ключевых генов в мультикопийных векторах с репликонами из плазмид pBL1, pCG1, pGA1 позволила улучшить синтез целевых продуктов, что напрямую связано с увеличением дозы гена, приводящей к повышению метаболического потока к целевому продукту (Nešvera and Pátek, 2011). Например, использование мультикопийной плазмиды на основе pCG1 ориджина репликации значительно усилило экспрессию биосинтетического оперона транскетолазы, что привело к увеличению продукции ароматических аминокислот (Ikeda et al, 1999).

Недавно адаптивная лабораторная эволюция была использована для разработки плазмиды с увеличенным числом копий. Было обнаружено, что мутация ориджина репликации pCG1 вектора pCES208 приводит к 10-кратному увеличению числа копий плазмиды по сравнению с диким типом. Использование сконструированной высококопийной плазмиды pHCMS увеличило продукцию эндоксилаказы в рекомбинантном *C. glutamicum* (Choi et al, 2017). Еще одним примером получения высококопийных мутантных плазмид для создания экспрессионных векторов являются плазмиды pVC7H1 и pVC7H2, представляющие собой производные шатл - вектора pVC7N, сконструированного на базе репликона криптической плазмиды pAM330. Копийность pVC7H1 и pVC7H2 плазмид в *C. glutamicum* составляет более 100 и 300 копий на клетку, соответственно (Hashiro et al, 2019).

С другой стороны, снижение дозы гена в некоторых случаях может положительно сказаться на выходе целевого продукта как, например, когда продукт клонируемого гена токсичен для штамма-производителя, было предложено использовать ориджин репликации с низкой копийностью, такой как pNG2. Применение этой стратегии увеличивало производство изолейцина

путем моделирования экспрессии треониндегидратазы из *E. coli* без какого-либо отрицательного влияния на рост клеток (Guillouet et al, 1999).

Конструирование плазмид с совместимыми источниками репликации обеспечивает альтернативный интеграции в хромосому подход к экспрессии больших или множественных оперонов генов в рекомбинантном штамме. Совместимость репликонов важна при конструировании плазмидных штаммов - продуцентов, поскольку от нее зависит стабильность сосуществования плазмид в штамме - хозяине. Необходимость поддержания нескольких плазмид возникает в связи с ограниченной вместимостью существующих *C. glutamicum* – *E. coli* векторов, размер которых еще до введения целевых генов составляют 4–5 т. п. н. из-за наличия двух ориджинов репликации и селективного маркера (Pátek and Nešvera, 2013). Известно, что при превышении конечного размера вектора 10 т. п. н. могут возникать нестабильность плазмиды и низкая эффективность трансформации (Ohse et al, 1995).

Так повышение эффективности транскрипции и обеспечение более строгого контроля экспрессии генов при использовании разных промоторов и регуляторов было достигнуто применением таких векторов как *CoryneBrick* (pVeB1cRFP, pBbEB2-c-RFP, pBbEB5RFP) и вектора pZ8 с совместимыми репликонами pBL1 и pHM1519 (Kang et al, 2014a). Была продемонстрирована возможность конструирования двухплазмидных экспрессионных систем *C. glutamicum*, в которых ориджин репликации pBL1 совместим с репликонами из pCG1, pSR1, pH1519, pGA1 и pCC1 плазмид (Baritugo et al, 2018). Реализация стратегий, требующих экспрессии генов на трех плаزمидках, была успешно продемонстрирована использованием плазмид pVWEx1, pEKEx3 и pECXT99A с совместимыми репликонами pCG1, pBL1 и pGA1, соответственно (Jorge et al, 2017b).

Для изучения экспрессии генов и их регуляции, а также для поиска новых промоторных элементов *C. glutamicum* были сконструированы векторы для клонирования промоторов. Наиболее удобные и универсальные системы, созданные для изучения активности промоторов *in vivo*, представляют собой плазмиду, несущую беспромоторный репортёртерный ген. В качестве

репортеров обычно выступают гены, кодирующие легко детектируемые и поддающиеся количественному анализу белки. Удобными репортерными генами являются, например, некоторые ферменты, активные в *C. glutamicum*: *lacZ*, β -галактозидаза из *E. coli*, *cat*_T, хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT) из Tn9, *nptII*, аминогликозидфосфотрансфераза из Tn5, *uidA*, β -глюкоконоридаза из *E. coli* и *amy*, α -амилаза из *Streptomyces griseus* (Nešvera and Pátek, 2008). Кроме того, пигмент меланин из *Streptomyces glaucescens* (Adham et al, 2001) и зеленый флуоресцентный белок (GFP), выделенный из медузы *Aequorea victoria* (Letek et al, 2006), являются дополнительными репортерными белками, легкодетектируемыми в *C. glutamicum*. Помимо векторов для анализа промоторных областей, были сконструированы векторы для идентификации и оценки Pho-независимых терминальных элементов (Bardonnet and Blanco, 1991).

2.2.3. Инструменты для моделирования экспрессии генов

Моделирование экспрессии генов является неотъемлемой частью рационального конструирования штаммов, поскольку оно позволяет точно направлять метаболические потоки. Регуляция экспрессии генов *C. glutamicum* как и прочих прокариот осуществляется на уровне транскрипции и трансляции. Поскольку промоторы определяют уровень транскрипции генов, они стали мощными инструментами в метаболической инженерии. Промоторы принято классифицировать по σ субъединицам (факторам) холофермента РНК-полимеразы, которые отвечают за распознавание соответствующих промоторных последовательностей. Геном *C. glutamicum* кодирует семь различных σ - факторов (первичные σ^A , σ^B и альтернативные факторы σ^C , σ^D , σ^E , σ^H и σ^M). Базовая структура промотора *C. glutamicum* представлена «-35 областью» TTGNCA и расширенной «-10 областью» GNTANANTNG (нуклеотиды, выделенные жирным шрифтом, встречаются более чем в 80% последовательностей, прочие более чем в 35% последовательностей; основные гексамеры подчеркнуты). Нуклеотиды в консенсусе «-35 области» *C. glutamicum* гораздо менее консервативны, чем у *E. coli*, и не могут быть идентифицированы во многих промоторах *C. glutamicum* (Pátek et al, 2013). Промоторы принято

подразделять на два типа: индуцибельные и конститутивные. Для биотехнологических целей конститутивные промоторы обычно предпочтительнее индуцибельных, так как они не требуют индуктора и оптимизации условий культивирования.

Исторически биотехнологическая промышленность в первую очередь испытывала потребность в сильных конститутивных промоторах. Сильные коринебактериальные конститутивные промоторы генов *cspB*, *gapA*, *tuf*, *sod* использовались для конструирования экспрессионных векторов, а также для замены нативных промоторов желаемых генов в хромосоме *C. glutamicum* (Pátek et al, 2013).

Сильные промоторы также были найдены у коринебактериальных фагов. Несколько промоторов коринефага ϕ GA1 были идентифицированы и проанализированы (Pátek et al, 1996). Так, например, сильный промотор PF104 фага ϕ GA1 в дальнейшем использовался в векторах клонирования. С использованием сильного промотора коринефага BFK20 была сконструирована система сверхэкспрессии рекомбинантной РНК в *C. glutamicum* (Hashiro et al, 2019).

Для продуцента часто важно не усилить, а наоборот ослабить экспрессию определённых генов для перенаправления метаболического потока и снижения уровня побочного продукта. Следовательно, оптимизация экспрессии задействованного биосинтетического пути в рекомбинантном штамме важна для сбалансированной продукции целевых метаболитов и поддержания роста клеток. Чтобы расширить инструменты для «тонкой настройки» экспрессии генов, промоторы хромосомных генов *C. glutamicum*, участвующих в центральном углеродном и аминокислотном метаболизме, были выбраны для анализа их силы. Шестнадцать эффективных нативных промоторов с широким диапазоном сил ($P_{gnk} > P_{tuf} > P_{fba} > P_{glyA} > P_{lysC} > P_{ikt} > P_{pyc} > P_{hom} > P_{glnA} > P_{sod} > P_{gnd} > P_{ddh} > P_{lysA} > P_{aspB} > P_{dapB} > P_{dapA}$) были охарактеризованы для точного моделирования экспрессии генов *C. glutamicum* (Shang et al, 2017). Другая группа исследователей смогли создать ограниченный диапазон уровней экспрессии, объединив три известных промотора (P_{tac} , P_{cspB} и P_{sod}) с тремя разными сайтами связывания рибосом (RBS)

генов *lacZ*, *cspB* и *sod*. Комбинаторная сборка промоторных и RBS элементов с разной силой обеспечивала четкую дифференциальную экспрессию двух репортерных генов, кодирующих eGFP и mCherry, что позволило осуществить «тонкую настройку» экспрессии множества генов (Ravasi et al, 2012). Некоторое время назад был опубликован синтетический подход к моделированию экспрессии генов, в котором библиотека полностью рандомизированных участков ДНК была проверена на промоторную активность (Yim et al, 2013). В результате были разработаны векторы pCES208, содержащие синтетические промоторы разной силы (PH36> PH30> PI64> PI16> PL26> PL10). Эти векторы были использованы в рекомбинантных штаммах *S. glutamicum* для увеличения продукции кадаверина, 5-аминовалерата, гамма-аминобутирата, лизина, эндоксилаказы, α -амилазы, фрагмента антитела верблюда (VHH), фрагмента антитела (scFv) и зеленого флуоресцентного белка (Varitugo et al, 2018). Также была сконструирована библиотека конститутивных промоторов на основе различных комбинаций консенсусных последовательностей «-10 области» *S. glutamicum* и «-35 области» *E. coli*. В дополнение к конститутивным промоторам была сконструирована синтетическая библиотека индуцибельных промоторов на основе P_{lac} промотора *E. coli* (Rytter et al, 2014).

Индуцибельные промоторы представляют собой удобные инструменты для контролируемой экспрессии гена и являются ключевыми элементами плазмидных экспрессионных векторов, а также используются для лабораторного конструирования штаммов и исследовательских целей. Подавляющее большинство используемых векторов экспрессии *S. glutamicum* содержат гетерологичные индуцибельные промоторы. Системы индукции, состоящие из термоиндуцибельных промоторов P_RP_L и гена *cI857*, кодирующего температурно-чувствительный репрессор фага λ (Tsuchiya and Morinaga, 1988), а также ряда индуцируемых IPTG промоторов P_{lac} , P_{lacUV5} , P_{tac} и P_{trc} в комбинации с *lacI* (*lacI^q*) репрессором, исходно сконструированные для *E. coli*, были адаптированы для применения в *S. glutamicum* в лабораторных условиях (Nešvera and Pátek, 2008). Альтернативной системой экспрессии, разработанной для крупномасштабных производств, является арабинозная система индукции,

состоящая из промотора P_{araBAD} и генов, кодирующих позитивный регулятор *araC* и транспортер арабинозы *araE* из *E. coli*. Система позволяет моделировать уровень экспрессии индуцибельного промотора P_{araBAD} в широком диапазоне с помощью различных концентраций арабинозы (Zhang et al, 2012). Сообщалось также о создании экспрессионного вектора pCLTON1 с тетрациклиновой системой индукции, включающей в себя контролируемый тетрациклином репрессор транскрипции TetR, находящийся под контролем *C. glutamicum* P_{gapA} промотора, и гетерологичный модифицированный промотор P_{tet} из *B. subtilis*. Сконструированный вектор обеспечивал строго регулируемую экспрессию генов в *C. glutamicum* и был использован в промышленности для производства аминокислот (Lausberg et al, 2012). Была описана комбинированная система индукции, она состояла из гена РНК-полимеразы фага Т7 под контролем P_{lacUV5} промотора, интегрированного в хромосому, и экспрессионного вектора pMKEx2, позволяющего клонировать целевые гены под контроль промотора P_{T7lac} . В отсутствие индуктора система была сильно репрессирована, тогда как после максимальной IPTG индукции экспрессия репортерного гена увеличилась в 450 раз по сравнению с не индуцированным состоянием (Equbal et al, 2013; Kortmann, 2015).

К настоящему моменту охарактеризовано несколько природных индуцибельных промоторов *C. glutamicum*, применяемых для контролируемой экспрессии генов. Система экспрессии, индуцируемая пропионатом, на основе промотора P_{prpD2} *C. glutamicum* и активатора PrpR подходит для использования, как в лабораторных исследованиях, так и в промышленных масштабах, поскольку в ней используется дешевый индуктор в малых количествах (1 мг/л), она работает в минимальных и сложных средах. Кроме того, поскольку индуктор (пропионат) потребляется клетками, происходит постепенное снижение уровня транскрипции по мере исчерпания индуктора (Plassmeier et al, 2012). Были описаны промоторы *C. glutamicum*, индуцируемые ацетатом, глюконатом и мальтозой (Pátek et al, 2013). Индуцируемые глюконатом промотор P_{git1} и мальтозой промотор P_{malE1} применяли в *C. glutamicum* для контролируемой экспрессии гена *xynA*, кодирующего ксиланазу из *Clostridium*

cellulovorans (Okibe et al, 2010). Недавно было обнаружено, что промотор гена *NCgl2319 C. glutamicum*, который индуцируется бензиловым спиртом, может быть использован в качестве эффективной системы экспрессии (Liu et al, 2020).

Изменение экспрессии гена также возможно на уровне трансляции посредством модификации 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) с помощью инженерии сайта связывания рибосомы (RBS) как, например, использование малой антисмысловой РНК (asRNA), применение библиотек RBS, в том числе синтетических RBS, а также замена природных RBS на консервативную последовательность Шайна-Далгарно (SD). Антисмысловая РНК является мощным инструментом для моделирования экспрессии генов посредством интерференции и ослабления транскрипции мРНК, расщепления мРНК или блокирования трансляции гена. Использование *odhA*-антисмысловой РНК в рекомбинантном *C. glutamicum* позволило снизить экспрессию гена *odhA*, кодирующего комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы, что привело к увеличению продукции глутамата (Kim et al, 2009). Кроме того, недавно обнаруженные у *C. glutamicum* малые РНК (sRNA) могут быть полезны для инженерии *C. glutamicum* (Mentz et al, 2013). Сообщалось о разработке синтетического лизинового рибопереключателе и его применении для метаболического контроля производства лизина у *C. glutamicum* (Zhou and Zeng, 2015). Было показано, что для эффективной инициации трансляции предполагаемая природная RBS была заменена консенсусной коринебактериальной последовательностью SD для достижения высокого уровня экспрессии нитрилдегидратазы из *Rhodococcus rhodochrous* в *C. glutamicum* (Kang et al, 2014b).

Транскрипционные терминаторы являются важными регуляторными элементами наряду с промоторами и сайтами связывания рибосомы. Терминатор *rrnB T1* из *E. coli* широко применяется в *C. glutamicum* для создания векторов экспрессии, таких как *pKEx3*, *pVWEx1* и *pZ8-1* (Lange et al, 2018). Терминатор фага T7 из *E. coli* также успешно использовали для создания IPTG-индуцируемого вектора экспрессии *pMKEx2* (Kortmann et al, 2015). Палиндромные структуры, которые могут выполнять функцию терминатора

транскрипции, были обнаружены в нижележащих областях коринебактериальных генов, таких как *thrB*, *sodA* и *nusG* (Srivastava and Deb, 2002). Секвенирование транскриптома *C. glutamicum* ATCC 13032 обнаружило 69 малых РНК Rho-независимых терминаторов (Mentz et al, 2013), которые могут быть использованы в генной инженерии *C. glutamicum*. Rho-независимые двунаправленные терминаторы транскрипции, часто встречающиеся в фаговых геномах на границе противоположно направленных оперонов ранних и поздних генов, такой терминатор был идентифицирован, например, у коринефага ВФК20 (Bukovska et al, 2006).

2.2.4. Методы модификации генома *C. glutamicum*

С появлением первых полностью секвенированных геномов *C. glutamicum* ATCC 13032 (Ikeda and Nakagawa 2003; Kalinowski et al, 2003) и *C. glutamicum* R (Yukawa et al, 2007) была заложена основа для полногеномного анализа штаммов *C. glutamicum* посредством транскриптомики (Wendisch, 2003; Hüser et al, 2005), протеомики (Hermann et al, 2001), метаболомики (Bartek et al, 2008) и флюксомики (Becker et al, 2007). Полногеномный анализ *C. glutamicum* позволил получить представление о структуре его метаболической сети. Накопленная информация о геноме используется для создания штаммов - продуцентов с полезными свойствами путем введения биосинтетических путей для получения целевого продукта, а также для выявления «узких мест» метаболизма для дальнейшей оптимизации штаммов (Yang and Yang, 2017). Полногеномный анализ успешно использовался для модификации метаболических путей с целью увеличения продукции L-лизина, L-глутамата и L-валина в *C. glutamicum* (Kalinowski et al, 2003; Yang and Yang, 2017; Bartek et al, 2008).

Первые инструменты для осуществления манипуляций с геномом *C. glutamicum* были разработаны благодаря достижениям в технологии рекомбинантных ДНК. Плазмидные векторы, способные интегрироваться в хромосому посредством гомологичной рекомбинации, стали традиционными инструментами, используемыми для конструирования делеций, замен и вставок

генетического материала в хромосоме *C. glutamicum*. Эти векторы, за некоторыми исключениями, основаны на плазмидных векторах *E. coli*, не способных реплицироваться в *C. glutamicum*, содержат маркер антибиотической устойчивости и конструируемую модификацию, фланкированную областями гомологии. Большинство интегративных векторов *C. glutamicum* содержат *oriT* и *mob* области конъюгированной плазмиды RP4, таким образом, векторы могут быть введены в *C. glutamicum* не только посредством электротрансформации, но также и путем конъюгации. Ряд интегративных векторов как, например, pSFKT2, pBS5T и pCRD206 были сконструированы на основе температурочувствительного коринебактериального репликона, несущего мутацию в *rep* гене (Nešvera and Pátek, 2011). Эти векторы стабильно реплицируются в *C. glutamicum* при 25°C, тогда как при повышении температуры до 34°C, могут существовать в клетке только в интегрированном в хромосому состоянии. Все векторы интегрируются в геном за счет единичного акта рекомбинации между областями гомологии клонированной в вектор и его хромосомальной копией. Для безмаркерной генетической модификации второе событие кроссинговера должно происходить в другой точке гомологичной последовательности (Nešvera and Pátek 2011; Schäfer et al, 1994; Schwarzer and Pühler 1991).

Для облегчения отбора клонов с редкими событиями двойного кроссинговера в *C. glutamicum* часто применяются контр-селективные маркеры. Для этой цели широко используется ген *sacB* из *B. subtilis*. Этот ген кодирует фермент левансахаразу, который превращает сахарозу в токсичный метаболит для грамотрицательных бактерий, а также для грамположительной бактерии *C. glutamicum* в связи с особенностью строения ее клеточной стенки (Jäger et al, 1992). Однако применение *sacB* затруднено из-за высокого уровня ложноположительных колоний и частой спонтанной инактивации (Tan et al, 2012). Было продемонстрировано, что другие контр-селективные маркеры, такие как гены *urp* (Ma et al, 2015) и *rpsL* (Kim et al, 2011; Wang et al, 2019a), кодирующие урацилфосфорибозилтрансферазу (UPRTase) и рибосомный белок S12, соответственно, являются более эффективными для применения в *C. glutamicum*, чем традиционно используемый *sacB*. В то же время для

применения двух вышеупомянутых маркеров требуются предварительно сконструированные штаммы (штамм *Δurr* для маркера *urr* и штамм *RpsLK43N* для маркера *rpsL*) и специфические соединения для контр-селекции.

Применение контр-селективных маркеров помогает устранить клоны, не прошедшие двойной кроссинговер, что значительно снижает нагрузку на скрининг, но не оказывает влияние на саму эффективность рекомбинации. Таким образом, инженерия генома *C. glutamicum*, основанная только на гомологичной рекомбинации с использованием нереплицирующихся векторов, является очень трудоемким и длительным процессом. Эффективность данного подхода была несколько увеличена за счет использования кодон-оптимизированного гена эндонуклеазы I-SceI, кодируемого интроном из *Saccharomyces cerevisiae* (Jacquier and Dujon, 1985), в сочетании с соответствующим сайтом распознавания I-SceI (Wu et al, 2020) или в комбинации с Cre/*loxP* сайт-специфической системой рекомбинации бактериофага P1 (Cianfanelli et al, 2020; Suzuki et al, 2005a). Обе системы позволяют увеличить частоту прохождения второго кроссинговера за счет стимулирования рекомбинации в результате создания двухцепочечного разрыва ДНК. Однако низкоэффективная репарация ДНК *C. glutamicum* по-прежнему препятствует получению желаемых трансформантов.

Техника «рекомбиниринга», основанная на использовании рекомбиназ фагового происхождения, впервые разработанная для *E. coli*, недавно была адаптирована для модификации генома *C. glutamicum*. RecA независимая система рекомбинации, основанная на использовании рекомбиназы RecT Rac профага *E. coli*, позволяет достичь высокоэффективной рекомбинации с использованием коротких гомологичных последовательностей оцДНК в качестве субстратов. Была продемонстрирована возможность создания точечных мутаций в геноме *C. glutamicum* с помощью рекомбиназы RecT Rac профага *E. coli* с использованием олигонуклеотидов в качестве оцДНК субстратов (4.7 рекомбинантов на 100 клеток – максимально продемонстрированная эффективность) (Binder et al, 2013). В более поздних исследованиях была оптимизирована длина и концентрация олигонуклеотида,

протестирована модификация оснований и тенденция прицеливания к определенной цепи ДНК (ведущей либо отстающей), что дополнительно повысило эффективность рекомбинации оцДНК у *C. glutamicum* (Wu et al, 2020). Однако из-за отсутствия системы селекции для отбора мутаций и низкой эффективности рекомбинации (от 0,1-10% для точечных мутаций до 10^{-5} - 10^{-6} для более крупных модификаций) в подавляющем большинстве случаев требуется скрининг большого количества колоний.

В связи с этим был предложен метод RecFACS, объединяющий технологию «рекомбиниринга» для *C. glutamicum* с использованием рекомбиназы RecT *E. coli* Рас профага и недавно разработанную наносенсорную технологию, которая позволяет обнаруживать и изолировать продуктивные мутанты на клеточном уровне с помощью быстрой и автоматической сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). В качестве метаболитного сенсора (pSenLys) выступал регулятор транскрипции LysG, который осуществляет активацию транскрипции гена *lysE* в ответ на увеличение концентрации L-лизина в клетке. Слияние генов *lysE* с *eyfp* приводит к тому, что клетки излучают повышенную флуоресценцию при увеличенных показаниях концентрации L-лизина. С использованием данной стратегии был выделен активный мутант-продуцент L-лизина с 12 различными аминокислотными заменами в целевом гене *murE* (Binder et al, 2013). Однако метод RecFACS требует создания биосенсоров, специфичных для целевого гена, и FACS для отбора колоний, что ограничивает его применение в систематической инженерии генома.

Несколько позднее простой и эффективный метод «рекомбиниринга», основанный на паре экзонуклеаза – рекомбиназа RecE + RecT (RecET) *E. coli* Рас профага был адаптирован для стимулирования рекомбинации в *C. glutamicum* (Huang et al, 2017). В этом методе в дополнение к вышеупомянутой рекомбиназе RecT используется кодируемая фагом 5'-3' дцДНК-зависимая экзонуклеаза RecE (Hall et al, 1993), необходимая для рекомбинации с линейным дцДНК фрагментом в качестве субстрата. Было продемонстрировано, что система на основе фаговых рекомбиназ RecET способна обеспечивать

рекомбинацию между бактериальной хромосомой и линейным фрагментом с вырезаемым селективным маркером, фланкированным плечами гомологии для получения делеции генов и инсерций коротких фрагментов ДНК. Хотя рекомбинационная активность RecET в *C. glutamicum* ATCC14067 была ниже, чем в *E. coli*, максимальная эффективность в оптимизированных условиях составила $1,41 \pm 0,18 \times 10^3$ колоний при длине плеч гомологии в 800 п. н. Система RecET была успешно объединена с Cre/*loxP* (Huang et al, 2017; Luo et al, 2021) для безмаркерной делеции гена и с CRISPR/Cpf1 для одновременного редактирования нескольких генов и создания протяженных делеций (Zhao et al, 2020).

Найденная у бактерий и архей адаптивная иммунная система CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (CRISPR-associated), представляющая собой специфический механизм защиты от фаговой инфекции и переноса конъюгативных плазмид в природе, основанный на РНК-управляемой эндонуклеазной активности, была адаптирована для направленного редактирования геномов широкого круга различных микроорганизмов и клеточных линий.

Среди большого количества различно устроенных CRISPR/Cas систем, одной из самых простых и, как следствие, широко используемой для геномного редактирования является система II типа, кодирующая единственный эффекторный белок Cas9 (Jensen, 2015). Для системы CRISPR/Cas9 из *Streptococcus pyogenes* характерно наличие эндонуклеазы Cas9, а в роли направляющей РНК выступает дуплекс, состоящий из зрелой CRISPR РНК (crРНК) и дополнительной транс-активирующей РНК (tracrРНК). Комплекс crРНК-tracrРНК-Cas9 распознаёт ДНК-мишени, содержащие последовательности комплементарные crРНК в непосредственной близости от PAM мотива (protospacer-adjacent motif). Сначала Cas9 распознаёт PAM (NGG), а затем прилегающая к PAM область ДНК проверяется на наличие комплементарной к crРНК последовательности. Разрезание ДНК-мишени осуществляется путём внесения двух одноцепочечных разрывов доменами RuvC и HNH белка Cas9, в результате чего образуется двуцепочечный разрыв с

тупыми концами в протоспейсерной последовательности на расстоянии трех нуклеотидов от 3'-конца PAM (Jensen, 2015).

Природная система защиты от чужеродной ДНК CRISPR/Cas была превращена в мощнейший инструмент генной инженерии с огромным потенциалом, когда была продемонстрирована возможность перепрограммирования нуклеазы Cas9 для создания двухцепочечного разреза в любом желаемом участке ДНК путем замены 20 п. н. в crPНК (Jinek et al, 2012). Для удобства редактирования геномов с помощью системы CRISPR/Cas9 crPНК и tracrPНК были объединены в одну химерную молекулу sgPНК (single-guide PНК), которая сочетала в себе адресную специфику crPНК со шпилечными структурными tracrPНК. В отличие от направленного редактирования генома с помощью ZFN (zinc-finger nucleases) или TALEN (transcription activator-like effector nucleases) для изменения специфичности рибонуклеопротеинового комплекса crPНК-tracrPНК-Cas9 (sgPНК-Cas9) не требуется изменение структуры белка, необходимо лишь конструирование короткой crPНК (sgPНК).

Внедрение системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома *C. glutamicum* осложнялось токсичностью экспрессии Cas9 (Cho et al, 2017). В связи с этим изначально для *C. glutamicum* был адаптирован метод CRISPR интерференции (CRISPR interference, CRISPRi), основанный на применении «мертвого» Cas9 (dead Cas9, dCas9), содержащего мутации D10A и H840A, приводящие к нарушению нуклеазной активности (Bikard et al, 2013; Cleto et al, 2016). Технология CRISPRi применяется для регулирования уровня транскрипции целевого гена за счет эффекта стерического препятствия и целесообразна для подавления транскрипции ключевых генов, которые не могут быть инактивированы путем делеции (Wen et al, 2017). В *C. glutamicum* была продемонстрирована CRISPR/dCas9 опосредованная репрессия транскрипции единичного гена (Cleto et al, 2016; Lee et al, 2018), а одновременное подавление нескольких генов было достигнуто с использованием системы CRISPR-dCpf1 (dead Cpf1) (Liu et al, 2019; Li et al, 2020).

В качестве альтернативы CRISPR/Cas9 для редактирования генов *C. glutamicum* был разработан инструмент, основанный на CRISPR/Cpf1 системе из

Francisella novicida. CRISPR/Cpf1 система была успешно совмещена с RecT-опосредованной рекомбинацией с использованием оцДНК в качестве матриц для репарации двухцепочечных разрывов, создаваемых Cpf1, что позволило реализовать такие модификации как делеция, инсерция и точечная мутация (Jiang et al, 2017).

Сразу после этой работы впервые было продемонстрировано редактирование генома *C. glutamicum* с применением системы CRISPR/Cas9 с использованием кодон-оптимизированного гена Cas9 со сниженной токсичностью в комбинации с RecT-опосредованной рекомбинацией (Cho et al, 2017). В параллельных исследованиях снижение токсичности Cas9 было достигнуто путем контроля экспрессии Cas9 строгим индуцибельным промотором (Liu et al, 2017b; Peng et al, 2017).

Такие аспекты как стабильность экспрессии Cas9, эффективность трансформации и удобство излечения плазмид, несущих Cas9, дизайн вектора, кодирующего crPНК, последовательность PAM, длина спейсерной последовательности и тип репарационной матрицы были оптимизированы для редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 системы в *C. glutamicum* (Wang et al, 2021). Применение системы CRISPR/Cas было расширено от одновременного редактирования одного до нескольких генов и удаления больших фрагментов ДНК (Liu et al, 2017b; Wang et al, 2018; Zhao et al, 2020).

Благодаря развитию CRISPR/Cas технологии был разработан метод направленного редактирования оснований. Данный метод позволяет создать миссенс или нулевую мутацию в гене посредством однонуклеотидной замены без введения двухцепочечного разрыва ДНК (Komor et al, 2016), что особенно актуально для организмов с неэффективной системой гомологичной рекомбинации как, например, *C. glutamicum*. Для осуществления однонуклеотидной замены основания С-Т был разработан «редактор цитозиновых оснований» CBE (cytosine base editor), основанный на совмещении функций индуцированной активацией цитидиндезаминазы (AID) и системы CRISPR/Cas9. Подход позволяет осуществлять замену оснований с эффективностью 100%, 87,2% и 23,3% в одном, двух и трех локусах *C.*

glutamicum, соответственно (Wang et al, 2018). Ряд «редакторов адениновых оснований» ABE (adenine base editor), позволяющих преобразовывать специфические пары нуклеотидных оснований А-Г в зоне «окна редактирования» CRISPR-Cas9, были созданы на базе химерных ферментов, полученных слиянием аденозиндезаминазы из *E. coli* (TadA) и различных вариантов модифицированного Cas9 (Wang et al, 2019b). Благодаря объединению вышеуказанных инструментов CBE и ABE в одной системе, был разработан двунаправленный «редактор оснований» TadA-dCas9-AID, который обеспечивал замены оснований С-Т, С-Г и А-Г в «окне редактирования» (Deng et al, 2020). Для расширения применения метода в *C. glutamicum* «редактор оснований» ВЕЗ, позволяющий осуществлять замены С-Т, был сконструирован путем слияния цитидиндезаминазы (rAPOBEC1), nCas9 (DA10 никазная активность) и ингибитора урацил-ДНК-гликозилазы (UGI), размещенного на С-конце слияния rAPOBEC1-nCas9, который ингибировал путь эксцизионной репарации оснований ДНК и значительно повышал эффективность преобразования С - Т до 90%.

Перестройка генома становится все более востребованной техникой для изучения функций генома. Делеция протяженных фрагментов и крупномасштабная перестройка генома у *C. glutamicum* была реализована с использованием системы Cre/*loxP* (Suzuki et al, 2005b). В общей сложности 11 отдельных геномных областей (до 250 т. п. н., 7,5% генома) были успешно удалены. Для осуществления ряда последовательных делеций была использована пара мутантных сайтов *lox* (*lox66* и *lox71*), которые при Cre-опосредованной рекомбинации генерировали интактный для последующих раундов рекомбинации сайт *lox72* (Suzuki et al, 2005a; Hu et al, 2014). Помимо Cre/*lox* система на основе эндонуклеазы I-SceI, узнающей специфическую последовательность длиной 18 пар оснований, была адаптирована в *C. glutamicum* для нокаута генов (Suzuki et al, 2005c; Ma et al, 2015; Wu et al, 2020). Следует отметить, что для удаления гена/геномной области сайт распознавания рекомбиназы должен быть введен в хромосому заранее, в связи с чем

инструменты сайт-специфической рекомбинации обычно применяются в сочетании с инструментами на основе гомологичной рекомбинации.

Другим инструментом, используемым для редактирования генома, являются транспозоны. Транспозоны позволяют осуществить инактивацию генов посредством случайной встройки (Alain et al, 1994), а также интеграцию одной или нескольких копий целевой кассеты. Многие идентифицированные мобильные элементы, такие как IS31831, miniTn31831, Tn14751, IS1249, Tn5 (Wang et al, 2021), а также mini-Mu (Gorshkova et al, 2018), были использованы для модификации генома *C. glutamicum*. Все упомянутые транспозоны имеют различную емкость, эффективность транспозиции и предпочтение последовательности интеграции (предпочтение богатых АТ или GC областей), в связи с чем комбинированное применение различных мобильных элементов помогает компенсировать недостатки каждого, позволяя, например, инактивировать большее число генов. В частности, на основе комбинации miniTn31831 и Tn5 был успешно получен пул из 13000 транспозонных мутантов, что соответствовало библиотеке из 2300 мутантов штаммов с одним инактивированным геном, покрывающих 75% генов *C. glutamicum*. Транспозон может быть использован не только для нокаута одного случайного гена, но и для рандомного удаления фрагментов хромосом в сочетании с нуклеазными системами (Goryshin et al, 2003; Tsuge et al, 2007). Случайная делеция протяженных участков была реализована на основе комбинации IS31831 и системы вырезания Cre/loxP и применялась для редуцирования генома *C. glutamicum* (Tsuge et al, 2007). По сравнению с традиционными стратегиями (геномный анализ в сочетании с точной делецией) (Baumgart et al, 2016) эта стратегия рассматривается как более быстрый способ создания минимального бактериального генома (Suzuki and Inui, 2013).

В связи с ограниченной емкостью транспозоны достаточно редко используются для интеграции генов в хромосому. Исключением является система транспозиции mini-Mu, разработанная на основе Mu-фага *E. coli* (Gorshkova et al, 2018). Двухкомпонентная система Mu-транспозиции позволяет выполнять интеграцию целевой кассеты как части транспозиционной единицы

mini-Mu из интегративной плазмиды в хромосому *C. glutamicum* с возможностью ее последующей внутривхромосомной амплификацией до желаемого количества копий в результате экспрессии генов, кодирующих факторы транспозиции MuA и MuB. Разработанная система подходит для интеграции протяженных фрагментов ДНК, а также позволяет ввести вторую и последующие копии в геном *C. glutamicum*. Существенным недостатком данного метода являются возможные неконтролируемые перестройки бактериального генома (включая делеции и инверсии больших фрагментов хромосомной ДНК) в результате амплификации mini-Mu единиц (Akhverdyan et al, 2011).

Протяженные и повторяющиеся инсерции также могут быть введены в хромосому *C. glutamicum* с использованием фаговых систем сайт-специфической рекомбинации. Метод, основанный на применении фаговых интеграз, позволяет вводить в хромосому ДНК фрагменты размером до нескольких десятков т. п. н. (Huang et al, 2019). К недостаткам данного метода можно отнести ограниченную емкость интегративного вектора и возможную токсичность целевой кассеты для промежуточного хозяина.

Плазмидные векторы, способные к интеграции в хромосомный *attB*-сайт, были сконструированы с использованием элементов сайт-специфических систем рекомбинации различных умеренных фагов, таких как коринефаги $\phi 16$ (Moreau et al, 1999a), $\phi 304L$ (Moreau et al, 1999b), β -фаг *C. diphtheria* (Oram et al, 2007) и $\phi AAU2$ “*Arthrobacter aureus*”C70 (Le Marrec et al, 1996). Поскольку дикие штаммы обычно имеют 1-2 природных фаговых *attB*-сайта, возникает необходимость во введении дополнительных искусственных сайтов в бактериальный геном.

Был предложен метод интеграции в хромосому *C. glutamicum*, основанный на применении интегразы фага TP901-1, благодаря которому была реализована интеграция двух репортерных генов. Вектор pJS31 содержал синтетическую кассету, фаговый *attP*-сайт для интеграции, а также бактериальный *attB*-сайт для последующего раунда интеграции, сайт множественного клонирования и два модифицированных сайта *loxP* для

удаления нежелательных элементов вектора (Shen et al, 2017). В другом исследовании две безмаркерные интегративные системы были разработаны на основе актинофагов ϕ C31 и ϕ BT1 (Marques et al, 2020).

При создании штаммов-продуцентов полученные позитивные мутации часто необходимо комбинировать для быстрой и безопасной инженерии штаммов. Для этой цели широко используется общая трансдукция или электротрансформация геномной ДНК. Однако, насколько нам известно, ни один из этих методов не был продемонстрирован для применения в *S. glutamicum* на сегодняшний день.

2.3. Гомологичная рекомбинация

Гомологичная рекомбинация - это вид генетической рекомбинации, в процессе которой происходит обмен участками ДНК, нуклеотидные последовательности которых идентичны друг другу либо имеют значительную гомологию. Гомологичная рекомбинация - это универсальный процесс, присущий всем клеточным формам жизни, который позволяет создавать разнообразие в популяции и отвечает за восстановление поврежденных участков генетического материала.

Описаны два механизма гомологичной рекомбинации: инвазия цепи и односторонней отжиг. У бактерий двумя классическими путями, использующими механизм RecA- зависимой инвазии цепи, являются RecBCD и RecF пути. Путь RecBCD - это основной путь рекомбинации, осуществляемый многими бактериями для восстановления двухцепочечных разрывов в ДНК. Для восстановления одноцепочечных разрывов ДНК бактерии используют RecF путь гомологичной рекомбинации. Путь RecF может также восстанавливать двухцепочечные разрывы, когда путь RecBCD инактивирован мутациями. Как и путь RecBCD путь RecF требует RecA для инвазии цепи. Эти два пути также схожи на стадии «миграции ветвей», в которой образовавшаяся структура Холлидея скользит вдоль рекомбинирующих дуплексов и последующей стадией ее разрешения (Kuzminov, 1999). Хотя существуют альтернативные пути репарации, которые включают различные комбинации Rec белков, ясно, что

RecA играет центральную роль в рекомбинационной репарации хромосомных повреждений, возникших вследствие физического или химического воздействия либо в процессе репликации ДНК.

Отличительной особенностью коринебактерий, в частности *C. glutamicum*, является отсутствие генов *recB*, *recC* и *recD*, осуществляющих RecA-зависимый RecBCD путь рекомбинации. В *C. glutamicum* были идентифицированы гомологи генов *E. coli* RecF пути, кодирующие ДНК связывающий белок RecF, оцДНК экзонуклеаза RecJ, вспомогательные белки RecN (RadB), RecO, RecR. Обнаруженный ген АТФ-зависимой ДНК-хеликазы *C. glutamicum* был лишь отдаленно родственен *recQ* из *E. coli*, но все же демонстрировал значительную степень гомологии с прочими представителями семейства RecQ. Был также выявлен гомолог гена *E. coli recA* ДНК-зависимой АТФ-азы и других связанных с рекомбинацией генов: *lexA*, *lig*, *oraA*, *polA*, *priA*, *radA*, *ssb* (Nakamura et al, 2003).

Второй механизм рекомбинации называется “путем однонитевого отжига”. Как следует из названия, однонитевой отжиг включает спаривание комплементарных оцДНК посредством RecA-независимого механизма, который запускается при двухцепочечных разрывах (Takahashi and Kobayashi, 1990). Этот путь осуществляют рекомбинационные белки, называемые белками одноцепочечного отжига (single-strand-anneling proteins, SSAPs), которые могут способствовать спариванию, обмену и инвазии цепей (Muniyappa and Radding, 1986, Hall and Kolodner, 1994; Noirot and Kolodner, 1998) (Рисунок 1).

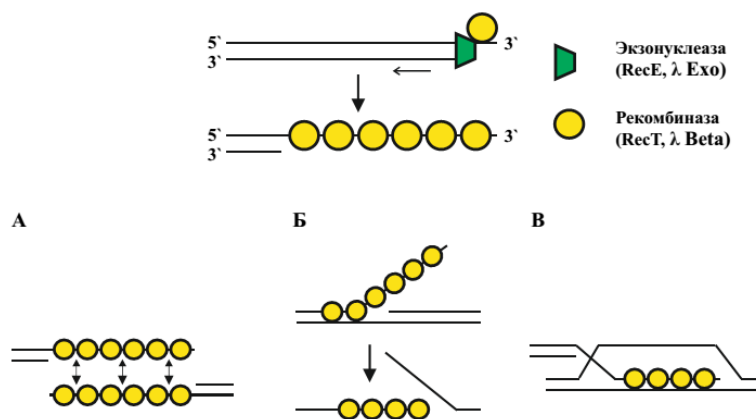


Рисунок 1 – Механизмы одноцепочечного отжига. Спаривание (А), обмен (Б) и инвазия цепей (В)

SSAP были обнаружены преимущественно в бактериофагах и в бактериальных геномах в составе профагов, хотя они также были идентифицированы у эукариот, включая дрожжи и человека. SSAP включают три суперсемейства: (1) семейство Red β / RecT, (2) семейство Etf и (3) эукариотическое семейство Rad52 (Iyer et al, 2002). Предположительно, что все эти рекомбиназы имеют фаговое происхождение и обычно расположены рядом с другими белками рекомбинации или репарации ДНК, такими как экзонуклеазы. Рекомбинационные системы бактериофагов представляют интерес с точки зрения создания инструментов для эффективной рекомбинации в бактериальных клетках.

2.3.1. Фаговые системы рекомбинации

2.3.1.1. Red система рекомбинации бактериофага λ

Система рекомбинации бактериофага λ является первой идентифицированной и одной из самых широко применяемых фаговых систем для конструирования бактериальных хромосом и плазмид. Эта система рекомбинации детально изучалась с момента ее открытия в середине 1960-х годов, когда было обнаружено, что фаг λ может эффективно реплицироваться в штаммах *E. coli* с делецией гена *recA*, что свидетельствовало, о наличии у λ фага своей собственной системы рекомбинации (Brooks and Clark, 1967). Вскоре было обнаружено, что наличие точечных мутаций в центральной области линейной хромосомы бактериофага (рядом с геном *cIII*) делает невозможной λ - рекомбинацию в штаммах с дефектным *recA* (Signer and Weil, 1968). Описанные мутации, также известные как *red* мутации, то есть дефектные по системе рекомбинации (recombination defective), стали интенсивно изучаться после открытия и описания системы рекомбинации *E. coli* (*recA*, *recB* и *recC*) (Stahl, 1998). Red-мутации располагались в генах *exo* (*reda*), *bet* (*red β*) (Radding, 1970), которые, как было показано, необходимы для RecA-независимой рекомбинации, наблюдаемой в λ фаге (Signer and Weil, 1968). Система рекомбинации бактериофага λ состоит из трех генов: *gam*, *bet* и *exo*, кодирующих соответствующие белки: Gam, Bet и Exo. Exo представляет собой АТФ-

зависимую экзонуклеазу, которая расщепляет дцДНК в направлении от 5'→3' со скоростью около 1000 нуклеотидов в секунду (Gillen et al, 1977) и оставляет за собой длинные выступающие 3'-одноцепочечные концы. Активный фермент состоит из трех идентичных субъединиц белка Eho, которые образуют тороид, внутрь которого проходит дцДНК, а выходит образовавшаяся оцДНК (Kovall and Matthews, 1997). Белок Vet фага λ связывается с оцДНК субстратами, длина которых превышает 35 нуклеотидов (Mythili et al, 1996), тем самым защищая ее от деградации нуклеазами клетки хозяина (Karakousis et al, 1998; Muniyappa and Radding, 1986). Белок Vet после связывания с оцДНК стимулирует отжиг комплементарных молекул (Kmiec and Holloman, 1981). Когда отжиг распространяется на дуплексные области, Vet катализирует вытеснение и замещение комплементарной цепи, осуществляя обмен цепями ДНК. Vet также способен осуществлять инвазию оцДНК внутрь двойной спирали (Rybalchenko et al, 2004). Сродство белка Vet к двухцепочечному промежуточному продукту, образовавшемуся в результате отжига двух комплементарных цепей ДНК, выше, чем к исходному субстрату – оцДНК (Karakousis et al, 1998), но при этом Vet не может связываться непосредственно с дцДНК. Электронно-микроскопический анализ показал, что в отсутствие ДНК мономеры Vet формируют неактивные кольцевые структуры, состоящие из 12 субъединиц, тогда как в присутствии оцДНК образуется активная форма белка, представляющая собой кольцо из 15-18 субъединиц. Вероятно, оцДНК оборачивается вокруг колец, образованных белком Vet, для предотвращения образования вторичных структур и поддержания определенной конформации, открытой для спаривания цепей. В присутствии дцДНК Vet образует спиральные филаменты (Passy et al, 1999). Было показано, что Vet, помимо Eho, также способен взаимодействовать и с другими белками (Muniyappa and Radding, 1986), в том числе с рибосомальным белком S1 и субъединицей РНК-полимеразы NusA (Venkatesh and Radding, 1993). Между Eho и Vet осуществляется специфическое белок-белковое взаимодействие, в связи с чем рекомбинация требует экспрессии обоих белков ортологичной пары, и ни один из членов пары не может быть заменен функциональным аналогом (Muyrers et al, 2000a). Gam - третий белок,

дополняющий Red систему рекомбинации бактериофага λ , он взаимодействует с RecB субъединицей RecBCD нуклеазы *E. coli*, ингибируя все известные ферментативные активности этого комплекса (Marsic et al, 1993). Хотя Gam не требуется непосредственно для Exo/Beta опосредованной рекомбинации в фаге λ (Enquist and Skalka, 1973), он значительно увеличивает эффективность рекомбинации, предотвращая атаку нуклеаз клетки хозяина на линейные дцДНК субстраты (Court et al, 2002). Было показано, что штаммы, экспрессирующие *gam*, демонстрируют увеличение эффективности рекомбинации по сравнению с мутантными штаммами *E. coli* Δ RecBC, Δ SbcBC или Δ RecD, обычно применяемыми для трансформации линейной ДНК (Murphy, 1998). Известно, что многие другие бактериофаги также кодируют функциональные аналоги Gam, которые препятствуют функционированию нуклеаз хозяина, например, белок фага T4 gp2 (Appasani et al, 1999) и белок фага Mu Gam (Abraham and Symonds, 1990). Эти белки связываются с концами дцДНК и защищают введенную линейную ДНК от деградации нуклеазой RecBCD. Хотя механизмы ингибирования нуклеаз хозяина различны, конечным результатом является защита линейной дцДНК от деградации. Гены Red *exo* и *bet*, наряду с *gam*, экспрессируются в составе оперона на ранней стадии инфицирования или при индукции лизиса профага (Court et al, 2002). Считается, что белки Exo и Beta играют важную роль во время репликации ДНК при литическом пути развития, повышая выход фаговой ДНК, хотя этот механизм еще не до конца изучен (Kuzminov, 1999). Биологическая функция Gam заключается в ингибировании деградации линейных конкатемеров геномной фаговой ДНК λ нуклеазой RecBCD (Enquist and Skalka, 1973). Белки Red Exo, Beta и Gam не являются жизненно важными для фага λ , но мутации в этих генах приводят к уменьшению количества бляшек (Enquist and Skalka, 1973). Известно, что белки Red также участвуют в фаговой трансдукции, хотя и играют менее значимую роль по сравнению с RecA (Kuzminov, 1999). Кроме того, поскольку условия, запускающие литический цикл λ -профагов, к примеру ультрафиолет, также могут вызывать повреждение ДНК, белки Red важны для восстановления образовавшихся двухцепочечных разрывов (Poteete, 2001).

2.3.1.2. Система рекомбинации RecET Рас профага

Система рекомбинации RecET была открыта вследствие обнаружения супрессорной мутации, которая восстанавливала рекомбинационную способность *recBC* мутантов (Barbour et al, 1970). Эта мутация, известная как *sbcA* (*s*uppressor of *recBC*), активировала экспрессию *recE* и *recT* генов эндогенного криптического профага Рас *E. coli* (Gillen et al, 1981). Белки RecE (экзонуклеаза VIII) и RecT осуществляют RecA независимую рекомбинацию и являются функциональными аналогами λ Exo и Beta. В частности, мутанты λ с удаленными генами рекомбинации Red были способны рекомбинировать только в штаммах *E. coli*, экспрессирующих гены *recE* и *recT* Рас профага (т.е. в штаммах *sbcA*-) (Gottesman, 1974).

Несмотря на то, что λ Exo и RecE, λ Bet и RecT являются функциональными аналогами, рекомбинация не происходит, когда один из белков замещен на свой функциональный аналог из другой рекомбинационной пары (например, λ Exo и RecT). Было показано, что *in vitro* RecE связывает только RecT, что свидетельствует о существовании специфического взаимодействия между белками одной рекомбинационной пары и неспособностью функционального аналога из гетерологичной системы комплементировать функцию, необходимую для рекомбинации (Muuyers et al, 2000a). Фермент RecE как и λ Exo представляет собой высоко процессивную АТФ-зависимую экзонуклеазу, которая расщепляет линейную дцДНК в направлении 5'→3' и имеет низкую, но детектируемую активность в отношении оцДНК (Kushner et al, 1974). RecE относится к RecB семейству нуклеаз: С-конец RecE аналогичен нуклеазному домену на С-конце RecB, а мутации в консервативных аминокислотных остатках RecE либо снижают, либо полностью устраняют нуклеазную активность (Chang and Julin, 2001). Однако N-концевые 587 ак. о. (полноразмерный RecE составляет 866 ак. о.) не требуются для его экзонуклеазной активности или рекомбинации (Chu et al, 1989; Muuyers et al, 2000b). RecT связывается с оцДНК субстратом и способствует обмену цепями и инвазии и проявляет свойства распознавания гомологии аналогично RecA (Hall et al, 1993). Мономеры белка RecT образуют открытые и замкнутые кольца в

присутствии и в отсутствие оцДНК, а также нуклеопротеиновые филаменты с RecE на дцДНК (Thresher et al, 1995). Рас профаг в отличие от фага λ не кодирует Gam-подобный белок.

2.4. Бактериофаг Mu: вирус и транспозон

Впервые бактериофаг Mu был описан в 1960-х годах как фаг, способный индуцировать множественные мутации (Taylor, 1963) в клетках *E. coli*, вследствие чего и получил свое название Mu (Mutator). Фаг Mu, умеренный бактериофаг, обладающий широким кругом хозяев среди энтеробактерий, объединяет в себе свойства фага и транспозона. Фаг Mu подобно транспозонам встраивается и перемещается по геному, используя специальную форму рекомбинации, называемую транспозицией, не требующую ДНК гомологии сайта-мишени (Mizuuchi, 1992) и аналогично другим бактериофагам способен упаковывать свой геном в капсид для последующего инфицирования. Как любой умеренный фаг бактериофаг Mu может существовать в бактериальной клетке в состоянии лизогена, т.е. стабильного профага, реплицирующегося в составе бактериального генома, а также осуществлять литический цикл, протекающий с образованием фаговых частиц. Фаг Mu в отличие от транспозонов способен использовать сразу два различных механизма транспозиции в зависимости от конфигурации донорного субстрата и стадии жизненного цикла.

Во время инфекции фаг впрыскивает в клетку свою линейную дцДНК, которая встраивается в случайное место хромосомы клетки-хозяина по механизму консервативной транспозиции, независимо от выбора дальнейшего пути развития фага (Harshey, 1984). Интеграция в геном хозяина идет с небольшим предпочтением консенсусной последовательности 5'-C-Pu-(G/C)-Pu-G-3' с прилегающей областью протяженностью ~23-24 п. н., обладающей структурой, облегчающей деформацию ДНК-мишени.

Инфекция и последующая интеграция могут привести с низкой частотой к лизогенизации клетки или со значительно более высокой частотой к литическому циклу (Howe and Wade, 1975). В лизогенном состоянии вирусный

геном остается интегрированным в хромосому, как профаг, и его литические функции находятся в репрессированном состоянии в течение нескольких последовательных циклов деления клетки. В отличие от большинства известных бактериофагов *Mu* реплицируется путем транспозиции. На стадии литического развития фаг осуществляет репликативную транспозицию через образование коинтегратов при амплификации фаговой ДНК, в результате которой большое число новых копий первоначально интегрированного фагового генома встраиваются в новые места бактериальной хромосомы (Chaconas et al, 1981). Под действием специфических белков фага хромосома клетки-хозяина разрушается, и фаговая ДНК упаковывается в вирусные частицы, приблизительно 100 фаговых частиц освобождается во время литического цикла из одной бактериальной клетки.

Оба вида транспозиции фага *Mu*: консервативная и репликативная идут с образованием общего промежуточного продукта, так называемого «интермедиата Шапиро» (Shapiro, 1979). Разрешение данной структуры может происходить двумя способами: либо по механизму репарации «nick-join-repair» в случае лизогенизации *Mu* фагом клетки-хозяина, когда в качестве субстрата выступает линейная донорная ДНК, либо по репликативному механизму «nick-join-replicative» с обязательным образованием структуры коинтеграта (при межмолекулярной транспозиции) или с делецией или инверсией участка ДНК между двумя копиями транспозона (при внутримолекулярной транспозиции) во время литического развития (Harshey and Jayaram, 2006). Оба пути транспозиции бактериофага *Mu* осуществляются так называемой транспозосомой - сложноустроенным белок-нуклеиновым комплексом высокого порядка (Harshey and Jayaram, 2006). Для правильной сборки транспозосомы необходим ряд специфических участков ДНК фага, фаговых белков и белков клетки-хозяина. В процессе сборки транспозосомы на специфических сайтах суперспирализованной ДНК субстрата происходит сложный комплекс белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий, в результате которых образуются изгибы молекулы ДНК и осуществляется тесное взаимодействие доменов, принадлежащих к разным мономерам транспозаз.

Каждая вирусная частица содержит линейную двухцепочечную молекулу ДНК фага длиной примерно 37 т. п. н., фланкированную короткими последовательностями ДНК клетки хозяина, приблизительно 50-150 п. н. на левом конце генома и 0,5-3 т. п. н. – на правом. Непосредственно фаговая ДНК фланкирована *attL* и *attR* последовательностями, каждая из которых содержит три сайта связывания с транспозазой MuA L1, L2, L3 – на левом и R1, R2, R3 на правом конце, соответственно. Эти сайты, представленные консенсусной последовательностью длиной в 22 п. н. не имеющей внутренней симметрии, обладают разной способностью к связыванию MuA-мономеров и, как следствие, не равнозначны для процесса транспозиции (Groenen and van de Putte, 1986). Между L1 и L2 расположен сайт связывания белка HU (Mizuuchi, 1992), который, по всей видимости, обеспечивает необходимую пространственную конфигурацию молекулы ДНК в структуре транспозосомы. Еще одним важным ДНК-элементом является энхансер транспозиции (E), известный также как последовательность внутренней активации IAS (*i*nternal *a*ctivating *s*equence) (Surette et al, 1989). Энхансер расположен в ~1 т. п. н. от левого конца генома Mu и содержит сайт связывания с белком IHF (*i*ntegration *h*ost *f*actor). Считается, что хозяйский белок IHF, связываясь с энхансером, вводит определенный изгиб в структуру ДНК, который стабилизирует транспозосому. Энхансерная последовательность перекрывается с тремя транскрипционными операторами O1, O2 и O3, которые являются одновременно сайтами узнавания транспозазы MuA и фагового репрессора *c*, отвечающего за репрессию фагового генома в состоянии профага (Krause and Higgins, 1986). Взаимодействия MuA – энхансер регулируют пространственную организацию субъединиц транспозазы, связывая индивидуальные сайты, расположенные в Mu-концевых областях *attL* и *attR*, что приводит к их сближению и облегчению формирования суперскрученного синапса (Jiang et al, 1999). Было установлено, что прямая (природная) ориентация последовательности энхансера, расположенного *in cis* между левым и правым *att* Mu, играет важную роль, в то время как удаленность E-элемента от концов транспозона не оказывает существенного влияния. Энхансер увеличивает эффективность транспозиции *in vivo* более чем в 100 раз, а также

может функционировать *in trans*, располагаясь на другой молекуле ДНК отдельно от концевых последовательностей фага Mu (Surette and Chaconas, 1992). Помимо энхансера для образования эффективного синапса необходим расположенный в центре Mu генома сайт сильного связывания гиразы SGS (*strong gyrase site*), который обеспечивает отрицательную суперспирализацию ДНК (Pato and Banerjee, 2000). Установлено, что сайт SGS не участвует в первичной интеграции фага, но необходим на этапе репликативной транспозиции. Связываясь с SGS ДНК, гираза формирует суперспирализованную петлю с сайтом связывания на вершине, тем самым способствуя сближению концов профага в ее основании, что приводит к эффективной сборке транспозосомы и репликации профага Mu *in vivo*.

Для осуществления эффективной транспозиции бактериофаг Mu кодирует два белка: транспозаза MuA и вспомогательный активатор транспозиции MuB. Транспозаза MuA, состоящая из 663 ак. о. (75kDa), является основным белком, формирующим комплекс транспозасомы (Nakayama et al, 1987). Транспозаза MuA состоит из трех доменов, каждый из которых структурно и функционально разделен на субдомены (Рисунок 2).

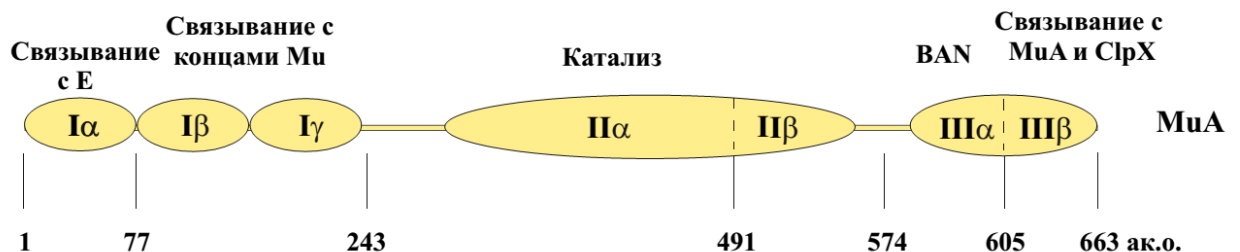


Рисунок 2 – Доменная и субдоменная организация MuA транспозазы. (Согласно Harshey, 2014)

N-концевой домен (I) обеспечивает специфическое связывание с ДНК операторной области энхансера через субдомен Iα, а также обоих Mu-*att* сайтов на концах фагового генома через субдомены Iβ и Iγ. Субдомен IIα центрального домена (II) содержит высоко консервативный DDE мотив, состоящий из трех аминокислот (Asp269-Asp336-Glu392), благодаря которому происходит разрыв и воссоединение цепей ДНК, обеспечивая каталитические свойства. Субдомены IIβ и IIIα принимают участие в неспецифическом связывании ДНК мишени

(Mariconda et al, 2000). Кроме того, субдомен III α обладает нуклеазной активностью и, по всей видимости, обуславливает взаимодействие ДНК-мишени с DDE мотивом, а также может участвовать в структурных перестройках транспозосомы, осуществляемых между стадиями разрыва и переноса нитей ДНК (Kuo et al, 1991). Транспозазы DDE-семейства катализируют реакции расщепления и переноса или воссоединения нити, соединяя при этом 3'-концы ДНК-мишени с донорной ДНК, тогда как соединение 5'-концов обеспечивается бактериальной репарацией либо репликацией. С-концевой домен (III) предназначен для белок-белковых взаимодействий, в частности, субдомен III β обуславливает взаимодействие с MuB (Baker et al, 1991) и ClpX (Levchenko et al, 1995) белками, что приводит к взаимодействию субъединиц MuA между собой и формированию активного тетрамерного комплекса.

Для эффективной транспозиции требуется еще один дополнительный кодируемый фагом белок, состоящий из 312 ак. о. - вспомогательный активатор транспозиции MuB. MuB - это AAA+АТФаза, которая осуществляет неспецифичное связывание ДНК (Mizuno et al, 2013). АТФазная активность MuB стимулируется связыванием с ДНК и MuA. MuB, в свою очередь, стимулирует MuA опосредованное спаривание концов транспозосомы и создание односторонних разрывов концевых участков ДНК фага Mu, соединяясь с фланкирующими последовательностями. Согласованные действия MuA и MuB способствуют образованию определенной структуры ДНК, которая позволяет захватить целевую ДНК и осуществить Mu транспозицию. MuB также взаимодействует с С-концевым доменом III β MuA, оптимизирует процесс сборки транспозосомы, подавляя при этом различные дефекты (Coros et al, 2003). Считается, что для первичной интеграции фага MuB не является строго необходимым компонентом, хотя, по всей вероятности, может увеличивать ее эффективность (Roldan and Baker, 2001). MuB также ответственен за иммунность транспозиции, он предохраняет определенные области ДНК от нежелательного встраивания дополнительной копии транспозона (Ge et al, 2010). На сегодняшний день известно два типа иммунности. Так называемая *cis*-

иммунность предотвращает вставку транспозона в области хромосомы хозяина, находящиеся в непосредственной близости, примерно 5 т. п. н. от концов фага Mu. В основе этого механизма лежат MuA-MuB взаимодействия (Harshey, 2014). Другой тип иммунности - Mu геномная иммунность предотвращает транспозицию в уже интегрированную копию генома Mu при амплификации во время литической фазы развития для производства жизнеспособного потомства. Она обусловлена сильным связыванием белка MuB с ДНК транспозона, предположительно, при участии хозяйских белков *in vivo* (Ge et al, 2010), приводящим к структурированию интегрированного генома фага в независимый домен на хромосоме.

2.5. Сайт-специфическая рекомбинация

Сайт-специфическая рекомбинация представляет собой тип генетической рекомбинации, при которой происходит обмен цепями ДНК между двумя короткими строго определенными последовательностями, обладающими, по крайней мере, некоторой степенью гомологии и осуществляется в синаптических комплексах, образованных специализированными белками – рекомбиназами (Olorunniji et al, 2016). Сайт-специфическую рекомбинацию также называют консервативной, так как она не влечет за собой синтеза или дегградации ДНК, не зависит от репликации, что отличает ее от транспозиции. Сайт-специфические рекомбиназы не нуждаются в каких-либо высокоэнергетических кофакторах в отличие, например, от АТФ-зависимого ДНК-связывающего белка RecA, обеспечивающего гомологичную рекомбинацию. Также в отличие от гомологичной для сайт-специфической рекомбинации не требуется протяженных участков гомологии ДНК или полной идентичности сайтов рекомбинации.

Минимально необходимым набором элементов для осуществления сайт-специфической рекомбинации является: (а) две специфичные последовательности ДНК, так называемые рекомбинационные сайты, (б) специализированный белок рекомбиназы, отвечающий за распознавание данных сайтов, а также катализирующий расщепление, обмен и воссоединение цепей

ДНК с образованием рекомбинантных продуктов (Grindley et al, 2006). Простейший рекомбинационный сайт представляет собой дуплексный участок ДНК длиной 20-30 п. н. (функциональное ядро), который содержит пару инвертированных последовательностей, распознаваемых рекомбиназой, таким образом, каждый сайт связывает один димер (или два мономера) рекомбиназы. В более сложноустроенных системах рекомбинационный сайт может включать в себя не только функциональное ядро, но и дополнительные последовательности длиной до 100 и более п. н. Эти последовательности часто служат для взаимодействия с дополнительными копиями субъединиц рекомбиназы и другими белками, кодируемыми самим генетическим элементом (фагом либо транспозоном) или клеткой-хозяином. Вне зависимости от сложности строения все сайты обладают полярностью, как правило, из-за асимметрии спейсерной последовательности, расположенной между инвертированными повторами.

В зависимости от взаимного расположения, ориентации сайтов, а также от конфигурации субстратов, несущих эти сайты, исходы сайт-специфической рекомбинации могут быть различны (Ologuniji et al, 2016). Интеграция является результатом рекомбинации между сайтами, расположенными на двух разных молекулах ДНК (при условии, что хотя бы одна из двух молекул является кольцевой). Это событие лежит в основе интеграции умеренных фагов в геном клетки - хозяина. В противоположном случае, когда рекомбинационные сайты находятся на одной молекуле в прямой ориентации («голова к хвосту»), участок ДНК между сайтами вырезается с образованием ковалентно-замкнутой кольцевой молекулы. Эту реакцию рекомбинации используют умеренные фаги при переходе из состояния лизогении к литическому пути развития. Сайт-специфическая рекомбинация была впервые идентифицирована у бактерий в связи с изучением способности λ бактериофага интегрировать и вырезать свой геном из определенного сайта на хромосоме *E. coli* (Campbell, 1962; Landy, 2015). В третьем случае, когда сайты находятся на одной молекуле в обратной ориентации («голова к голове») происходит инверсия участка ДНК, расположенного между сайтами. Эта реакция рекомбинации с обращенными

сайтами осуществляет ДНК инверсии, которые лежат в основе переключения жгутиков у *Salmonella* и фимбриального переключателя I типа у *E. coli* (Gally et al, 1993). Длина ДНК между сайтами в этих внутри и межмолекулярных реакциях не является критическим фактором. Типичные рекомбинационные системы могут оперировать сайтами, находящимися друг от друга на расстоянии от 200 п. н. (или менее) до сотен т. п. н. Еще одним возможным событием рекомбинации, менее часто наблюдаемым в природе, является реакция между сайтами, расположенных на двух линейных молекулах, ведущая к образованию двух рекомбинантных линейных продуктов (Ologuniji et al, 2016).

Сайт-специфическая рекомбинация в биологических системах служит самым различным целям. Чаще всего она используется организмом или генетическим элементом для физического соединения или разделения участков ДНК. λ Int, ϕ C31 и многие другие фаговые интегразы, как уже было упомянуто выше, служат для интеграции и эксцизии фагового генома. Рекомбиназы, такие как Int Tn916, Int Tn1545, способны осуществлять транспозицию кольцевых транспозонов, а IntI интеграцию и вырезание генов в интегронах. TnpX отвечает за транспозицию Tn4451 в *Clostridium*. Такие представители семейства как TnpI (Tn4430) и TnpR (Tn3/ $\gamma\delta$) способны разрешать коинтеграта, возникшие в результате транспозиции. Cre и Par способствуют разрешению димеров плазмид P1 и RP4, соответственно. XerC/D разрешает хромосомные димеры *E. coli*, а также множество других бактериальных хромосом и плазмид. FimB, FimE способны изменять экспрессию гена путем инверсии фрагмента ДНК, Hin изменяет экспрессию гена в *Salmonella*, а Gin, Cin в фагах Mu и P1. Вырезанием участков ДНК XisA, XisC и XisF регулируется активация генов в *Anabaena*, а SpoIVCA (CisA) в *Bacillus subtilis*. Flp способствует амплификации дрожжевой 2 мкм плазмиды (Grindley et al, 2006).

2.5.1. Семейства рекомбиназ

Сайт-специфические рекомбиназы у бактерий и бактериофагов подразделяются на два семейства: (1) тирозиновые рекомбиназы и (2)

сериновые рекомбиназы (также известные как инвертазы и резольвазы). Семейства получили свои названия в соответствии с нуклеофильным аминокислотным остатком, расположенным в активных центрах рекомбиназ. Тирозиновые интегразы являются членами крайне разнообразного семейства ферментов, прототипом которого считается Int белок фага λ (Landy, 1993; Landy, 2015). Тирозиновые рекомбиназы наиболее широко распространены среди прокариот, но также встречаются у архей и эукариот, примеры рекомбиназ были описаны у грибов, инфузорий, а также у некоторых семейств ретротранспозонов (Nunes-Düby et al, 1998). Структурные исследования показали, что тирозиновые рекомбиназы имеют общий каталитический домен (~200 или более ак. о.), который содержит активный центр, а также участвует во взаимодействиях субъединиц и распознавании последовательностей ДНК. Каталитический домен высоко консервативен даже тогда, когда идентичность последовательностей за его пределами крайне низка (Esposito and Scocca, 1997). Хотя некоторые члены семейства, такие как FimB и FimE, содержат только каталитический домен, в большинстве случаев рекомбиназы имеют еще один или несколько дополнительных доменов, которые могут способствовать дальнейшему распознаванию ДНК, взаимодействию субъединиц или обладать регуляторными функциями.

Сериновое семейство объединяет в себе сериновые инвертазы, резольвазы и собственно интегразы. Сериновые инвертазы осуществляют реакции инверсии ДНК, и члены этой группы ферментов демонстрируют высокий уровень аминокислотной гомологии, причем некоторые инвертазы взаимозаменяемы (Smith, 2015). Сериновые резольвазы также обладают высокой степенью гомологии по отношению к сериновым инвертазам, но не являются их функциональными аналогами. Резольвазы кодируются некоторыми транспозонами или плазмидами и служат для разрешения структур коинтегратов. Группа «малых сериновых рекомбиназ», в которую входят резольвазы транспозонов и ДНК-инвертазы имеет N-концевой каталитический домен, содержащий активный сайт (~150 ак. о.), связанный с небольшим НТН (helix-turn-helix) мотивом C-концевого домена (~40–50 ак. о.) (Rice, 2015;

Johnson, 2015). Группа «больших сериновых рекомбиназ» имеют аналогичный N-концевой каталитический домен, но связанный с гораздо более протяженной и разнообразной C-концевой частью, которая может состоять из 500 или более аминокислот и включать несколько доменов или субдоменов. В эту группу входят сериновые интегразы, кодируемые бактериофагами (Smith, 2015). Большие сериновые интегразы не требуют суперспирализации ДНК или дополнительных факторов, кодируемых клеткой хозяином. Сериновые как и тирозиновые интегразы полагаются на детерминанты направленности (эксцизионазы), кодируемые фагом, для управления направлением реакции рекомбинации (Singh et al, 2014).

В ходе сайт-специфической рекомбинации ферменты обоих семейств совершают разрыв и воссоединение ДНК без потери или добавления нуклеотидов, а также с сохранением энергии фосфодиэфирной связи. Рекомбиназы используют механизм аналогичный тому, который осуществляют топоизомеразы. Оба типа ферментов расщепляют ДНК, совершая нуклеофильную атаку на конкретную фосфодиэфирную связь в ДНК, используя тирозин (тирозиновое семейство) либо серин (сериновое семейство) для образования временной ковалентной связи с 3'-концом разорванной цепи ДНК. Это высокоэнергетическое промежуточное соединение рекомбиназы с ДНК сохраняет энергию разорванной связи, что позволяет воссоединить рекомбинантные цепи без использования каких-либо кофакторов, таких как АТФ, а также участия полимеразы или лигазы. Хотя принцип действия ферментов двух семейств аналогичен, их механизмы различны, а белки разных семейств не проявляют сходства ни на уровне аминокислотной последовательности, ни на уровне структурной организации. По всей вероятности, каждое семейство ферментов возникло и развивалось независимо (Grindley et al, 2006).

Сериновые рекомбиназы связываются со своими сайтами в основном как димеры. Создание синапсиса происходит за счет белок-белкового взаимодействия, возникающего между субъединицами рекомбиназы (Smith and Thorpe, 2002). Как только синаптический комплекс сформирован, все четыре

субъединицы рекомбиназы активируются для нуклеофильной атаки (Рисунок 3(A)). Сериновые рекомбиназы осуществляют одновременные разрезы в обеих цепях каждого сайта на границе 2-нуклеотидной асимметричной центральной последовательности, создавая выступающие концы на расщепленной ДНК. Далее происходит реакция образования ковалентной фосфосериновой связи между каждым из четырех 5'- концев разорванных цепей с отдельной субъединицей рекомбиназы, при этом гидроксилы на 3'- концах остаются свободными (Reed and Grindley, 1981). Рекомбинация становится возможной благодаря уникальному механизму вращения пары субъединиц на 180° относительно двух оставшихся, в результате чего происходит смена позиции разрезанных концов ДНК и дальнейшее воссоединение с образованием рекомбинантных сайтов.

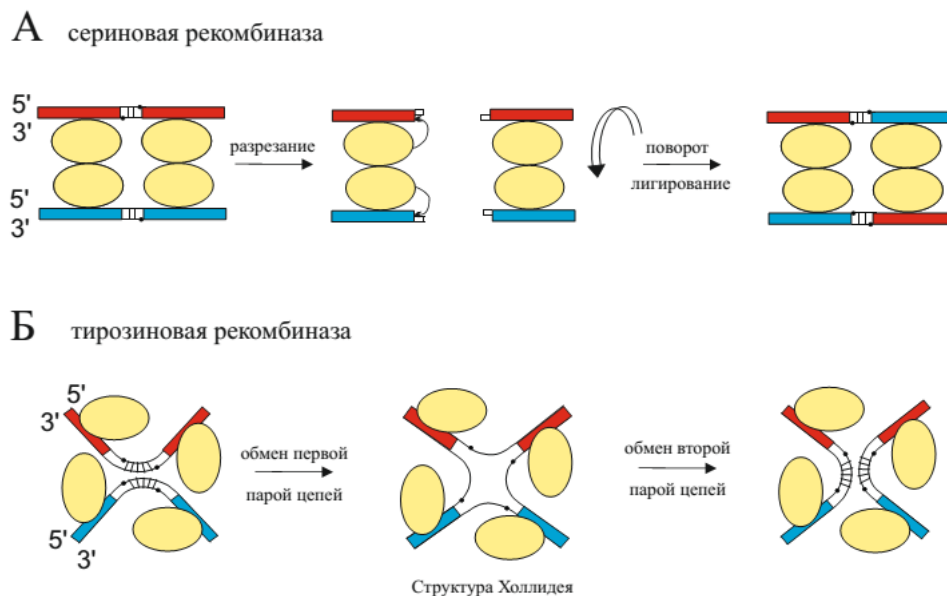


Рисунок 3 – Механизмы сайт-специфической рекомбинации. Сериновое семейство рекомбиназ (А) тирозиновое семейство рекомбиназы (Б) (Согласно Olorunniji et al, 2016)

В отличие от сериновых тирозиновые рекомбиназы связываются с инвертированными повторами своих сайтов рекомбинации как мономеры, после чего между субъединицами устанавливается сильное взаимодействие (Nunes-Düby et al, 1998). Рекомбинационная реакция происходит в синаптическом комплексе с фиксированной геометрией, собранном при участии четырех субъединиц белка рекомбиназы и двух сайтов. В редких случаях как, например,

в случае XerC/XerD системы рекомбинационный сайт имеет в своем составе связывающие последовательности для двух разных субъединиц рекомбиназы, таким образом, рекомбинационный комплекс состоит из двух XerC и еще двух XerD субъединиц. После сборки синапсиса рекомбинация инициируется, когда две из четырех субъединиц комплекса активируются для внесения единичного разрыва в каждый из рекомбинационных сайтов, используя тирозин в активном центре как расщепляющий нуклеофил (Рисунок 3(Б)). В результате реакции тирозин рекомбиназы остается ковалентно связанным с 3'-концом разорванной цепи ДНК, а энергия фосфодиэфирной связи цепи ДНК передается фосфотирозину. На следующем этапе свободные гидроксилы 5'-конца одного дуплекса атакуют 3'-фосфотирозиновую связь противоположного субстрата с образованием структуры Холлидея. Затем комплекс изомеризуется таким образом, что неактивные мономеры рекомбиназы становятся активными и наоборот. Изомеризация комплекса позволяет повторить весь процесс с нетронутыми цепями каждого дуплекса. Вторая нетронутая нить подвергается аналогичной нуклеофильной атаке, и новые гидроксильные группы 5'-концов ДНК мигрируют и атакуют 3'-фосфотирозиновые связи своих партнеров, высвобождая белок-рекомбиназы, разрешая структуру Холлидея и завершая реакцию. Разрыв и восстановление связи происходят на 5'-концах спейсера. Хотя последовательности спейсеров могут варьироваться, для успешной рекомбинации они должны быть идентичными между партнерами (Grindley et al, 2006).

2.5.2. Сайт-специфические рекомбинационные системы

2.5.2.1. λ Int/Xis система

Как и в случае многих других открытий в области молекулярной биологии изучение бактериофага λ послужило отправной точкой для начала исследования сайт-специфических систем рекомбинации. Фаг λ имеет два альтернативных пути развития: литический и лизогенный. При выборе лизогенного пути бактериофаг λ интегрируется в хромосому *E. coli*, а при переходе к литическому пути фаг вырезается из хромосомы посредством

рекомбинации. Выбор пути зависит от различных физиологических сигналов и условий окружающей среды. Чтобы интегрировать и вырезать свой геном фаг λ использует тирозиновую сайт-специфическую рекомбиназу Int (Ausubel, 1974).

Для интегративной рекомбинации, осуществляемой между фаговым *attP* и бактериальным *attB* сайтами, в дополнение к интегразе Int требуется кодируемый клеткой-хозяином ДНК изгибающий белок IHF (Integration host factor) (Rice et al, 1996). В результате интеграции геном фага оказывается фланкирован двумя гибридными *attL* и *attR* сайтами с левой и правой стороны профага, соответственно. Для осуществления эксцизионной рекомбинации между гибридными сайтами помимо Int и IHF необходим также кодируемый фагом белок Xis, препятствующий интегративной рекомбинации (Abbani et al, 2007) и стимулирующий белок Fis, кодируемым хозяином (Paragiannis et al, 2007). Вырезание бактериофага из хромосомы не является обращением вспять реакции интеграции, обе реакции строго регулируются и фактически не обратимы. Обе реакции протекают через промежуточное соединение Холлидея, которое сначала формируется, а затем разрешается за счет обмена цепями на левой и правой стороне спейсерной области. Реакции интеграции и эксцизии различаются рекомбинирующими сайтами и потребностью во вспомогательных факторах, которые необходимы для придания направленности каждой из реакций (Landy, 2015).

Все четыре возможных рекомбинационных сайта структурно различны, чем и обусловлена их способность взаимодействовать со строго определенным партнером: *attP* с *attB*, а *attL* с *attR*. Известно, что *attP* и *attB* имеют общее ядро 15 п. н. длиной, состоящее из двух инвертированных повторов, разделенных спейсерной областью из 7 пар оснований. Каждый из четырех инвертированных повторов C, C' в *attP*, и B, B' в *attB* предстает собой “core” сайт связывания интегразы (Рисунок 4). Именно в пределах ядра Int осуществляет расщепление цепей ДНК и лигирование через высокоэнергетический ковалентный 3'-фосфотирозиновый интермедиат. Мономер белка Int имеет два типа ДНК связывающих доменов: в то время как C-концевой домен интегразы распознает “core”- связывающие сайты, N-конец белка необходим для распознавания

плечевых (“arm”) сайтов. Сайты *attP* и *attB* не равнозначны, *attB* состоит из 23 п. н., 15 из которых составляют «функциональное ядро», а *attP* значительно более протяженный (~270 п. н.) и дополнительно содержит две примыкающие области Р и Р’, которые включают пять плечевых сайтов связывания белка Int (P1, P2 в области Р и P1’, P2’, P3’ области Р’). Дополнительно к Р и Р’ плечевые области содержат сайты связывания белков IHF (H1, H2 и H’), Xis (X1, X1,5 и X2) и Fis (F). Как показано цветом на (Рисунок 4), некоторые сайты необходимы только для интегративной рекомбинации между *attP* и *attB*, другие требуются только для эксцизионной рекомбинации между сайтами *attL* и *attR*, а часть сайтов необходимы для осуществления обеих реакций (Landy, 2015).

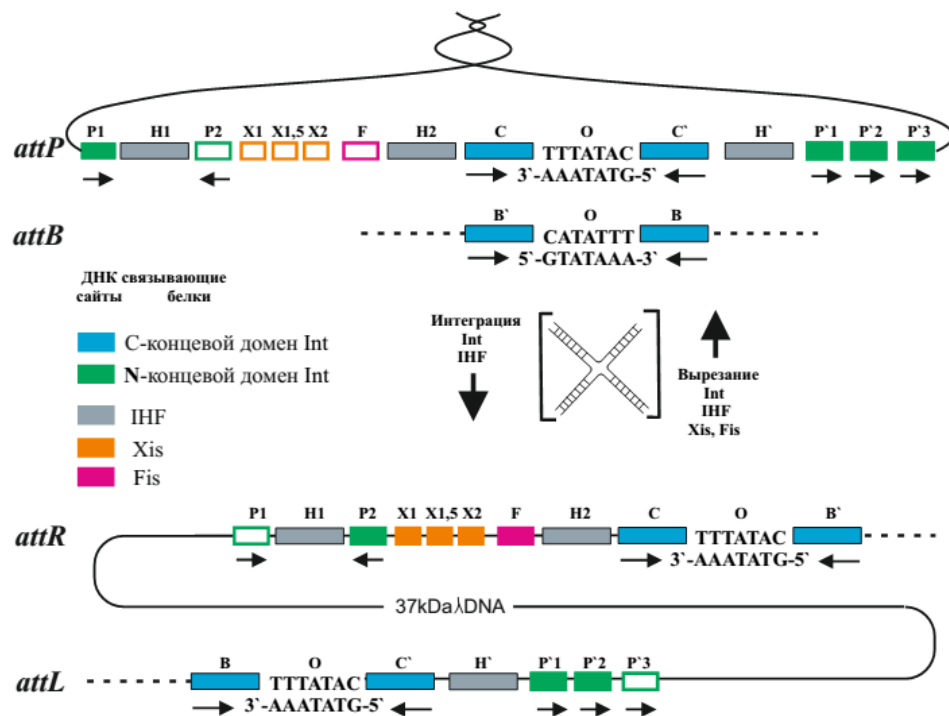


Рисунок 4 – Структура *attP*, *attB*, *attL*, *attR* сайтов фага λ. С, С’, В, В’ – сайты связывания белка Int в ядре (синие прямоугольники); P1, P2, P1’, P2’, P3’ – плечевые сайты связывания белка Int (зеленые); H1, H2, H’ – сайты связывания белка IHF (серые); X1, X1,5, X2 – сайты связывания белка Xis (желтые); F – сайт связывания белка Fis (розовый). Закрашенными фигурами показаны сайты, принимающие участие в реакции (Согласно Landy, 2015)

2.5.2.2. Системы Cre / *loxP* и FLP / FRT

Спустя примерно 10 лет после открытия Int фага λ, две другие сайт-специфичные рекомбиназы тирозинового типа Cre и Flp были охарактеризованы (Abremski and Hoess, 1984; Andrews et al, 1985). В бактериофаге P1 фермент Cre

(Causes recombination) играет важную роль в жизненном цикле фага, включая кольцевание линейного генома и разрешение димеров фаговых хромосом, образующихся в результате репликации ДНК (Sternberg and Hoess, 1983). Рекомбиназа Cre осуществляет рекомбинацию между двумя последовательностями длиной 34 п. н., именуемыми *loxP* сайтами (locus of crossing (x) of P1). Они состоят из двух палиндромных последовательностей по 13 п. н., являющихся сайтами связывания для субъединиц рекомбиназы, разделенных спейсерной областью 8 п. н., определяющей ориентацию сайта. Другая сайт-специфичная рекомбиназа тирозинового типа, Flp, кодируемая 2 μ плазмидой *Saccharomyces cerevisiae*, контролирует копияность данной плазмиды (Broach et al, 1982). FRT, сайт распознавания Flp, устроен аналогично *loxP* Cre рекомбиназы, он также состоит из 34 п. н. (две палиндромные последовательности протяженностью 13 п. н. и спейсерная область 8 п. н.). В отличие от Int и многих других сайт-специфических рекомбиназ, которым требуются кофакторы хозяина и факторы направленности, кодируемые фагами, чтобы препятствовать обратимости реакции и осуществлять рекомбинацию в определенном направлении (Landy, 2015), Cre и Flp не нуждаются в дополнительных белках для организации синаптического комплекса, который инициирует реакцию рекомбинации. Данные энтропии свидетельствуют о том, что в отсутствие факторов направленности удаление сегмента ДНК, фланкированного рекомбинационными сайтами, более энергетически выгодно, чем повторное введение такого фрагмента, так как в первой реакции участвует один субстрат ДНК, а во второй - две молекулы ДНК. Отсутствие потребности в кофакторах хозяина и факторах направленности позволяет данным системам работать в гетерологичных организмах-хозяевах при условии наличия целевых сайтов, введенных в геном. В связи с этим Cre и Flp в настоящее время используются в качестве инструментов для реализации различных задач в большом количестве модельных организмов, и, хотя более сложно устроенные системы также используются для прикладных целей (Landy, 2015), простые сайт-специфические системы нашли более широкое применение в биотехнологии и биомедицине.

3. Материалы и методы

3.1. Бактериальные штаммы, фаги, плазмиды и условия культивирования

Штаммы *C. glutamicum* выращивали в жидкой и на твердой, содержащей 1,2% бактоагара Difco (США), среде Brain Heart Infusion (ВНІ) (37 г/л, Sigma-Aldrich, США) при 30°C. При необходимости добавляли соответствующие антибиотики в следующих конечных концентрациях: канамицин 25 мг/л (Km25), хлорамфеникол 7,5 мг/л (Cm7,5) для интегрированного в хромосому гена и 10 мг/л (Cm10) для поддержания плазмид, стрептомицин 25 мг/л (Sm25), апрамицин 30 мг/л (Am30), гентамицин 1 мг/л (Gm1).

Штаммы *E. coli* использовали в качестве промежуточных хозяев для сборки и наработки плазмид и культивировали в среде Лурия-Бертани (LB) (10 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl) при 37°C. Для штаммов *E. coli* соответствующие антибиотики добавляли в следующей конечной концентрации: 50 мг/л канамицина (Km50), 30 мг/л хлорамфеникола (Cm30), 25 мг/л стрептомицина (Sm25), 30 мг/л апрамицин (Am 30), 10 мг/л гентамицин (Gm10).

Таблица 1 - Бактериальные штаммы, фаги, плазмиды

Фаги, штаммы, и плазмиды	Генотип, описание	Источник
Фаги		
φ16	Умеренный фаг, индуцированный из природного лизогена <i>C. glutamicum</i> ATCC21792	Данная работа
φ673	Вирулентный фаг <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	ВКПМ
φ674	Вирулентный фаг <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	ВКПМ
Штаммы <i>C. glutamicum</i>		
ATCC 21792	Дикий тип, природный лизоген по фагу φ16	Moreau et al, 1999a
ATCC 21792c	Дикий тип, излеченный от умеренного бактериофага φ16	Moreau et al, 1999a
ATCC 13869 (AJ1511)	Дикий тип ATCC 13869 без криптической плазмиды pAM330 (AP017557.2)	Лабораторная коллекция
ATCC13032	Дикий тип, ауксотроф по биотину (NC003450.3)	ВКРМ В-41
MB001	ATCC13032, с делецией профагов CGP1, CGP2, CGP3 (CP005959.1)	Baumgart et al, 2013
13869В::L-pCRIM-Cm-R	Cm ^R ; ATCC 13869 с интегрированной плазмидой pCRIM-Cm ^R -attP _{φ16} в природный	Данная работа

	$attB_{\phi 16}$ сайт (2,483,498-2,483,526); 13869B:: $[attL_{\phi 16}-T_{674}-MCS-T_{L3}-p15a-Cm-attR_{\phi 16}]$	
13032B:: L-pCRIM-Cm-R	Cm^R ; ATCC 13032 с интегрированной плазмидой pCRIM-Cm ^R - $attP_{\phi 16}$ в природный $attB_{\phi 16}$ сайт (2,565,640-2,565,668); 13869B:: $[attL_{\phi 16}-T_{674}-MCS-T_{L3}-p15a-Cm-attR_{\phi 16}]$	Данная работа
MB001B:: L-pCRIM-Cm-R	Cm^R ; MB001 с интегрированной плазмидой pCRIM-Cm ^R - $attP_{\phi 16}$ в природный $attB_{\phi 16}$ сайт (2,333,853-2,333,881);13869B:: $[attL_{\phi 16}-T_{674}-MCS-T_{L3}-p15a-Cm-attR_{\phi 16}]$	Данная работа
13869#542::Sm 13869#1741::Sm 13869#1865::Sm	Sm^R ; серия штаммов ATCC13869 с интегрированной кассетой $[attL_{\phi 16}-T_{674}-Sm^R-T_{L3}-attR_{\phi 16}]$ в соответствующую точку (#542/#1741/#1865)	Данная работа
13869#542::B 13869#1741::B 13869#1865::B	Серия штаммов ATCC 13869 с одним природным и одним искусственным $attB_{\phi 16}$ -сайтом, сконструированным в точке (#542/#1741/#1865)	Данная работа
13869#484::Cm 13869#2370::Cm	Cm^R ; серия штаммов ATCC 13869 с интегрированной кассетой $[attL_{\phi 16}-T_{674}-Cm^R-T_{L3}-attR_{\phi 16}]$ в соответствующую точку (#484/#2370)	Данная работа
13869x:: $[mini-Mu(LER)]$	Sm^R ; серия штаммов ATCC13869 с единичной mini-Mu(LER) кассетой, интегрированной в точку, где $x, x \in \{35, 198, 209, 258, 400, 668, 1213, 1275, 1883, 2123\}$	Gorshkova et al, 2018; Данная работа
13869B:: L-pCRIM-Cm-R x:: $[mini-Mu(LER)]$	$Sm^R Cm^R$; серия штаммов производные от 13869B::L-pCRIM-Cm-R, полученные в результате электротрансформации геномной ДНК, выделенной из 13869x:: $[mini-Mu(LER)]$	Данная работа
13032y:: $[mini-Mu(LER)]$	Sm^R ; серия штаммов ATCC13869 с единичной mini-Mu(LER) кассетой, интегрированной в точку, где $y, y \in \{177, 544, 657, 2020, 2393, 3244\}$	Данная работа
13032B:: L-pCRIM-Cm-R y:: $[mini-Mu(LER)]$	$Sm^R Cm^R$; серия штаммов производные от 13032B::L-pCRIM-Cm-R, полученные в результате электротрансформации геномной ДНК, выделенной из 13869y:: $[mini-Mu(LER)]$	Данная работа
MB001z:: $[mini-Mu(LER)]$	Sm^R ; серия штаммов MB001с единичной mini-Mu(LER) кассетой, интегрированной в точку, где $z, z \in \{190, 837, 1128, 1320, 1540, 2684\}$	Данная работа
MB001B:: L-pCRIM-Cm-R z:: $[mini-Mu(LER)]$	$Sm^R Cm^R$; серия штаммов производные от MB001B::L-pCRIM-Cm-R, полученные в результате электротрансформации геномной ДНК, выделенной из MB001z:: $[mini-Mu(LER)]$	Данная работа
13869ΔB	ATCC 13869Δ $attB_{\phi 16 native}$, ATCC13869, с делецией «функционального ядра» $attB_{\phi 16}$ сайта (без сдвига рамки считывания)	Данная работа
13869ΔB#400::Cm 13869ΔB#668::Cm 13869ΔB#2370::Cm	Cm^R ; серия штаммов 13869ΔB с интегрированной кассетой $[attL_{\phi 16}-T_{674}-Cm^R-T_{L3}-attR_{\phi 16}]$ в соответствующую точку (#400/#668/#2370)	Данная работа

13869ΔB#400::B 13869ΔB#668::B 13869ΔB#2370::B	Серия штаммов 13869ΔB с одним искусственным <i>attB</i> _{φ16} -сайтом, сконструированном в соответствующей точке (#400/ #668/ #2370)	Данная работа
13869ΔB#400::G-Cm 13869ΔB#2370::G-Cm	Cm ^R ; производные 13869ΔB#400::B и 13869ΔB#2370::B штаммов с интегрированной плазмидой pCRIM-Cm ^R - <i>lox-attP</i> _{φ16} -G в искусственный <i>attB</i> _{φ16} [<i>attL</i> _{φ16} - <i>lox71</i> -Cm ^R -p15A- <i>lox66</i> -T _{L3} -yEGFP-T ₆₇₄ - <i>attR</i> _{φ16}]	Данная работа
13869ΔB#668::R-Cm	Cm ^R ; производный 13869ΔB#668::B штамма с интегрированной плазмидой pCRIM-Cm ^R - <i>lox-attP</i> _{φ16} -R в искусственный <i>attB</i> _{φ16} [<i>attL</i> _{φ16} - <i>lox71</i> -Cm ^R -p15A- <i>lox66</i> -T _{L3} - <i>turboRFP</i> -T ₆₇₄ - <i>attR</i> _{φ16}]	Данная работа
13869ΔB#400::G 13869ΔB#2370::G	Производные штаммов 13869ΔB#400::G-Cm и 13869ΔB#2370::G-Cm, полученные в результате Cre-зависимого вырезания векторной части [<i>attL</i> _{φ16} -T ₆₇₄ -yEGFP-T _{L3} - <i>lox72</i> - <i>attR</i> _{φ16}]	Данная работа
13869ΔB#668::R	Производный штамма 13869ΔB#668::R-Cm, полученный в результате Cre-зависимого вырезания векторной части [<i>attL</i> _{φ16} -T ₆₇₄ - <i>turboRFP</i> -T _{L3} - <i>lox72</i> - <i>attR</i> _{φ16}]	Данная работа
13869ΔB#400::G#668::R-Cm	Cm ^R ; производный 13869ΔB#400::G штамма, полученный в результате электротрансформации геномной ДНК, выделенной из штамма 13869ΔB#668::R-Cm	Данная работа
13869ΔB#400::G#668::R	Производный 13869ΔB#400::G#668::R-Cm штамма, полученный в результате Cre-зависимого вырезания векторной части	Данная работа
13869ΔB#400::G#668::R #2370::G-Cm	Cm ^R ; производный 13869ΔB#400::G#668::R штамма, полученный в результате электротрансформации геномной ДНК, выделенной из штамма 13869ΔB#2370::G-Cm	Данная работа
13869ΔB#400::G#668::R #2370::G	Производный 13869ΔB#400::G#668::R#2370::G-Cm штамма, полученный в результате Cre-зависимого вырезания векторной части	Данная работа
13032ΔB	ATCC13032Δφ16- <i>attB</i> _{native} , ATCC13032, с делецией «функционального ядра» φ16- <i>attB</i> -сайта (без сдвига рамки считывания)	Данная работа
13032ΔB#2393::Sm	Sm ^R ; штамм 13032ΔB с интегрированной кассетой [<i>attL</i> _{φ16} -T ₆₇₄ -Sm ^R -T _{L3} - <i>attR</i> _{φ16}] в соответствующую точку #2393	Данная работа
13032ΔB#2393::B	Штамм ATCC13032ΔB с искусственным <i>attB</i> _{φ16} -сайтом, сконструированном в точке #2393	Данная работа
13032ΔB#2393::R-Cm	Cm ^R ; производный 13032ΔB#2393::B штамма с интегрированной плазмидой pCRIM-Cm ^R - <i>lox-attP</i> _{φ16} -R в искусственный <i>attB</i> _{φ16} [<i>attL</i> _{φ16} - <i>lox71</i> -Cm ^R -p15A- <i>lox66</i> -T _{L3} - <i>turboRFP</i> -T ₆₇₄ - <i>attR</i> _{φ16}]	Данная работа
13032B::G-Cm	Cm ^R ; производный ATCC 13032 штамма с интегрированной плазмидой pCRIM-Cm ^R - <i>attP</i> _{φ16} -G в природный <i>attB</i> _{φ16} [<i>attL</i> _{φ16} - <i>lox71</i> -Cm ^R -p15A- <i>lox66</i> -T _{L3} -yEGFP-T ₆₇₄ - <i>attR</i> _{φ16}]	Данная работа

13032ΔB#2393::R	Производный 13032ΔB#2393::R-Cm штамма, полученный в результате Cre-зависимого вырезания векторной части [<i>attL</i> _{φ16} -T _{674-turboRFP} -T _{L3-lox72-attR} _{φ16}]	Данная работа
13032B::G	Производный 13032B::G-Cm штамма, полученный в результате Cre-зависимого вырезания векторной части [<i>attL</i> _{φ16} -T _{674-yEGFP} -T _{L3-lox72-attR} _{φ16}]	Данная работа
13032B::G#2393::R-Cm	Cm ^R ; производный 13032B::G штамма, полученный в результате электротрансформации геномной ДНК, выделенной из штамма 13032ΔB#2393::R-Cm	Данная работа
13032B::G#2393::R	Производный 13032B::G#2393::R-Cm штамма, полученный в результате Cre-зависимого вырезания векторной части	Данная работа
Штаммы <i>E. coli</i>		
TG1	F ⁻ Δ(lac-pro) supE thi hsdΔ5[F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]	VKM IMG-341
LE392	hsdR514(rk ⁻ , mk ⁺), glnV(supE44), tryT (supF58), lacY1 or Δ(lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55.	Лабораторная коллекция
Плазмиды		
pSTV-Cm ^R -(Int- <i>attP</i>) _{φ16}	Cm ^R ; самоинтегративная плаزمида; производная pSTV28(TaKaRa), <i>E. coli</i> p15A репликон; <i>cat</i> из Tn9 транспозона под контролем сильного фагового промотора P _{GAI} (Pátek et al. 1996); ген интегразы <i>φ16int</i> под природным промотором и <i>attP</i> _{φ16} . T ₆₇₄ -MCS-T _{L3} (сайт множественного клонирования, окруженный терминаторами T ₆₇₄ коринефага <i>φ674</i> и T _{L3} фага λ)	Данная работа
pCRIM-Cm ^R - <i>attP</i> _{φ16}	Cm ^R ; интегративная плазмида; производная pSTV-Cm ^R -(Int- <i>attP</i>) _{φ16} с делетированным геном интегразы <i>φ16int</i>	Данная работа
pCRIM-Cm ^R - <i>lox-attP</i> _{φ16}	Cm ^R ; интегративная плазмида; производная pCRIM-Cm ^R - <i>attP</i> _{φ16} , дополнительно содержит <i>lox66/lox71</i> сайты, фланкирующие векторную часть	Данная работа (OK651220)
pCRIM-Cm ^R - <i>lox-attP</i> _{φ16} -G	Cm ^R ; производная pCRIM-Cm ^R - <i>lox-attP</i> _{φ16} с клонированным <i>yEGFP</i> в MCS	Данная работа
pCRIM-Cm ^R - <i>lox-attP</i> _{φ16} -R	Cm ^R ; производная pCRIM-Cm ^R - <i>lox-attP</i> _{φ16} с клонированным геном TurboRFP в MCS	Данная работа
pVC-Am ^R -Xis _{φ16} (Xis-хелпер)	Am ^R ; вектор для эксцизии на основе шатл-вектора pVC7N (<i>C. glutamicum</i> pBL1 и <i>E. coli</i> pMB1 репликоны) (LC425431.1; Hashiro et al. 2019); ген устойчивости к апрамицину, Am ^R , <i>apr</i> ^R or <i>aac(3)IV</i> (GenBank Acc. No. X01385), ген фаговой эксцизионазы <i>φ16xis</i> под контролем P _{gapA} промотора	Данная работа
pVC-Am ^R -Int _{φ16} (Int-хелпер)	Am ^R ; хелпер для интеграции на основе шатл-вектора pVC7N, <i>φ16int</i> под природным промотором	Данная работа

pVC-Am ^R -Int _{φ16} -SceI (Int ^{I-SceI} -хелпер)	Am ^R ; хелпер для интеграции; производный pVC-Am ^R -Int _{φ16} ; дополнительно введены I-SceI ген (pUC19RP12, AF170481.1) под контролем IPTG индуцибельного P _{trc-id2} промотора и I-SceI сайт	Данная работа (OK651222)
pVC-Km ^R -(Xis/Int) _{φ16} , (Xis/Int-хелпер)	Km ^R ; хелпер для эксцизии на основе шатл-вектора pVC7N; Km ^R ген с Tn903 транспозона; гены <i>φ16xis</i> и <i>φ16int</i> под контролем P _{gapA} и природного промотора, соответственно	Данная работа (OK651223)
p06-Km ^R -P _{dapA} -Cre (Cre-хелпер)	Km ^R ; хелпер для Cre- зависимой эксцизии; производный p06-P _{dapA} -cre (MG014197); шатл-вектор (репликоны: укороченный нестабильный вариант pCG1 <i>C. glutamicum</i> и pMB1 <i>E. coli</i>); Km ^R ген с Tn903 транспозона; ген <i>cre</i> рекомбиназы фага P1 под контролем P _{dapA} промотора	Данная работа (OK651224)
pVC-Am ^R -LacI-P _{trc-id2} - RecE ^{564T} (RecET-хелпер)	Am ^R ; хелпер для рекомбинации на основе шатл-вектора pVC7N; ген устойчивости к апромицину <i>aac(3)IV</i> ; гены, кодирующие RecE ^{564T} (RecE укороченный вариант) <i>E.coli</i> Рас профага под IPTG индуцибельным P _{trc-id2} промотором	Данная работа (OK651221)
pUCIDT-Ap ^R -L-Cm ^R -R	Ap ^R ; Cm ^R ; производная pUCIDT (Ap ^R), <i>E. coli</i> pMB1 репликон; <i>cat</i> из Tn9 транспозона под контролем сильного фагового промотора P _{GAI} ; матрица для амплификации центральной части линейного фрагмента [<i>attL</i> _{φ16} -T ₆₇₄ -P _{GAI} - <i>cat</i> -T _{L3} - <i>attR</i> _{φ16}]	Данная работа (OK651225)
pUCIDT-Ap ^R -L-Sm ^R -R	Ap ^R ; Sm ^R ; производная pUCIDT (Ap ^R), <i>E. coli</i> pMB1 репликон; ген <i>aadA2</i> (устойчивость к Sm) с pCG4 плазмиды (NC_004945.1); матрица для амплификации центральной части линейного фрагмента [<i>attL</i> _{φ16} -T ₆₇₄ -P _{serC} - <i>aadA2</i> -T _{L3} - <i>attR</i> _{φ16}]	Данная работа (OK651226)
pVK-lacI ^Q -Ptac-MuAB (MuAB-хелпер)	Gm ^R ; производная pVK9, содержащая гены транспозиционных факторов MuAB под контролем IPTG индуцибельного промотора P _{tac} строго регулируемого <i>lacI</i> ^Q	Gorshkova et al, 2018; (MG014199)
pАН-mini-Mu(LER)-YS (интегративная плазида)	Sm ^R ; Km ^R ; производная pАН162, <i>E. coli oriRy</i> репликон, ген <i>sacB</i> под природным промотором MuattL-T _{his} -MCS- [<i>lox66</i> -P _{17Mme} - <i>yECitrine-strAB</i> -E-element- <i>lox71</i>]-Tdeo-MuattR	Gorshkova et al, 2018; (MG014200)
pBS5TΔB	Km ^R ; на основе pBS5T (<i>oriV</i> _{Cg} ^{ts} репликон pHSC4; <i>B. subtilis sacB</i> -ген); плазида с клонированным ДНК фрагментом для инактивации природного <i>attB</i> _{φ16}	Данная работа
pKT128	Ap ^R ; pFA6a-link-yEGFP-SpHIS5 кодирует флюоресцентный белок yEGFP	Sheff and Thorn, 2004
pTurboRFP-PRL	Km ^R , Neo ^R (G418) <i>E.coli</i> /Mam (<i>oriV</i> _{Ec} из pUC, <i>oriV</i> _{mat} из SV40) беспромоторный шатл-вектор, кодирующий флюоресцентный белок TurboRFP	Евроген cat# FP235

3.2. Олигонуклеотиды

Таблица 2 - Олигонуклеотиды, использованные в данной работе

Праймер	Применение	Последовательность (5' – 3')	
P1	Конструирование pSTV-Cm ^R -(Int-attP) _{φ16}	atacgtgccagctcatgaattc-tgtcaaacatgagaattacaacttatatcg	
P2		ggagtagagacgaaagtgcacgagctc-tgatttagtgtatgatgggttttgagg	
P3		gtgtggattttgtcggatcagcttgagtaggacaatccgccgagcttcgacgag- athttcaggagctaaggaagctaaa	
P4		ctcccaacagttgcggg-cgtttaagggcaccataaactg	
P5		gaattcatgagctggcagcgtatttgaccgatccggacacctgggataat- gtgtggattttgtcggatcag	
P6		ctaatcagagctc-gtgcactttcgtctactcc	
P7		tgccctaaacgccc-gcaactgttgggaaggccgat	
P8		ccattacgatcagctgggtca	
P9		cggccgctaaatcgccaat	
P10		ccgatcggcctccaacagt	
P11		catatgggcagactactact	
P12	Конструирование pCRIM-Cm ^R -lox-attP _{φ16}	atacttacacgcaccttttcg	
P13		catatgggcagactactact	
P14		taccgttcgtataatgtatgctatacgaagtat-gagctctgatttagtgtatga	
P15		ataacttcgtatagcatacattatacgaacggta-gtgcactttcgtctactcc	
P16		ataacttcgtataatgtatgctatacgaacggta-gcggccgctaaatcgccaata	
P17	taccgttcgtatagcatacattatacgaagtat-cgatcggccttccaacagt		
P18	Конструирование pUCIDT-Ap ^R -L-Cm ^R -R pUCIDT-Ap ^R -L-Sm ^R -R	tatata-gaattcatgagctggcagcgtatt	
P19		tatata-cccggg-cgtttaagggcaccataaactg	
P20		tcaccataatgaataagatctctac	
P21		cggaacgcgcttggctgtgag	
P22	Конструирование pVC-Am ^R -Xis _{φ16}	cgggtatata-ggggtaccgagctcgaattcac	
P23		ctcagatggatecc-ggcaccgttaacgtcaacaaccacc	
P24		cgggtgcc-ggatccatctgagactttactttgtgg	
P25		gtactgtttcgaactcactcatatg-gtctctctctaaagattgta	
P26		tacaacttttagaggagacacat-atgagtgagtcgaaacgtac	
P27		ggtaagtgggtcagtttagggccgc-ccttatattttgattcatgc	
P28		gcatgaatcaaaaataagggcggccgc-ctaaactgcaccacttacc	
P29		tagcgatagtc-caaaacccgcacaccaaag	
P30		gggtttg-ggactatcgtaactgtgatcgc	
P31		acgtaattcagctcgggtccc-ggatcc-agagaattgggtatgagaca	
P32		tgctcataaccaattctct-ggatcc-gggaccgagctcgaattacgt	
P33		ctcgggtacc-tatata-cccggg-acggtaactgatgccgtattg	
P34		Конструирование pVC-Am ^R -Int _{φ16}	cgggtatata-ggggtaccgagctcgaattcac
P35			tatatatatctagacatagga-cggttaacgtcaacaaccacc
P36	tatgtctagatataatagatc-ccattacgatcagctgggtcag		
P37	atgggtcgacctgcag-ttagctaagcctgtgacctgg		
P38	ctcgggtacc-tatata-cccggg-acggtaactgatgccgtattg		
P39	tgctcataaccaattctct-ggatcc-gggaccgagctcgaattacgt		
P40	acgtaattcagctcgggtccc-ggatcc-agagaattgggtatgagaca		
P41	ctaaactgcaggtcgacctatgg-actatcgtaactgtgatcgc		
P42	Конструирование pVC-Am ^R -Int _{φ16} -SceI	tatataatcagtggaaggagctgactgggtga	
P43		gttaaftaacctcctatc-gat-gctagctctagatcctgtgtg	
P44		atcgataggaggttaattaac-atgcatcaaaaaaccaggtaat	
P45		ttatttcaggaaagtccggag	
P46		tgctcataaccaattctctg	
P47		attaccctgtatcccta-gatcgaatgaccacagg	

Праймер	Применение	Последовательность (5' – 3')
P48	Конструирование pVC-Km ^R -(Xis/Int) _{φ16}	ggatcccctatata-ggatcc-atctgagactttactttg
P49		gtacgttttcgactcactcatatg-gtgtctctctaaagattgta
P50		tacaatcttttagaggagacacat-atgagtgagtcgaaaacgtac
P51		ggtaagtgggtgcagtttagcggccgc-ccttatattttgattcatgc
P52		gcatgaatcaaaaataaagggcggccgc-ctaaactgcaccacttacc
P53		caaaaccccgcatcaccsaag
P54		tctagacataggcaccgtaa
P55		ggatcccatttacgatcagct
P56		ctacggaaggagctgtggacc
P57		tatata-gtcgac-agtcgattggctgagctcatg
P58		gataagtcgaccgatcgccttccaacag
P59	tgagggagccacggttgatga	
P60	Конструирование pVC-Am ^R -LacI-P _{trc-id2} - RecE ^{564T}	cgggtatata-gggtagcagctcgaattcac
P61		tccggaagatctcataggca-cggtaacgtcaacaaccacc
P62		ctcgttacc-tatata-cccggg-acggtaactgatccgattttg
P63		tgtctcataaccaattctct-ggatcc-gggaccgagctcgaattacgt
P64		acgtaattcagctcgggtccc-ggatcc-agagaattgggtatgagaca
P65		gtaatgc-ccatgg-actatcgtaatcgtgatcgc
P66		cgatagt-ccatgg-gcattacaccgccagggtgaa
P67		taatctgagttgaggttaaaaaacaatg-gaacatccgcacaatgagaatgct
P68		ttaacctcaactcagatta-gctagctctagatcctgtgtg
P69	tgctatgatgactctccgga -atcgat- ggaaggagctgactgggtga	
P70	Конструирование pBS5T-ΔB	tgtggaagatccaggattagcc
P71		ctcgcaagctatccccacaag-aaccacagttcgactaattaacg
P72		cgtaaattagtcgaactgtgggtt-cttggtgggatagcttgcgag
P73		ccaagggttagagcctcatc
P74		ccaatgagcatgaggatcgt
P75		tgacaacgggtggaggaacta
P76		gacggcggccttgttgaataa
P77	Конструирование pO6-Km ^R -P _{dapA} -Cre	ctgttccaaggctttctag-ccatggtcgtcacagagctgg
P78		ctttacgcgttaaaaaggac-ctagcggagtgtatactggct
P79		gtccttttaacgcgtaaag-ccacgttgtgtctcaaaatc
P80		ctagaagcctttggaacag-ggcggagcgtgaaataagtg
P81	Клонирование P _{dapA} - yEGFP фрагмента в pCRIM-Cm ^R -lox-attP _{φ16} ; MluI and XhoI подчеркнуты	tatata-acgct-agtccaagcttgcacgctg
P82		ttaacacctctgtcgacagc
P83		gctgtcgacaggggtgtaa-atggctcagcaaacgacggcttaaca
P84		atat-ctcgag-tcagggcaatgcagatccg
P85	Клонирование P _{cskA} - turboRFP фрагмента в pCRIM-Cm ^R -lox-attP _{φ16}	atatacgcgtggaaatattaaccttgcacagc
P86		tctgttccctcttctagattccttgcgggtttattgt
P87		tctagaaggagggaacagaatgagcagctgatcaaggag
P88		atatctcgagttatctgtgccccagttgc
P89	Определение точки интеграции mini- Mu(LER) на MuL	tcggtttcattgattaacgac
P90		aaccgggaggacattggatt
P91	Определение точки интеграции mini- Mu(LER) на MuR	taatacatctgtttcattgaagcg
P92		ctgcttttattcattacatggg
P93	Подтверждение интеграции pCRIM-Cm ^R - attP _{φ16} и ее производных в природный attB _{φ16}	tgtggaagatccaggattagcc
P94		cttggcctgcaacgatgtaa
P95		gggcaaatcaccgctagtga
P96		cgggtgagattagtggacgt

Праймер	Применение	Последовательность (5' – 3')
Конструирование линейного фрагмента		
P97	ds#542Sm	gcgcgcagctgcagatgctgg
P98		cccacagttcgactatttaacg-tcaggaagtgcacgcagctcaa
P99		ttgagctgcgtgcacttctga-cgttaaatagtcgaactgtggg
P100		acaccctcaggttccgcgacc-ctcgcaagctatccccac
P101		gtggggatagcttgcgag-ggtcgcggaacctgagggtgt
P102		tctcgtcgcggtcgtaaagca
P103	ds#1741Sm	acccaacacctaggtgctgga
P104		cccacagttcgactatttaacg-agttgcacgcaactcatccag
P105		ctggatgagttgcgtgcaact-cgttaaatagtcgaactgtggg
P106		tgccactgtgactggtttgtc-ctcgcaagctatccccac
P107		gtggggatagcttgcgag-gacaaccagtcacagtggca
P108		gaggggaatcatcgtggactgc
P109	ds#1865Sm	acacatcctgctcgacgaacc
P110		cccacagttcgactatttaacg-gacggcatcaggggagccctc
P111		gagggctcccctgatgccgtc-cgttaaatagtcgaactgtggg
P112		cgcgcagacaacaccgacgtc-ctcgcaagctatccccac
P113		gtggggatagcttgcgag-gacgtcgggtgtctgcgcg
P114		cgcgcagacaacaccgacgtc
P115	ds#400Cm	aaccaaggaggagtccacaag
P116		cccacagttcgactatttaacg-cagggctaaaactcttacct
P117		aggataagagtttagccctg-cgttaaatagtcgaactgtggg
P118		ggaccgaacaccccgtttg-ctcgcaagctatccccac
P119		gtggggatagcttgcgag-caaagacgggggttcggctc
P120		gaggaattcatcgggtgatgat
P121	ds#668Cm	attccgctgaggtttgattttg
P122		cccacagttcgactatttaacg-ccgaagcaatcgactggccaa
P123		ttggccagtgcgattgcttcgg-cgttaaatagtcgaactgtggg
P124		tacgacgacacagaaggtgtt-ctcgcaagctatccccac
P125		gtggggatagcttgcgag-aaacaccttctgtcgtcgta
P126		gaatccattgtggacaaagatc
P127	ds#2370Cm	ctttctgcctagegcaattg
P128		cccacagttcgactatttaacg-ctgctgttttctcatcgct
P129		agcgatgaggaaaaacagcag-cgttaaatagtcgaactgtggg
P130		gtgctcatgtcgcgcctttt-ctcgcaagctatccccac
P131		gtggggatagcttgcgag-aaaaggcgcgcacatgagcac
P132		tttctactcatcgggttcgt
P133	ds#484Cm	tgggcatgtgagggtttctt
P134		cccacagttcgactatttaacg-aacaatacgtgtgaagggtg
P135		caacctcaacacgtattgtt-cgttaaatagtcgaactgtggg
P136		cataatgttcagtcacggtttc-ctcgcaagctatccccac
P137		gtggggatagcttgcgag-gaaaccgtgactgaacattatg
P138		aggacacggtcgacgggtgagg
P139	ds#2393Sm	tgagatgatcgaggtatgcat
P140		gtggggatagcttgcgagcgtcgcagtcaggatcttctt
P141		aagaagatcctgactgcagcgtcgcgaagctatccccac
P142		ggttgataaataaggtctggatttcggttaaatagtcgaactgtggg
P143		cccacagttcgactatttaacggaaatccagacctatttatcaacc
P144		ggattcacaccgtagtagtt
P145	ds#542Sm	catatgcgtacatccattgcc
P146		cgtgccaacgtcgggtgta

Праймер	Применение	Последовательность (5' – 3')
P147	ds#1741Sm	gcagaacaagaactcctcctc
P148		ggaaggtgacgccgaagactt
P149	ds#1865Sm	tgaacgccaacgcgtcctcat
P150		gtggatccatccaacgacgca
P151	ds#2393Sm	cgttcaaacattatccaga
P152		gtcaggcagttctgcgaatag
P153	ds#484Cm	acaagttcgacagcgcgttgt
P154		tctccaggccgaagccctcca
Тестовые праймеры для подтверждения RecE ⁵⁶⁴ T –опосредованной рекомбинации и Mu-зависимой mini-Mu(LER) интеграции в хромосому <i>C. glutamicum</i> ATCC 13869		
P155	#400	acgaggactgcataaactgc
P156		gactagcccaggcggtttatc
P157	#668	tgaagagtcaggtccatac
P158		cctaaccaaacactcgtgaaa
P159	#2370	aggagacacccccgatataca
P160		Tcgggtcaccagtcagatac
P161	Праймеры для подтверждения наличия mini-Mu(LER)	agatcgtgcagcggcgctactc
P162		cccagatcatatgaacaaca
P163	Определения точки интеграции mini-Mu(LER) (MuL)	tcgcgtttcattgattaacgac
P164		aaccgggaggacattggatt
P165	Определения точки интеграции mini-Mu(LER) (MuR)	taatacatctgtttcattgaagcg
P166		ctgctttttattcattacatggg
Праймеры для подтверждения положения mini-Mu(LER) транспозона в конкретной точке <i>C. glutamicum</i> ATCC13869		
P167	#258	gaccttcctgatcaacattgg
P168		tgatggcgtggcagtatatag
P169	#1883	cattatgcgaaagctcactgt
P170		tggacttcatggcagcaatag
P171	#2123	ctcaaaactagcgaaggatct
P172		tacgagtggaaagcaaacggaa
P173	#35	gcagcatatggattgtggca
P174		ttgttaaagccaccatggt
P175	#198	ttggaatgcgatcacggtag
P176		cacaaggtttacgaggacaga
P177	#209	tftcgactactaaagaacg
P178		agatctctcgaagttcaca
P179	#1213	agatgacttgggtgacagatgtt
P180		tttacgtggctcttcaactt
P181	#1275	atggccagtgggaagctttaa
P182		aaggagaaggacggacgcca
Праймеры для подтверждения положения mini-Mu(LER) транспозона в конкретной точке <i>C. glutamicum</i> ATCC13032		
P183	#177	gatcaacgaacacaccgatttcac
P184		cagtgcaggaatggtgactc
P185	#544	atcatcagtgcttgtccagaa
P186		tgaaaaatccaactccag
P187	#657	ggagactgtcagatttcca
P188		tacagttggaagcctgacct
P189	#2020	atgtcaatgctcccgtactg
P190		gttcagtcgttgcgagatcc

Праймер	Применение	Последовательность (5' – 3')
P191	#2393	cattgggtgggaattgcttac
P192		ggattgtgacgggtgctgaca
P193	#3244	gtaaccatcactctcaccatgct
P194		caagtgatcagatttctctgt
Праймеры для подтверждения положения mini-Mu(LER) транспозона в конкретной точке MB001		
P195	#190	ggtttcggtagcacggttta
P196		ctgggccgggaatgctaata
P197	#837	tatctgggtggaggattatga
P198		cctcactagtagcgggataa
P199	#1128	accatgcgtaagggtattca
P200		ctgaatctgatgcgcgaaac
P201	#1320	ccagtcaacgtcattaatca
P202		ctgcctagcgattcctaaag
P203	#1540	tggcaggtaggacgtacaatta
P204		cctatgcctgaaagtttct
P205	#2684	ctacgttggttcgaagtgc
P206		tcgaatgatggaatacacac

3.3. Стандартные генно-инженерные методики

Используемые в работе рестрикционные ферменты, T4 ДНК-лигаза, ДНК-полимераза High Fidelity PCR Enzyme Mix были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Gibson Assembly Master Mix был заказан в New England BioLabs (Ipswich, MA, USA), а ДНК-полимераза Taq, применяемая для проверки полученных конструкций, была поставлена компанией Силекс-М (Москва, Россия). Все ферменты использовались в соответствии с инструкциями производителей. Секвенирование ДНК производилось на коммерческой основе компанией Евроген (Москва, Россия). ДНК синтез осуществлялся на заказ в Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/pages/products/genes-and-gene-fragments/custom-gene-synthesis>). Набор Plasmid Miniprep применялся для выделения плазмидной ДНК, набор Cleanup использовался для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей, оба производства «Евроген» (Москва, Россия). Геномную ДНК выделяли с помощью набора для очистки геномной ДНК Wizard® (Promega, Madison, USA). В случае использования геномной ДНК для электротрансформации в штаммы *S. glutamicum* проводилась дополнительная очистка полученного препарата методом фенол - хлороформной экстракции (Sambrook and Russell, 2001).

3.4. Методы работы с бактериофагами

3.4.1. Индукция фага $\phi 16$ из лизогенного штамма

Профаг $\phi 16$ был индуцирован из природного лизогена *C. glutamicum* ATCC 21792. *C. glutamicum* ATCC 21792, а также его излеченный от профага $\phi 16$ вариант, были любезно предоставлены доктором Траутветтер. УФ индукцию профага $\phi 16$ проводили согласно описанному протоколу (Moreau et al, 1995).

3.4.2. Размножение фагов $\phi 16$, $\phi 673$ и $\phi 674$

Для размножения фага $\phi 16$ аликвоту 100 мкл ночной культуры штамма *C. glutamicum* ATCC 21792с, излеченного от $\phi 16$ профага, смешивали со 100 мкл препарата фага после УФ индукции в присутствии 5 мМ CaCl_2 и 10 мМ MgSO_4 и инкубировали 30 минут в термостате для адсорбции фага.

Для размножения фагов $\phi 673$, $\phi 674$, препараты которых были получены из ВКПМ (Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов), были сделаны разведения от 10^{-1} до 10^{-10} . К 100 мкл ночной культуры штамма *C. glutamicum* ATCC 13032 были добавлены по 100 мкл разведений фага. Адсорбция фага проводилась аналогично описанной ранее процедуре для фага $\phi 16$.

Всю смесь фага с бактериальной культурой после адсорбции переносили в заранее подготовленные пробирки с 2 мл расплавленного и охлажденного до 45°C верхнего слоя (0,2% агароза, 5 мМ CaCl_2 и 10 мМ MgSO_4). Содержимое пробирок быстро перемешивали, не давая агару застыть, и выливали на заранее подготовленные чашки, с застывшим не подсушенным нижним слоем, состоящим из 25 мл LB. Через 30 минут чашки не переворачивая перемещали в термостат, инкубировали при 30°C в течении ночи. На следующий день несколько негативных колоний фага (бляшек) были перенесены в разные эппендорфы с 300 мкл фагового буферного раствора Tris-HCl pH 7,5 (50 мМ Tris, 10 мМ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 мМ CaCl_2 , 100 мМ NaCl, 0,01% желатин), и стерилизовали с помощью 0,45 мк фильтров (Millex GP 0,45 m Millipore).

Для наработки препаративного количества фага 100 мкл фаголизата из отдельной бляшки и 10 его последовательных разведений (10^{-1} - 10^{-10}) были смешаны с ночной культурой чувствительных бактерий. После процедуры адсорбции смесь была внесена в агар низкой концентрации (верхний слой) и наслоена на чашки с нижним слоем аналогично описанной ранее процедуре. Для каждого фага было определено то разведение, где образовавшиеся бляшки соприкосались краями друг с другом, образуя так называемую фаговую сетку. С выбранным разведением фага было получено по 20 чашек.

3.4.3. Определение титра фага

Определение титра фага проводилось по Грация (на плотной среде) методом агаровых слоев. Для каждого исследуемого препарата фага были сделаны разведения от 10^{-1} до 10^{-10} . Адсорбция и получение бляшек на газоне чувствительных клеток проводились аналогично описанному ранее в «Разделе 3.4.2» протоколу. Титр фага подсчитывался по следующей формуле: $n = y/vx$, где n – титр (количество фаговых частиц в 1 мл), y – количество негативных колоний на чашку, v – объем фагофильтрата в мл, x – разведение. Для точности вычисления колонии подсчитывались по тому разведению, где образовалось не меньше 5 и не больше 50 колоний. Каждое разведение фага одновременно титровалось трижды.

3.4.4. Сбор фага с чашек и его последующее концентрирование

Для концентрирования фаг собирался с 20 чашек с фаговой сеточкой. В чашки с фаголизатом добавляли 4 мл фагового буфера и оставляли на ночь при 4°C . На следующий день чашки наклоняли чтобы дать лизату стечь. К собранному буферу с фагом добавляли NaCl до к. к. 0,6 М, и центрифугировали при 11000g 10 минут и 4°C для удаления обломков клеток. Для концентрирования фага к отобранной надосадочной жидкости добавляли ПЭГ 6000 до к. к. 10% и высаживали ночь при 4°C . После центрифугирования при 11000g 10 минут и 4°C надосадочную жидкость сливали, а полученный осадок ресуспендировали в фаговом буфере в 1/10 исходного объема и оставляли на 1

час. К суспензии бактериофага добавляли равный объем насыщенного водой хлороформа, перемешивали на вортексе в течении 30 секунд и разделяли органическую и водную фазы центрифугированием при 1600g 15 минут при 4°C. Затем отбирали водную фазу, содержащую фаговые частицы и хранили полученный препарат при 4 °C для дальнейшей работы.

3.4.5. Очистка фага ультрацентрифугированием в градиенте цезия

Препарат фага, получение которого описано в «Разделе 3.4.4.» был центрифугирован в ступенчатом градиенте хлористого цезия. Ступенчатые градиенты были приготовлены путем наслаивания друг на друга растворов хлористого цезия с уменьшающейся плотностью 1 мл $\rho = 1.70$ г/мл, 2 мл $\rho = 1.50$ г/мл, 3 мл $\rho = 1.45$ г/мл, 3 мл $\rho = 1,15$ г/мл в 14 мл прозрачных центрифужных пробирках для ротора Beckman SW41. На ступенчатый градиент была наслоена суспензия бактериофага объемом 5 мл. Препарат центрифугировали при 22000 об/мин 4 часа при 4°C. Образовавшуюся голубоватую полосу частиц бактериофага на границе между слоями с плотностями $\rho = 1.45$ г/мл и 1.50 г/мл аккуратно отбирали из центрифужной пробирки. Очистка препарата фага от хлорида цезия проводилась с помощью колонок Amicon® Ultra –0,5ml centrifugal filters ultracel®-100K (URC510024) согласно инструкции производителя.

3.4.6. Выделение фаговой ДНК

К части препарата фага, полученному в «Разделе 3.4.4.», добавляли ДНКазу и РНКазу до к. к. 5 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно, и инкубировали 30 минут при 37°C для удаления примеси бактериальной ДНК и РНК. Далее добавляли 0,5 М рН8 ЭДТА до к. к. 20 мМ, протеиназу К до к. к. 100 мкг/мл и SDS 25% до к. к. 0,5% и инкубировали 1 час при 65°C для разрушения фагового капсида. Далее добавляли равный объем насыщенного буфером фенола, перемешивали содержимое пробирки и разделяли фазы путем центрифугирования при 1600g в течение 5 минут при комнатной температуре. В чистую пробирку переносили водную фазу, которую экстрагировали смесью

насыщенного буфером фенола и хлороформа (50:50). Вновь отобранную водную фазу экстрагировали равным объемом хлороформа. Для высаживания фаговой ДНК к водной фазе добавляли 5 М NaCl до к. к. 250 мМ и равный объем 96% этанола. Полученную ДНК осаждали центрифугированием, полученный осадок трижды отмывали 70% этанолом. После испарения остатков спирта ДНК растворяли в 500 мкл воды.

3.4.7. Секвенирование и аннотация фаговых геномов

3.4.7.1. Секвенирование геномов фагов ϕ 16, ϕ 673, ϕ 674

Очищенную ДНК фага ϕ 16 подвергали гидродинамическому разрыву, и фрагменты размером от 2 до 5 т. п. н. тупили, затем клонировали в вектор и секвенировали по методу Сенгера. Всего было секвенировано 346 отдельных фрагментов ДНК со средней длиной 750 ± 130 п. н., было достигнуто 6,6-кратным перекрытием последовательности. Закрывание пробелов производилось путем дополнительных прочтений с праймеров написанных на уже изветные области в направлении неизвестных. Очищенную геномную ДНК двух других фагов ϕ 673 и ϕ 674 секвенировали с использованием технологии Illumina в компании «Евроген» (Москва, Россия, <http://www.evrog-en.ru>). Секвенирование геномов завершали определением cos-сайтов посредством чтения концевой последовательности линейной молекулы и ее последующего сравнения с нуклеотидной последовательностью лигированных концов фага.

3.4.7.2. Инструменты для аннотации геномов

Три биоинформатические программы были использованы для предсказания открытых рамок считывания: Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), Glimmer 3 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi) and GeneMark S (<http://exon.biology.gatech.edu/>). Предполагаемые гены тРНК были предсказаны с помощью tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>). Два инструмента: phiSITE PromoterHunter (<http://www.phisite.org/main/index.php?nav=tools&navsel=hunter>) и PePPER toolbox (<http://pepper.molgenrug.nl>) были использованы для поиска предполагаемых

промоторов. Внутренние терминаторы были идентифицированы с помощью «ARNold finding terminators» (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>) с дополнительной оценкой параметров свободной энергии с помощью онлайн-версии программы ViennaRNA package (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>).

3.4.8. Электронная микроскопия фаговых частиц

Электронная микроскопия фаговых частиц проводилась на коммерческой основе в национальном исследовательском центре «Курчатовский институт» на просвечивающем электронном микроскопе FEI Titan80-300. Микроскопия изображения регистрировались на цифровую камеру Gatan US1000 с разрешением 2000x2000 пикселей.

3.4.9. Электрофорез белков капсида фага в полиакрилоидном геле

Электрофорез проводили по методу Лэммли (Cleveland et al, 1977) и окрашивали Кумасси (Coomassie® Brilliant blue G 250 «Sigma», США). Раствор содержал 1,25 г/л Кумасси, 10% уксусной кислоты и 40% этанола. Раствор для отмывки состоял из 10% уксусной кислоты. В качестве маркера использовали смесь рекомбинантных белков Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (10–250 kD) («Invitrogen», США). Пробы готовили следующим образом: 10 мкл образца фага, очищенного после ультрацентрифугирования в градиенте цезия в «Разделе 3.4.5.» смешивали с 5 мкл буфера для нанесения проб (50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 100 мМ ДТТ, 2% додецилсульфат натрия, 10% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий). Пробы прогревали 10 мин при 95°C. Весь объем пробы наносили на гель. Масс-спектрометрический анализ белков капсида проводился на коммерческой основе в Институте Биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича.

3.5. Электротрансформация клеток *C. glutamicum*

Аликвота 200 мкл ночной культуры ($ОП_{600} \approx 12$) *C. glutamicum* была внесена в пробирку с 5 мл жидкой среды ВНИ, дополненной 1 мл 10% глицина и 0,5 мл 1% Tween80. Клетки инкубировали при 30°C в условиях аэрации (250 об/мин) до $ОП_{600} \approx 1,5-2$ в течении примерно 2 часов. Затем культуру клеток из

одной пробирки осаждали центрифугированием для электротрансформации одной пробы, промывали трижды стерильной деионизованной водой при комнатной температуре (20-22°C) и концентрировали таким образом, чтобы общий объем с учетом добавленного образца ДНК, был равен 100 мкл. Отмытые электрокомпетентные клетки смешивали с ДНК непосредственно перед трансформацией и переносили в стерильную предварительно охлажденную 0,1 см кювету. Электротрансформацию проводили с использованием MicroPulser™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) электропоратора с параметрами электрического импульса 1,6 kV, 25 μ F и 200 Ω (1,6 kV, 25 μ F и 200 Ω).

Клеточную суспензию после проведения электропорации немедленно вносили в 1 мл среды ВНИ и инкубировали при 30°C в условиях аэрации. Последующий отбор желаемых трансформантов проводился на твердой селективной среде (1,6% агар). После высева чашки инкубировались в течение 1-2 дней при 30°C.

3.5.1. Трансформация клеток плазмидной ДНК с помощью процедуры электропорации

Для стандартной электротрансформации добавляли \approx 100 нг плазмидной ДНК. Время подращивания после электропорации составляло 2 часа, и было одинаковым для всех трех штаммов *C. glutamicum*: ATCC 13869, ATCC 13032 и MB001 (за исключением плазмиды p06-Km^R-P_{dapA}-Cre, время подращивания которой составляло 1 час). Для достижения высокой эффективности трансформации клетки штамма *C. glutamicum* ATCC 13032 дополнительно инкубировали при 46°C в течение 6 мин сразу после электропорации.

3.5.2. RecE⁵⁶⁴T-зависимая интеграция линейного фрагмента ДНК в хромосому

Для интеграции линейного ПЦР фрагмента в хромосому *C. glutamicum* с помощью RecE⁵⁶⁴T-опосредованной гомологичной рекомбинации, в штамм *C. glutamicum* был введен RecET-хелпер. Аликвота ночной культуры штамма с хелперной плазмидой была перенесена в жидкую среду ВНИ с добавлением

глицина и Tween80, как было описано ранее, также были добавлены Am30 и 2 mM IPTG, для поддержания хелперной плазмиды и индукции экспрессии генов RecE^{564T}, соответственно. Два мкг маркированного ПЦР фрагмента электропорировали в компетентные клетки. Сразу после процедуры электротрансформации клетки немедленно переносили в 1 мл среды ВНІ с добавлением 2 mM IPTG и инкубировали при 30°C в течение 3,5 часов в условиях аэрации.

3.5.3. Трансформация клеток геномной ДНК с помощью процедуры электропорации

Для проведения электротрансформации к компетентным клеткам добавляли 20 мкг (20-50 мкл) свежewedенной геномной ДНК. Время подращивания составляло 2 часа. В случае электротрансформации геномной ДНК в штамм *C. glutamicum* ATCC 13032 процедура теплового шока не применялась, поскольку это не влияло на эффективность.

3.6. Интеграция mini-Mu транспозона в хромосому *C. glutamicum* и определение его точки интеграции

Для проведения интеграции mini-Mu в хромосому *C. glutamicum* ATCC 13869 клетки, содержащие хелперную плазмиду pVK-*lacI*^q-P_{lac}-MuAB, засеивали с высокой начальной плотностью (ОП₆₀₀ ≈ 0,5-0,8) и культивировали в среде ВНІ с добавлением Gm1 для поддержания плазмиды при 37°C в течение ночи. Для проведения интеграции mini-Mu в хромосому *C. glutamicum* ATCC 13032, MB001 большое количество клеткок с хелперной плазмидой засеивались в среду ВНІ также с добавлением Gm1 и подращивались при 30°C в течение ночи. Затем аликвоту 200 мкл ночной культуры клеток *C. glutamicum* ATCC 13032 и MB001, содержащих хелперную плазмиду, вносили в 5 мл жидкой ВНІ среды с добавлением Am30 и IPTG до к. к. 2 mM для индукции экспрессии генов MuAB и подращивали при 30°C до ОП₆₀₀ 1,5-2 в течение ≈ 2 часов. А аликвоту 200 мкл ночной культуры штамма ATCC 13869, содержащей хелперную плазмиду, вносили в 5 мл жидкой ВНІ среды с добавлением Твина80 и глицина, Gm1 и 2

мМ IPTG и подращивали при 30°C 2 часа. Далее для всех 3 штаммов для введения плазмиды рАН-mini-Mu(LER)-YS был использован протокол электротрансформации, описанный в «Разделе 3.5.1.». Сразу после электротрансформации суспензия клеток была перенесена в 1 мл жидкой ВНИ среды с добавлением 2 мМ IPTG и подкачивалась в течение 2 часов при 30°C. Для штамма *S. glutamicum* ATCC 13032 суспензию клеток сразу после электропорации дополнительно инкубировали при 46°C в течение 6 мин для увеличения эффективности mini-Mu интеграции.

Интегранты для всех трех штаммов отбирались на твердой ВНИ среде с добавлением Sm25. Полученные Sm^R клоны проверялись на наличие маркера Km^R, свидетельствующего о наличии неразрешенного коинтеграта. Для дальнейшего определения точек Mu-интеграции отбирались только клоны с фенотипом Km^S. Часто в случае штаммов ATCC 13032 и MB001 клоны с фенотипом Km^S при репликации 100 и более клонов не выявлялись, в таком случае Km^R клоны были засеяны в 5 мл жидкой ВНИ без добавления антибиотиков при 30°C и культивировались в течение 48 часов с одним пересевом и последующим высевам в разведениях на агаризованные чашки с ВНИ средой. И повторно проверялись на отсутствие неразрешенного коинтеграта, о чем свидетельствовал Km^S фенотип.

Определение точек интеграции mini-Mu транспозона в бактериальную хромосому проводилось по ранее разработанному методу (Зименков и др, 2004). Для этого геномную ДНК выделяли из Sm^R, Km^S клонов первичных интегрантов и независимо обрабатывали рестрикционными ферментами *EcoRI* и *HindIII*, сайты которых располагались рядом с Mu-L или Mu-R концами mini-Mu транспозона, соответственно. Полученные линейные фрагменты хромосомы были закольцованы с помощью T4 ДНК лигазы в условиях низкой концентрации ДНК, что гарантировало самокольцевание линейных фрагментов.

Используя полученную лигазную смесь в качестве матрицы и дивергентно направленные праймеры P163/P164 и P165/P166, отжигающиеся на Mu-L и Mu-R концы mini-Mu транспозона, соответственно, была поставлена ПЦР. Нуклеотидная последовательность фланкирующих mini-Mu транспозон

участков ДНК хромосомы хозяина в полученных ПЦР фрагментах была определена, используя P163 (Mu-L) и P165 (Mu-R) праймеры. Место интеграции идентифицировали, сравнивая данные сиквенса по методу Сенгера с опубликованными нуклеотидными последовательностями геномов, представленных в базе данных GenBank NCBI, *C. glutamicum* ATCC 13869 (GenBank AP017557.2), *C. glutamicum* ATCC 13032 (GenBank NC003450.3) и MB001 (GenBank CP005959.1).

3.7. Излечение штаммов от хелперных плазмид

3.7.1. Стандартная методика элиминирования плазмид

Для излечения штамма от хелперной плазмиды, небольшое количество культуры засеивали в пробирку с 5 мл жидкой среды ВНИ без антибиотика и растили в течение ночи. Аликвоту 10 мкл ночной культуры добавляли к 5 мл свежей среды и снова выращивали в течение ночи. Затем клетки высевали в разведениях (10^{-5} - 10^{-4}) на твердую среду без каких-либо антибиотиков. Полученные клоны перекалывали на среду с селективным антибиотиком соответствующей плазмиды и без него. В результате более 90% тестируемых клонов элиминировали хелперную плазмиду.

3.7.2. Элиминирование плазмиды pVC-Am^R-Int_{φ16}-SceI (Int^{SceI}-хелпер)

Чтобы элиминировать Int^{SceI}-хелпер излечиваемую культуру выращивали в течение ночи в жидкой среде ВНИ с добавлением 2 mM IPTG для индукции экспрессии гена мегануклеазы I-SceI. Далее ночную культуру аналогичным образом высевали в разведениях на твердую среду и реплицировали в соответствии со стандартным методом элиминирования плазмид, описанным выше. В результате pVC-Am^R-Int_{φ16}-SceI была удалена из более чем 50% проверенных клонов.

3.7.3. Элиминирование плазмиды p06-Km^R-P_{dapA}-Cre (Cre-хелпер)

Cre-хелпер вводился в клетки *C. glutamicum*, содержащие предварительно интегрированную pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16}, либо ее производные для вырезания

фланкированной *lox*-сайтами векторной части. Полученные после трансформации Km^R клоны рассеивались до отдельных колоний на твердой ВНИ среде, не содержащей антибиотика. Фенотипы Cm^S и Km^S полученных клонов свидетельствовали об утрате ДНК фрагмента, заключенного между *lox* сайтами и излечивании штамма от $p06-Km^R-P_{darA}$ -Cre плазмиды, соответственно.

3.8. Измерение относительной флуоресценции

Для измерения удельной флуоресценции использовались ночные культуры штаммов *C. glutamicum*, содержащих интегрированные в хромосому гены TurboRFP и/или уEGFP, и контрольного штамма (не имеющего флюоресцентных генов в хромосоме). Из ночных культур отбирались аликвоты, дважды отмывались водой и разводились таким образом, чтобы среднее значение OP_{600} соответствовало 0,2-0,3. Далее 200 мкл суспензии переносились в 96-well плашки (GBO, Kremsmünster, Austria) для измерения. Оптическая плотность (OP_{600}) и флуоресцентная интенсивность (F) полученной суспензии определялась с помощью прибора Tecan Infinity M200 plate reader (Tecan, Austria). Для TurboRFP и уEGFP были выбраны длины волн возбуждения/испускания 540-574 нм и 490/522 нм, соответственно. В качестве фона была принята интенсивность флуоресценции воды в отсутствии клеток (Fфон). Относительная интенсивность флуоресценции рассчитывалась по формуле: $RF = [(F_{опыт} - F_{фон}) / OP_{опыт}]$ и выражалась в условных единицах.

3.9. Конструирование рекомбинантных плазмид

Для конструирования плазмиды $pSTV-Cm^R-(Int-attP)_{\phi 16}$ (3823 п. н.) сначала была получена промежуточная конструкция ($pSTV-Cm^R$). Она была собрана из трех фрагментов по методу Гибсона с использованием набора Gibson Assembly (NEB, США). Первый фрагмент (1099 п. н.) содержал *E. coli* репликон $p15A$, и был получен с помощью ПЦР, используя праймеры P1/P2 и плазмиду $pSTV28$ в качестве матрицы. Второй фрагмент (841 п. н.) содержал ген устойчивости к хлорамфениколу транспозона Tn9 под контролем сильного фагового промотора P_{GA1} . Фрагмент P_{GA1} -*cat* был получен в результате двух

последовательных ПЦР: сначала с матрицы pSTV28, используя праймеры P3/P4, был наработан фрагмент (791 п. н.), затем полученный фрагмент был удлинен с помощью праймеров P5/P4. Третий фрагмент (274 п. н.), содержащий кассету T₆₇₄-MCS-T_{L3} (сайт множественного клонирования, окруженный терминаторами T₆₇₄ коринефага ϕ 674 и *tL3* фага λ), был амплифицирован с синтезированной на заказ соответствующей конструкции, используя праймеры P6/P7. Итоговая плаزمиды pSTV-Cm^R-(Int-*attP*) _{ϕ 16} была получена в результате лигирования двух фрагментов. Фрагмент P_{native-int-attP} (1697 п. н.) содержал ген интегразы фага ϕ 16 под контролем природного промотора и *attP*-сайт, был амплифицирован с хромосомы фага ϕ 16 с использованием праймеров P8/P9, обработан киназой и лигирован с фрагментом (2126 н. п.), наработанным с праймеров P10/P11 и промежуточной конструкции (pSTV-Cm^R) в качестве матрицы.

pCRIM-Cm^R-*lox-attP* _{ϕ 16} (2609 п. н.) интегративная плазмиды (GenBank ANo OK651220) была получена на основе pSTV-Cm^R-(Int-*attP*) _{ϕ 16} в два этапа. На первом этапе большая часть гена интегразы и последовательность промотора была удалена. С этой целью, используя праймеры P12/P13, был наработан фрагмент (2541 п. н.), содержащий большую часть плазмиды pSTV-Cm^R-(Int-*attP*) _{ϕ 16}, за исключением удаляемой области, обработан киназой и закольцован с образованием pCRIM-Cm^R-*attP* _{ϕ 16} плазмиды. На втором этапе были введены *lox*-сайты. Для этого с плазмиды pSTV-Cm^R-*attP* _{ϕ 16} были амплифицированы два фрагмента, используя праймеры P14/P17 (1972 п. н.) и P15/P16 (705 п. н.), и объединены по методу Гибсона с образованием плазмиды pCRIM-Cm^R-*lox-attP* _{ϕ 16}.

Плазмиды pUCIDT-Ap^R-L-Cm^R-R (GenBank ANo OK651225) и pUCIDT-Ap^R-L-Sm^R-R (GenBank ANo OK651226) были сконструированы для использования в качестве матриц для наработки центральной части линейного фрагмента. Конструирование матриц осуществлялось на основе плазмиды pUCIDT-Ap^R-L-MCS-R (3437 п. н.), содержащей синтезированную кассету [*attL* _{ϕ 16}-T₆₇₄-MCS-T_{L3}-*attR* _{ϕ 16}], клонированную в вектор pUCIDT-Ap^R (2752 п.н.) компанией, проводившей синтеза гена. Для получения плазмиды pUCIDT-Ap^R-L-Cm^R-R (4278 п.н.) фрагмент P_{GAI-cat} (P18/P19, 841 п. н.), полученный с

матрицы pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16} и обработанный киназой, был клонирован в сайт *HpaI* pUCIDT-Ap^R-L-MCS-R плазмиды. Плазида pUCIDT-Ap^R-L-Sm^R-R (4639 п. н.) была также сконструирована на основе pUCIDT-Ap^R-L-MCS-R. Фрагмент P_{serC-aadA2} (1202 п. н.), содержащий ген устойчивости к стрептомицину *aadA2* с плазмиды pCG4 (NC_004945.1) под контролем коринобактериального промотора гена *serC*, амплифицированный праймерами P20/P21 с p07sR в качестве матрицы, был обработан киназой и клонирован в сайт *HpaI* сайт плазмиды pUCIDT-Ap^R-L-MCS-R.

Плазида pVC-Ap^R-Xis_{φ16} (6373 п. н.) была собрана из трех фрагментов по методу Гибсона. Первый фрагмент (4182 п. н.) содержал ориджины репликации *E. coli* и *C. glutamicum* pMB1 и pBL1, соответственно, был наработан с праймеров P22/P23 и pVC7N (LC425431.1) плазмиды в качестве матрицы. Второй фрагмент представлял собой кассету P_{gapA-xis}-T_{nus} (705 п. н.) и состоял из гена эксцизионазы *xis* фага φ16 под контролем коринобактериального промотора P_{gapA} и терминатора T_{nus}. Данная кассета была получена из трех фрагментов. Фрагменты были амплифицированы с использованием соответствующих праймеров и матриц: P_{gapA} (P24/P25, хромосома *C. glutamicum* ATCC13869); *xis* (P26/P27, хромосома фага φ16); T_{nus} (P28/P29, хромосома *C. glutamicum* ATCC 13869). Три полученных фрагмента были последовательно объединены с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами. Фрагменты P_{gapA} (444 п. н.) и *xis* (246 п. н.) были перекрыты с помощью праймеров P24/P27, а полученный фрагмент P_{gapA-xis} (645 п. н.) был далее объединен с T_{nus} (108 п. н.), используя P24/P29 праймеры. Третий фрагмент (1546 п. н.) состоял из двух частей, объединенных с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами P30/P33. Первая часть фрагмента (1299 п. н.) содержала кодирующий устойчивость к апромицину ген *aac(3)-VI* под контролем природного промотора и была получена с матрицы pPK103, используя праймеры P32/P33. Вторая часть фрагмента (295 п. н.) несла терминатор фага T₆₇₄ полученный с хромосомы фага φ674 праймерами P30/P31.

Базовый хелпер pVC-Am^R-Int_{φ16} (7171 п. н.) был собран из трех фрагментов по методу Гибсона. Первый фрагмент (4189 п. н.) содержал ориджины

репликации *E. coli* и *C. glutamicum* pMB1 и pBL1, соответственно, был наработан с праймеров P34/P35 и pVC7N (LC425431.1) плазмиды в качестве матрицы. Второй фрагмент P_{native-int} (1484 п. н.) содержал ген интегразы фага ϕ 16 и был амплифицирован с помощью ПЦР с хромосомы ϕ 16, используя праймеры P36/P37. Третий фрагмент (1558 п. н.) состоял из двух частей, объединенных с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами P38/P41. Первая часть фрагмента (1299 п. н.) содержала кодирующий устойчивость к апрамицину ген *aac(3)-VI* под контролем природного промотора и была получена с матрицы pPK103, используя праймеры P38/P39. Вторая часть фрагмента (307 п. н.) несла терминатор фага T₆₇₄, полученный с хромосомы фага ϕ 674 праймерами P40/P41.

Для создания pVC-Am^R-Int _{ϕ 16}-SceI (9585 п. н.) (GenBank ANo OK651222) в базовый pVC-Am^R-Int _{ϕ 16} хелпер была введена кассета LacI-P_{trc-id2}-I-SceI (2396 п. н.), содержащая ген мегануклеазы I-SceI под контролем промотора P_{trc-id2} (P_{trc}/O_{lac-id}-O_{lac}) и дивергентно-транскрибируемый ген *lacI*. Данная кассета была получена из двух фрагментов с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами P42/P45. Первый фрагмент LacI-P_{trc-id2} (1694 п. н.) был получен, используя праймеры P42/P43 и pVC-Am-LacI-P_{trc-id2}-utr в качестве матрицы. Второй фрагмент I-SceI (723 п. н.) был наработан с плазмиды pUCRP12 (AF170481.1) праймерами P44/P45. Объединенный фрагмент, содержащий кассету LacI-P_{trc-id2}-I-SceI, был обработан киназой и клонирован в *Sma*I сайт базового хелпера pVC-Am^R-Int _{ϕ 16}. Для введения I-SceI-сайта рестрикции с полученной конструкции с помощью расходящихся праймеров P46/P47 (последовательность Sce-I-сайта вписана в праймер P47) был амплифицирован фрагмент (9585 п. н.). Фрагмент был кинирован и закольцован с образованием плазмиды pVC-Am^R-Int _{ϕ 16}-SceI.

Для создания pVC-Km^R-(Xis/Int) _{ϕ 16} (8107 п. н.) (GenBank ANo OK651223) в базовый хелпер pVC-Am^R-Int _{ϕ 16} сначала была введена кассета P_{gapA-xis}-T_{nus} (700 п. н.), состоящая из гена эксцизионазы *xis* фага ϕ 16 под контролем коринобактериального промотора P_{gapA} и терминатора T_{nus}. Данная кассета была получена из трех фрагментов. Фрагменты были амплифицированы с

использованием соответствующих праймеров и матриц: P_{gapA} (P48/P49, хромосома *C. glutamicum* ATCC 13869); *xis* (P50/P51, хромосома фага $\phi 16$); T_{nus} (P52/P53, хромосома *C. glutamicum* ATCC 13869). Три полученных фрагмента были последовательно объединены с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами. Фрагменты P_{gapA} (451 п. н.) и *xis* (246 п. н.) были перекрыты с помощью праймеров P48/P51, а полученный фрагмент $P_{gapA-xis}$ (652 п. н.) был далее объединен с T_{nus} (96 п. н.), используя P48/P53 праймеры. С базового хелпера $pVC-Am^R-Int_{\phi 16}$, используя праймеры P54/P55, был получен фрагмент (7159 п. н.) и лигирован с кинированным фрагментом $P_{gapA-xis-T_{nus}}$ с образованием промежуточной конструкции $pVC-Am^R-(Xis/Int)_{\phi 16}$. В полученной конструкции ген *aac(3)-VI* был заменен на ген устойчивости к канамицину с Tn903 транспозона. Для этого с праймеров P56/P57 и матрицы $pVC-Am^R-(Xis/Int)_{\phi 16}$ был амплифицирован фрагмент (7206 п. н.), рестрицирован по сайту *SmaI* и лигирован с кинированным фрагментом (1202 п. н.), содержащим ген устойчивости к Km под природным промотором. В свою очередь фрагмент протяженностью 1202 п. н. был получен, используя праймеры P58/P59 и pVK9 в качестве матрицы. В результате была получена хелперная плаزمида $pVC-Km^R-(Xis/Int)_{\phi 16}$, ориентация Km маркера была выбрана в соответствии с направлением исходного Am маркера.

Хелпер $pVC-Am^R-LacI-P_{trc-id2}-RecE^{564}T$ (9145 п. н.) (GenBank ANo OK651221) был собран из 4х фрагментов по методу Гибсона. Первый фрагмент (4195 п. н.) содержал ориджины репликации *E. coli* и *C. glutamicum* pMB1 и pBL1, соответственно, был наработан с праймеров P60/P61 и pVC7N плазмиды в качестве матрицы. Второй фрагмент (1549 п. н.), содержащий ген устойчивости к апрамицину *aac(3)-VI* под природным промотором и фаговый терминатор T_{674} , был получен из двух частей с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами P62/P65. Первая часть фрагмента (1299 п. н.), содержащая ген устойчивости к апрамицину была наработана с плазмиды pPK103, используя праймеры P62/P63, а вторая часть (298 п. н.), соответствующая T_{674} , была амплифицирована с хромосомы фага $\phi 674$ праймерами P64/P65. Третий фрагмент (1776 п. н.) содержал оперон, состоящий из укороченного гена *recE* (915 п. н.) и

полноразмерного *recT* Рас профага *E.coli*, был амплифицирован с хромосомы MG1655, используя праймеры P66/P67. Четвертый фрагмент (1705 п. н.) содержал промотор $P_{trc-id2}$ ($P_{trc}/O_{lac-id}-O_{lac}$) и дивергентно-транскрибируемый ген *lacI*, был получен с помощью ПЦР с праймеров P68/P69 и матрицы pVC-Am^R-LacI- $P_{trc-id2}$ -утр.

Для создания плазмиды pBS5T-ΔB (9350 п. н.) два фрагмента, наработанные с праймеров P70/P71 (944 п. н.) и P72/P73 (940 п. н.) с хромосомы *C. glutamicum* ATCC 13869, были объединены ПЦР с перекрывающимися праймерами P74/P75 с образованием фрагмента длиной 1706 п. н. Полученный фрагмент был кинирован и клонирован в *SmaI* сайт плазмиды pBS5T. Плазида с ориентацией вставки, направление которой подтверждалось с помощью праймеров P75/P76, была использована для конструирования делеции «функционального ядра» *attB*_{φ16}-сайта.

Плазида p06-Km^R- P_{dapA} -Cre (6111 п. н.) (GenBank ANo OK651224) была собрана из двух фрагментов по методу Гибсона. Первый фрагмент (5019 п. н.), содержащий *E. coli* репликон p15A, *cre* рекомбиназу фага P1 под контролем коринебактериального промотора P_{dapA} и укороченный (нестабильный) вариант репликона pCG1, был получен с помощью праймеров P77/P78 с матрицы p06- P_{dapA} -*cre* (MG014197). Второй фрагмент (1132 п. н.), содержащий ген устойчивости к канамицину транспозона Tn903 под природным промотором, был амплифицирован с производной от pVK9 плазмиды с помощью праймеров P79/P80.

4. Результаты и обсуждение

С момента своего открытия в 1957 году в качестве природного продуцента глутамата бактерия *C. glutamicum* считается многообещающей платформой для биопроизводства («Обзор литературы»), однако манипуляции с геномом *C. glutamicum* все еще несколько затруднены по сравнению с другими промышленно значимыми микроорганизмами, такими как *E. coli* и *S. cerevisiae*, для которых на сегодняшний день доступно большее количество инструментов и методов генной инженерии.

Для расширения группы молекулярно-генетических инструментов *C. glutamicum* в данной работе предложен метод, основанный на стратегии, именуемой Dual-In/Out, предназначенной для направленной интеграции рекомбинантных ДНК в геном бактерии. Метод также подразумевает возможность последующего объединения параллельно полученных инсерций для создания одного безмаркерного бесплазмидного рекомбинантного штамма.

Стратегия Dual-In/Out, первоначально разработанная в АО «АГРИ» для *E. coli*, зарекомендовала себя как удобный и эффективный инструмент для создания штаммов-продуцентов (Minaeva et al, 2008). Стратегия, созданная для *E. coli*, состоит из четырех последовательных этапов. На первом этапе осуществляется интеграция маркера, фланкированного *attL/R_{φ80}*-сайтами, при помощи Red-зависимой системы гомологичной рекомбинации бактериофага λ в несущественную точку хромосомы *E. coli* (первый «In» в названии стратегии). На втором этапе происходит Int/*Xis_{φ80}*-опосредованное вырезание маркера, основанное на сайт-специфической системе фага $\phi80$ (первый «Out»), приводящее к образованию искусственного *attB_{φ80}*-сайта. Далее предполагается Int/*φ80*-опосредованная интеграция целевой кассеты (второй - «In») в составе условно репликативной интегративной плазмиды, несущей *attP_{φ80}*-сайт. На заключительном этапе осуществляется λ -Int/*Xis*-опосредованное вырезание интегрированной векторной части (второй - «Out»).

Таким образом, стратегия объединяет в себе элементы двух различных сайт-специфических и одной гомологичной фаговых систем, а также

предполагает дальнейшее комбинирование мутаций посредством общей трансдукции. В связи с нефункциональностью вышеописанных элементов в *S. glutamicum* первостепенной задачей текущей работы являлся поиск новых либо адаптация уже известных фаговых систем для эффективной модификации генома *S. glutamicum* и разработки Dual-In/Out стратегии.

4.1. Бактериофаги

Бактериофаги представляют собой вирусы, заражающие бактериальные клетки. Многолетние всесторонние исследования бактериофагов привели к многим фундаментальным открытиям, таким как доказательство генетической роли ДНК, расшифровка генетического кода и открытие посреднической роли РНК, что в значительной мере способствовало развитию молекулярной биологии. Благодаря изучению взаимодействия бактерий и фагов появились одни из самых первых инструментов для манипуляции с геномом бактерий. Фаги и полученные на их основе генно-инженерные инструменты, такие как промоторы и терминаторы для экспрессионных векторов, упаковочные сигналы для космид и фазмид, сайт-специфические и гомологичные системы рекомбинации и т. д. оказали важнейшее влияние на развитие биотехнологии.

О существовании литических фагов и наличии лизогенных штаммов коринебактерий известно на протяжении многих лет, поскольку фаговая инфекция прерывает процесс ферментации и приводит к финансовым потерям. Тем не менее, на момент начала данной работы геномы только двух вирулентных коринефагов ВFK20 и P1201 были полностью сиквенированы и аннотированы (Bukovska et al, 2006; Chen et al, 2008). В литературе упоминается большое количество коринефагов, в том числе и умеренных, для которых были описаны спектр хозяев, морфология вириона и проведен рестрикционный анализ ДНК как, например, *beta c7* *S. diphtheriae* (Buck and Groman, 1981), ϕ GA1 из *Brevibacterium flavum* (Sonnen et al, 1990), а также ряд фагов ϕ 304L, ϕ 304S, ϕ 15, ϕ 16, индуцированных из различных лизогенных штаммов *S. glutamicum* (Moreau et al, 1995).

Интегративные функции фагов $\phi 304L$, $\phi 16$ и $\phi AAU2$ (Moreau et al, 1999a,b; Le Marrec et al, 1996) были изучены и описаны, в том числе были определены последовательности *attP* и *attB*-сайтов, идентифицированы гены интеграз и сконструированы соответствующие интегративные векторы.

Однако для создания инструментария на основе сайт-специфической системы рекомбинации в *S. glutamicum* была необходима функциональная пара интегразы и эксцизионазы. Между тем, среди фагов, чьи интегративные функции были охарактеризованы, не было представлено геномов для биоинформатического поиска эксцизионаз, а оба фага с полностью секвенированными геномами относились к вирулентным.

В связи с этим, в настоящем исследовании геном умеренного коринефага $\phi 16$ *S. glutamicum* ATCC 21792, любезно предоставленного доктором Траутветтер (Moreau et al, 1995), был полностью секвенирован и аннотирован.

4.1.1. Характеристика умеренного коринефага $\phi 16$

В текущей работе фаг $\phi 16$ был охарактеризован морфологически, а его геном впервые полностью секвенирован и аннотирован (GenBank:KY250482). Фаг $\phi 16$ был индуцирован из природного лизогена *S. glutamicum* ATCC 21792, размножен и очищен центрифугированием в градиенте CsCl как описано в «Материалах и методах». Исследование вириона $\phi 16$ с помощью просвечивающей электронной микроскопии подтвердило, что фаг принадлежит к семейству *Siphoviridae*, имеет гексагональной формы головку 73 нм в диаметре и несокращающийся хвостовой отросток толщиной 14 нм и длиной 336 нм (Рисунок 5), что полностью согласуется с ранее опубликованными данными (Moreau et al, 1995).

Геном бактериофага $\phi 16$ представлен одной двухцепочечной молекулой ДНК длиной 58200 п. н. с общим G+C составом 52,2%. Фаговый геном содержит 3'-выступающие одноцепочечные липкие концы 14 нуклеотидов длиной (3'-GGAAGGTGGAGGCT и CCTTCCACCTCCGA-3'). Используя биоинформатический анализ («Материалы и методы»), была идентифицирована

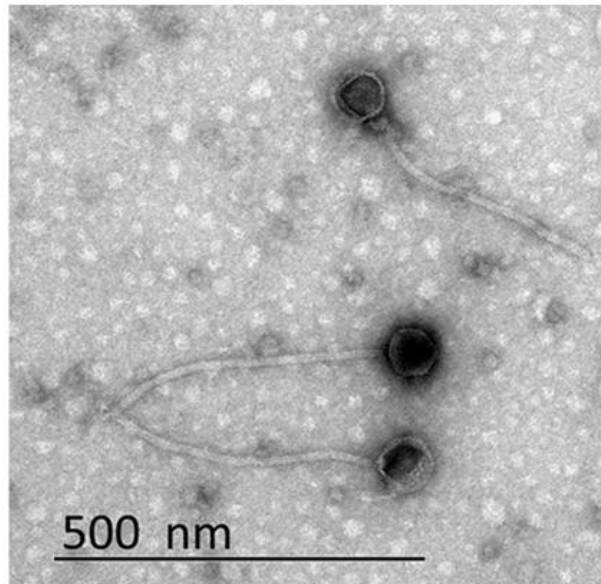


Рисунок 5 – Электронная микроскопия фага $\phi 16$. Масштабная линейка, 500 нм

101 предполагаемая ORF, покрывающая в общей сложности $\sim 92,4\%$ длины фагового генома (Рисунок 6). В соответствии с направлением транскрипции все ORF были разделены на две группы: ORF1 \rightarrow ORF24 и ORF37 \rightarrow ORF101 транскрибировались с одной цепи, тогда как ORF25 \leftarrow ORF36 с комплементарной цепи (Рисунок 6). Семь предполагаемых промоторов и восемь внутренних *Rho*-независимых терминаторов транскрипции были биоинформатически предсказаны в межгенном пространстве генома фага $\phi 16$ (Рисунок 6, «Материалы и методы»). В геноме фага были идентифицированы пять транспортных РНК: Lys (UUU), Arg (UCU), Asn (GUU), Tyr (GUA) и Trp (CCA) («Материалы и методы»). тРНК Lys находилась в области управления лизогенией, остальные четыре тРНК были локализованы в модуле репликации, рекомбинации и метаболизма.

Основываясь на гомологии с известными фаговыми белками, функциональных доменах и взаимном расположении, предполагаемые биологические функции были приписаны 27 продуктам предсказанных генов (gene products, gp(s)), для других 55 gp(s) была обнаружена гомология с гипотетическими белками, а 19 gp(s) не имели гомологов в базах данных. На основании проведенной аннотации геном фага $\phi 16$ был разделен на несколько функциональных модулей: упаковка ДНК, структурные компоненты головки и

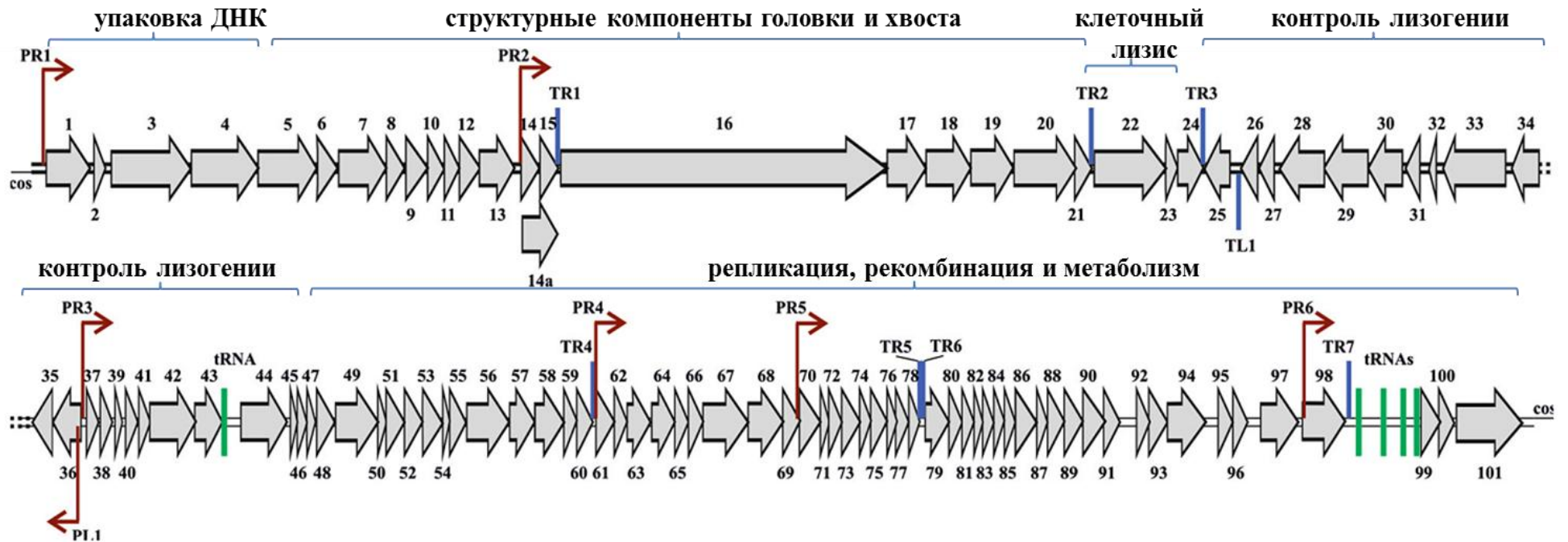


Рисунок 6 – Структурная организация генома фага $\phi 16$. ORF(s) пронумерованы последовательно слева направо и обозначены стрелками (или треугольниками), указывающие направление транскрипции. ORF(s), объединенные скобками, относятся к одному функциональному модулю. Положение и направление промоторов указаны тонкими стрелками; внутренние терминаторы и тРНК изображены синими и зелеными прямоугольниками, соответственно

хвоста, клеточный лизис, контроль лизогении, а также модуль репликации, рекомбинации и метаболизма (Рисунок 6). Модуль упаковки ДНК содержал малую и большую субъединицы терминазы (gp2 и gp3, соответственно), которая производит АТФ-зависимое разрезание исходной конкатемерной молекулы фаговой ДНК по *coc*-сайтам в процессе ее упаковки в головку фага, и порталный белок (gp4), формирующий отверстие, через которое фаговая ДНК упаковывается в капсид фага или выходит из него при инфицировании клетки-хозяина. Протеаза созревания головки (gp5), основные белки капсида и хвоста (gp7 и gp13), белок-рулетка (TMP, gp16), контролирующий длину фагового хвоста и белок хвостовой фибриллы (gp20), определяющий хозяйский спектр, были предсказаны в модуле структурных компонентов головки и хвоста (Brüssow and Desiere, 2001).

Между размером белка-рулетки и длиной хвостового отростка всегда существует определенная зависимость. В случае фага $\phi 16$ наблюдаемая корреляция между длиной хвоста ~ 336 нм и размером TMP (2151 ак. о.) выражается соотношением - 0,156 нм/ак. о., что свидетельствует о точности измерения размеров фаговой частицы и корректности аннотации.

Протеомный анализ структурных белков вириона $\phi 16$ был проведен для проверки правильности аннотации генома («Материалы и методы»). В результате были идентифицированы четыре основных белка, молекулярная масса трех из которых (~ 42 , ~ 33 , $\sim 17,5$ кДа) совпадала с литературными данными (Moreau et al, 1995). Также был обнаружен еще один ранее не описанный белок с экспериментальной молекулярной массой ~ 13 кДа. Белки мажорных полос были определены с помощью масс-спектрометрии как основные белки капсида и хвоста (gp7, gp13) и структурные белки с неизвестной функцией (gp6, gp12) (Рисунок 7). На основании аминокислотной последовательности идентифицированных белков были определены их расчетные молекулярные массы 35,5 кДа (gp7), 24,9 кДа (gp13) 13,4 кДа (gp6) и 14,9 кДа (gp12). Все обнаруженные фаговые белки мигрировали в геле с более низкой электрофоретической подвижностью, чем ожидалось (Рисунок 7). Как правило, этот эффект связан с сохранением некоторых вторичных структур,

аналогичные закономерности уже упоминались для других белков вириона фагов (Bukovska et al, 2006).

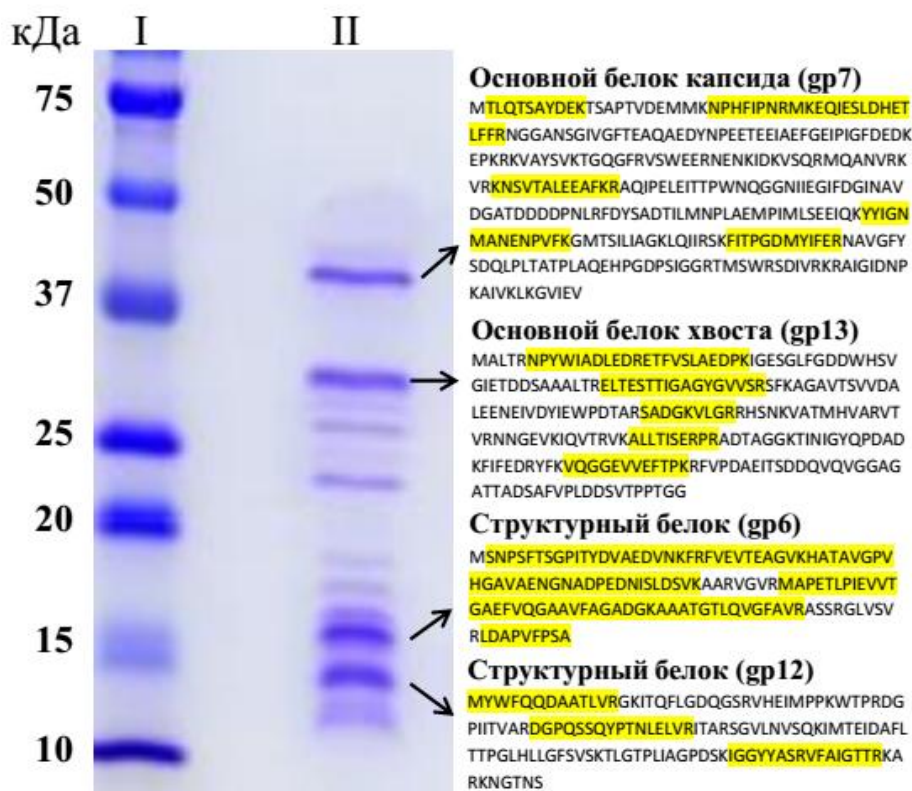


Рисунок 7 – Электрофорез структурных белков вириона $\phi 16$ в полиакриламидном геле. Результаты масс-спектрометрического анализа четырех основных белков вириона $\phi 16$. Последовательности пептидов, идентифицированные в ходе анализа, выделены цветом

Идентификация N-концевых пептидов для gp7, gp6 и gp12 подтвердила правило N-концевого процессинга *C. glutamicum*. Ранее упоминалось, что N-концевой процессинг белков *C. glutamicum* следует тем же правилам, что и для *E. coli* (Eggeling and Bott, 2005). Так метионаминопептидаза *E. coli* (MAP) удаляет N-концевой Met (положение P1 в номенклатуре Шехтера) в случае наличия в предпоследнем (P1') положении ак. о. с небольшой длиной боковой цепи (Ala, Cys, Gly, Pro, Ser, реже Thr или Val), но только при отсутствии Pro в позиции P2'. Действительно, согласно полученным данным, остаток Met был удален в gp6 и gp7, но присутствовал в gp12. Удаление Met в gp13 также ожидалось, однако исходный N-концевой отщепленный трипсином пептид не был детектирован в ходе анализа, вероятно, в связи с его небольшим размером.

В модуле клеточного лизиса были предсказаны два фермента: эндолизин (gp22), который разрушает пептидогликан клеточной стенки и холин (gp23), обеспечивающий проницаемость бактериальной мембраны.

Фаг $\phi 16$ как большинство умеренных бактериофагов способен лизогенизировать своего хозяина, используя при этом механизм сайт-специфической рекомбинации. Функциональность интегразы (соответствующей gp33, согласно нашей аннотации) была ранее экспериментально подтверждена, а последовательность *attP* и *attB* установлена (Moreau et al, 1999a). Однако в ходе аннотации в области лизогенного контроля была обнаружена вторая предполагаемая интеграза (gp28), что крайне не типично для строения фагового генома и вероятно является следствием горизонтального переноса генов.

Так как известно, что *attP*-сайт стандартно располагается в нижележащей области гена интегразы, в прилегающей к ORF28 области протяженностью 1 т. п. н. был произведен поиск последовательности функционального ядра (≈ 10 -20 п. н.), общей для обоих *attB* и *attP*-сайтов. Биоинформатический анализ не выявил даже какой-либо частичной гомологии последовательностей в секвенированных геномах штаммов *Corynebacterium* с нижележащей областью ORF28 фага $\phi 16$. Возможно, продукт гена 28 не функционален или используется фагом для интеграции в *attB*-сайт хозяина, чей геном не представлен в базе данных. Продукт гена 28 демонстрировал высокую степень гомологии (E-value $2,00E-104$, Identity 55%) с предполагаемой интегразой (WP_016457103.1) профага *C. pyruviciproducens* ATCC BAA-1742, в котором были выявлены также сразу две гипотетические интегразы. При этом профаг *C. pyruviciproducens* как и $\phi 16$ лизогенизировал штамм, используя вторую интегразу, которая не обладала значительной степенью гомологии с функциональной интегразой фага $\phi 16$ (gp33).

Вырезание профага осуществляется благодаря согласованной работе белков клетки-хозяина, фаговой интегразы и эксцизназы. Эксцизназы - это небольшие белки, длиной не превышающие 100 ак. о., члены семейства эксцизназ не проявляют высокой степени гомологии по отношению друг к другу, однако содержат НТН (helix-turn-helix) мотив, состоящий из двух α -

спиралей, соединенных короткой цепью аминокислот и отвечающий за способность взаимодействовать с ДНК (Landy, 2015).

На основании размера и расположения относительно гена интегразы в области лизогенного контроля gp47 была приписана функция эксцизионазы. Помимо прочего gp47 был гомологичен эксцизионазе профага *C. jeikeium* ATCC 43734 (E-value 1,00E-04, Identity 37%) и содержал НТН мотив.

В области лизогенного контроля фага $\phi 16$ были идентифицированы также гены, кодирующие транскрипционный регулятор (gp36) и SIE (superinfection exclusion) (gp34), предотвращающий повторное заражение тем же или близкородственным вирусом.

В модуле репликации, рекомбинации и метаболизма были выявлены гомологи белков с известной функцией: РагВ-подобной белок (gp42), участвующий в разделении ДНК в процессе репликации, ННН эндонуклеаза (gp52), регулятор транскрипции (gp56), белок, обладающий функцией связывания одноцепочечной ДНК (gp58), глутаредоксин (gp62). Помимо прочего, была предсказана эндодезоксирибонуклеаза RusA (gp63), разрешающая промежуточные «структуры Холлидея», образующиеся в процессе гомологичной рекомбинации и репарации ДНК, метилтрансфераза (gp64), модифицирующая фаговую ДНК, тем самым защищая ее от расщепления ДНКазы хозяина, белок, участвующий в разделении хромосом (gp68), олигорибонуклеаза (gp94) и АТФаза (gp101).

Проведенный биоинформатический анализ выявил значительную степень гомологии нуклеотидной последовательности генома $\phi 16$ либо его отдельных модулей с неохарактеризованными профагами различных штаммов коринебактерий, геномы которых представлены в базах данных как часть хромосомы хозяина (Рисунок 8). На протяжении всего генома фага $\phi 16$ наблюдалось значительное сходство с нуклеотидной последовательностью профага *Brevibacterium flavum* ATCC 15168, который был идентичен профагу *C. glutamicum* ATCC 14067. В области структурных генов хвоста $\phi 16$ была обнаружена гомология с профагом *C. ulcerans* BR-AD22. Часть генов лизогенного контроля $\phi 16$ была высокогомологична профагу *C. falsenii* DSM

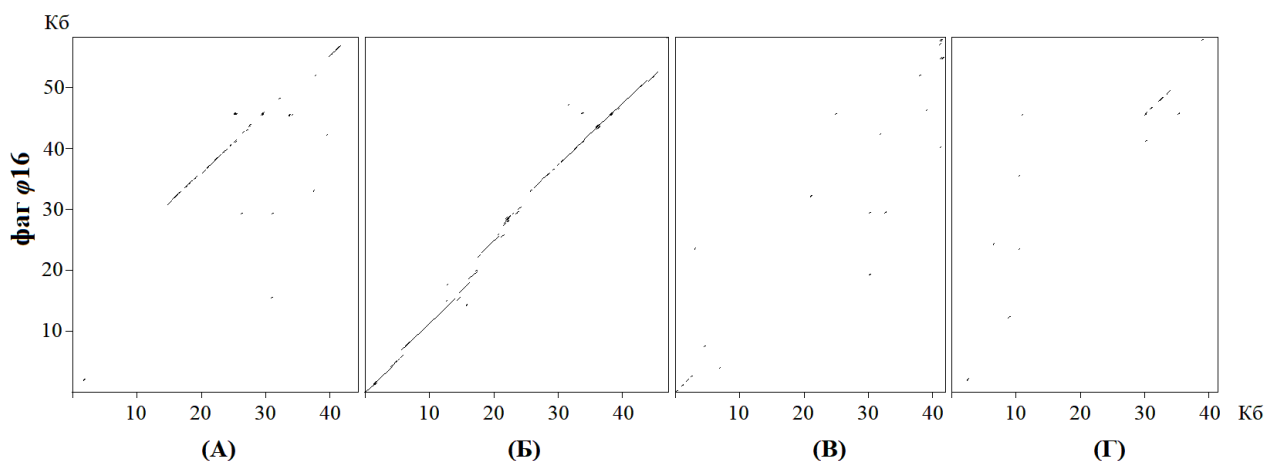


Рисунок – 8. Гомология нуклеотидной последовательности $\phi 16$ с геномами профагов. Гомология генома фага $\phi 16$ с неохарактеризованными профагами различных штаммов коринебактерий: *C. pyruviciproducens* ATCC BAA-1742 (А); *Brevibacterium flavum* ATCC 15168 (EMBL Acc CP011309.1)/ *C. glutamicum* ATCC 14067 (EMBL Acc AGQ00000000) (Б); *C. falsenii* DSM 44353 BL8171 (EMBL Acc CP007156.1) (С); *C. ulcerans* BR-AD22 (EMBL Acc CP002791.1) (Д)

44353 BL8171. Эта область включала гены интегразы (ORF33), эксцизионазы (ORF47), ORF30 и ORF35, кодирующие белки с неизвестной функцией. За пределами данного модуля не было выявлено никакого сходства, что согласовывалось с модульной теорией эволюции фага, которая предполагает, что модули, состоящие из генов или группы генов, могут обмениваться посредством негомологичной рекомбинации в случайных местах. Таким образом, только нелетальные рекомбинанты смогут сохраняться в последующих поколениях, и, возможно, обеспечивать фагу новые или улучшенные свойства (Hendrix, 2003). Другая часть генов лизогенного контроля, кодирующие «нефункциональную» интегразу (ORF28), белок с неизвестной функцией (ORF29), SIE (ORF34) и транскрипционный регулятор (ORF36) имела гомологию с профагом из *C. pyruviciproducens* ATCC BAA-1742. Сходство генов модуля репликации и рекомбинации ДНК $\phi 16$ наблюдалось только с профагом из *B. flavum* ATCC 15168. Ни белковой, ни нуклеотидной гомологии между фагами $\phi 16$ и ВФК20 или Р1201 не наблюдалось. Поскольку геном $\phi 16$ также не присутствовал ни в одной бактериальной хромосоме в базе данных, последовательность полного генома фага $\phi 16$ была впервые депонирована в GenBank (KY250482).

4.1.2. Характеристика двух новых фагов $\phi 673$ и $\phi 674$ размножающихся на *S. glutamicum* ATCC 13032

В поисках дополнительных генетических элементов в данной работе геномы двух новых фагов $\phi 673$ и $\phi 674$ *S. glutamicum* ATCC 13032, полученных из ВКПМ коллекции, были полностью секвенированы и аннотированы. Электронная микроскопия показала, что согласно строению вирионов оба фага принадлежат к семейству *Siphoviridae* и имеют многогранную головку шириной 50 нм и несократимый хвостовой отросток длиной 250 нм и диаметром 11 нм (Рисунок 9).

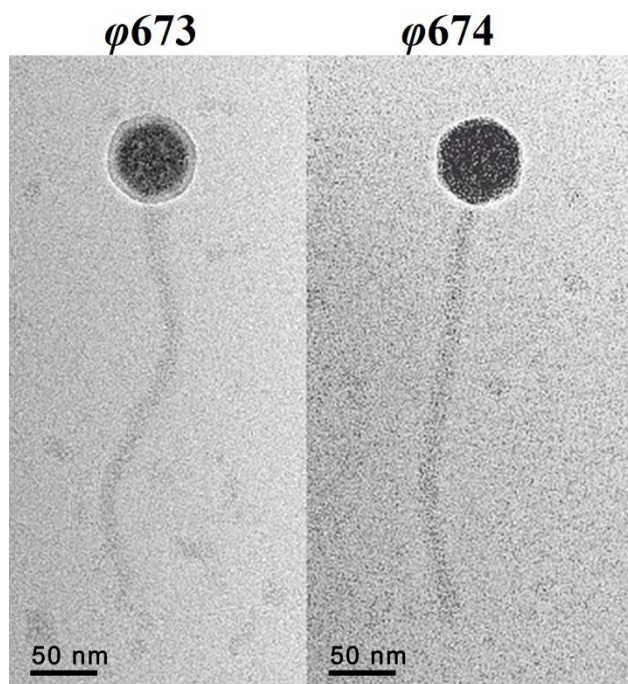


Рисунок 9 – Электронная микрофотография фагов $\phi 673$ и $\phi 674$. Бар, 50 нм

Геномы $\phi 673$ и $\phi 674$ состоят из линейных двухцепочечных молекул ДНК длиной 44530 п. н. (G + C = 51,1%) и 43193 п. н. (G + C = 50,7%), соответственно, и имеют одинаковые 3'-выступающие липкие концы длиной 13 нуклеотидов (AGAAGGGGGCGGA-3'). На основе биоинформатического анализа было идентифицировано 56 и 54 ORFs, покрывающие ~ 97% и 96% всей длины генома фагов $\phi 673$ и $\phi 674$, соответственно (Рисунок 10). Для 20 gp(s) каждого фага была предсказана биологическая функция, другие 17 и 16 gp(s) фагов $\phi 673$ и $\phi 674$, соответственно, проявляли гомологию с гипотетическими белками, тогда как оставшиеся 19 и 18 gp(s) не имели

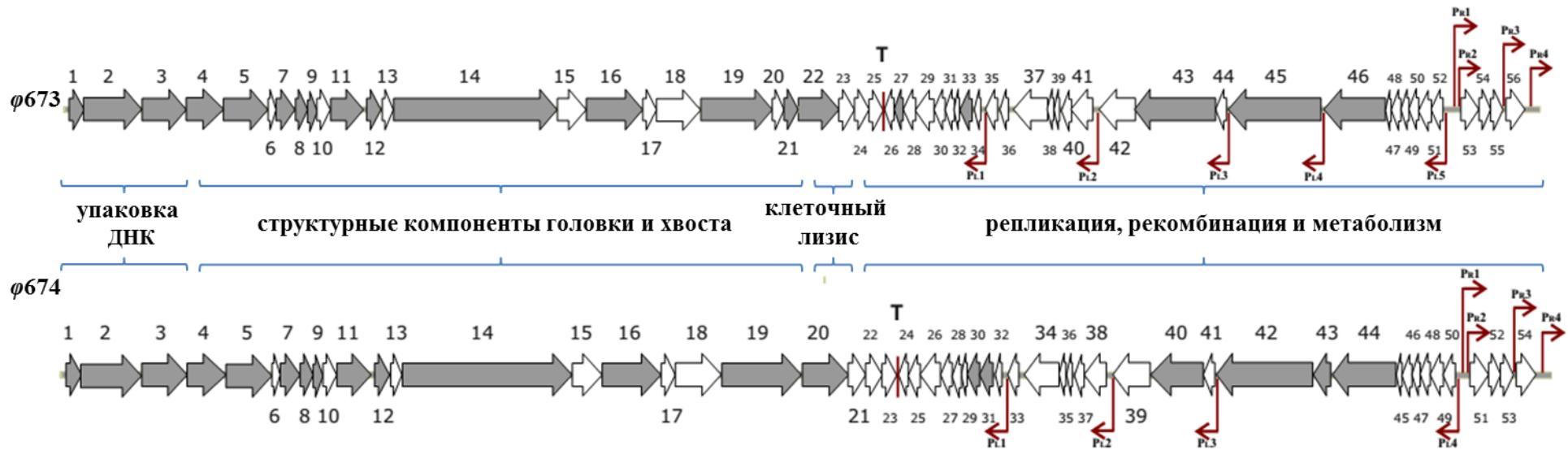


Рисунок 10 – Геномная организация фагов $\phi 673$ (А) и $\phi 674$ (Б). ORF пронумерованы последовательно слева направо и указаны стрелками в направлении транскрипции. ORF, кодирующие белки, которым назначены известные биологические функции, изображены темными стрелками, а те, которые не имеют известной функции, - светлыми. Открытые рамки считывания, соединенные скобками, обозначают предполагаемые функциональные модули в фаговых геномах. Положения и направления промоторов указаны тонкими красными стрелками, а внутренние терминаторы обозначены изображены красными прямоугольниками

гомологов в базах данных. Ни в одном из фаговых геномов не было идентифицировано генов тРНК. Девять и восемь предполагаемых промоторов были предсказаны в геномах $\phi 673$ и $\phi 674$, соответственно. Один идентичный двунаправленный, *Rho*-независимый терминатор транскрипции был идентифицирован в каждом фаговом геноме.

Основываясь на гомологии с известными фаговыми белками, наличии функциональных 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 (Рисунок 10).

Модуль упаковки ДНК включал малую ($gr_{\phi 673}1$ и $gr_{\phi 674}1$) и большую ($gr_{\phi 673}2$ и $gr_{\phi 674}2$) субъединицы терминазы и портальный белок ($gr_{\phi 673}3$ и $gr_{\phi 674}3$). Протеаза созревания головки ($gr_{\phi 673}4$ и $gr_{\phi 674}4$), основные белки капсида и хвоста ($gr_{\phi 673}5$, $gr_{\phi 674}5$ и $gr_{\phi 673}11$, $gr_{\phi 674}11$), белки, соединяющие головку и хвост ($gr_{\phi 673}7$, 8, 9 и $gr_{\phi 674}7$, 8, 9), шаперон сборки хвоста ($gr_{\phi 673}12$ и $gr_{\phi 674}12$), белок-рулетка ($gr_{\phi 673}14$ и $gr_{\phi 674}14$), белок хвоста ($gr_{\phi 673}16$ и $gr_{\phi 674}16$) и белок хвостовой фибриллы ($gr_{\phi 673}19$, 21 и $gr_{\phi 674}19$) были предсказаны в структурных компонентах головки и хвоста.

Для обоих фагов наблюдалась хорошая корреляция между наблюдаемой длиной хвоста (~ 250 нм) и размером ТМР (1577 ак.о. для $\phi 673$ и 1572 ак.о. для $\phi 674$), выраженная соотношением 0,159 нм/ак. о., что подтверждает точность измерения размеров фаговой частицы.

Два основных структурных белка каждого вириона, такие как основной белок капсида ($gr_{\phi 673}5$ и $gr_{\phi 674}5$) и основной белок хвоста ($gr_{\phi 673}11$ и $gr_{\phi 674}11$), были обнаружены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и идентифицированы посредством масс-спектрометрического метода анализа (Рисунок 11). Более того, удаление N-концевого остатка Met в пептидах $gr_{\phi 673}11$ и $gr_{\phi 674}11$, расщепленных трипсином, подтвердило правило N-концевого процессинга (Eggeling and Bott, 2005).

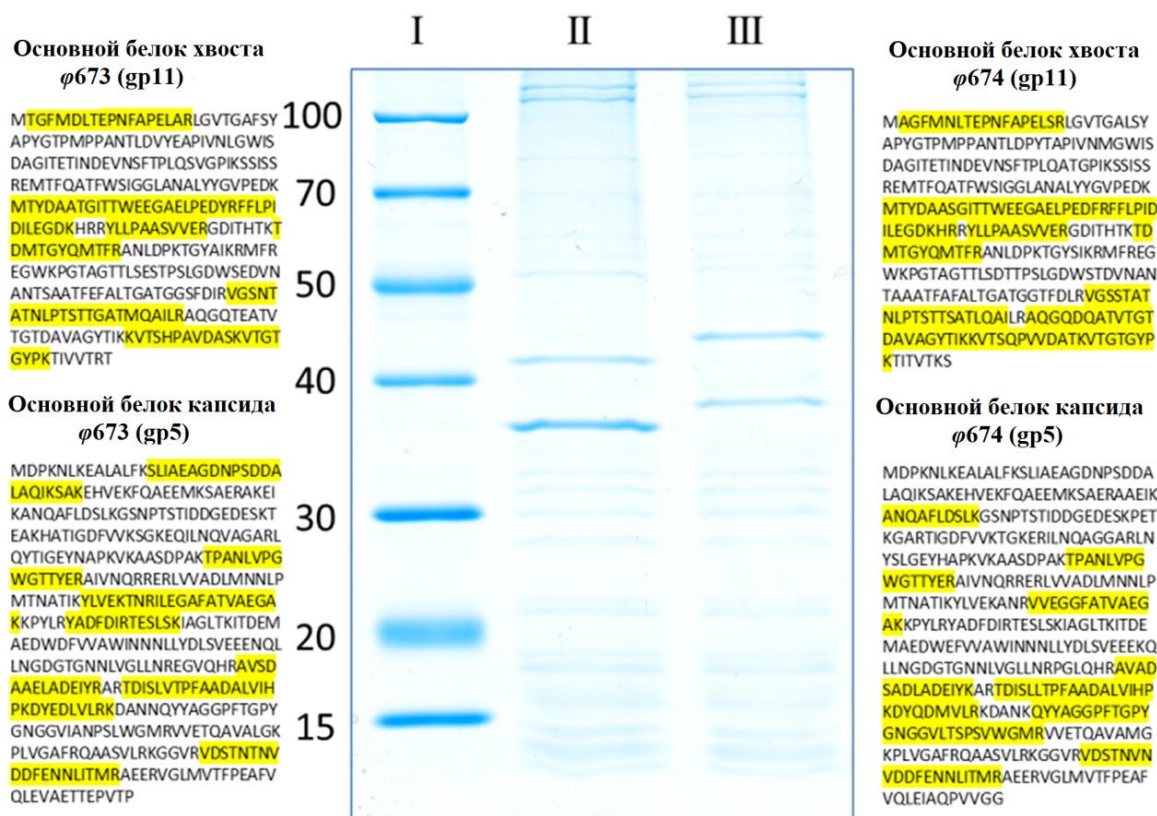


Рисунок 11 – Электрофорез в полиакриламидном геле структурных белков $\phi 673$ и $\phi 674$. Маркеры молекулярной массы (дорожка I). Белковый профиль $\phi 673$ (дорожка II), $\phi 674$ (дорожка III). Масс-спектрометрический анализ двух основных белков фагов $\phi 673$ и $\phi 674$ и их аминокислотные последовательности. Последовательности пептидов, идентифицированных в ходе анализа, выделены цветом

В модуле лизиса хозяина был предсказан лизоцимоподобный белок ($gp_{\phi 673}22$ и $gp_{\phi 674}20$). Модуль репликации, рекомбинации и метаболизма содержал гомологи белков с установленной биологической функцией, включая хеликазу ($gp_{\phi 673}43$ и $gp_{\phi 674}40$), белок репликации ДНК RepA праймазу/хеликазу ($gp_{\phi 673}45$ и $gp_{\phi 674}42$), ДНК-полимеразу I ($gp_{\phi 673}46$ и $gp_{\phi 674}44$) и эндонуклеазу HNH ($gp_{\phi 673}33$ и $gp_{\phi 674}30, 31, 43$). В геноме фага $\phi 673$ был идентифицирован один регулятор транскрипции, $gp27$. Интересно, что в хеликазе, кодируемой ORF43 фага $\phi 673$, был идентифицирован интеин в отличие от хеликазы ORF40 фага $\phi 674$. Ранее сообщалось, что коринебактериальный фаг P1201 также содержал интеин (Chen et al, 2008).

Значительное сходство по всему геному наблюдалось между двумя секвенированными и аннотированными литическими коринефагами, $\phi 673$ и

φ674, которые демонстрировали 85,2% идентичности. Биоинформатический поиск показал, что геномы обоих фагов демонстрировали высокий уровень гомологии (55% идентичности) с геномом коринефага ВFK20 (Bukovska et al, 2006).

Помимо штамма-хозяина *C. glutamicum* ATCC 13032, оба фага φ673 и φ674 инфицировали MB001. Другой протестированный штамм дикого типа *C. glutamicum* ATCC 13869 не заразился ни одним из двух фагов.

Последовательности полных геномов фагов φ673 и φ674 были впервые депонированы в GenBank MG324353 и MG324354, соответственно.

Таким образом, в данной работе два вирулентных фага φ673, φ674 *C. glutamicum* ATCC 13032 и умеренный бактериофаг φ16 *C. glutamicum* ATCC 21792 были охарактеризованы морфологически, а их геномы впервые полностью секвенированы и частично аннотированы. Помимо биоинформатически идентифицированного гена предполагаемой эксцизназы (*gp_{φ16}47*), необходимого для создания генно-инженерного инструментария, описанные фаги являются ценным источником регуляторных элементов, таких как промоторы и терминаторы, экспериментальным подтверждением которых в АО «АГРИ» занималась группа доктора Йомантаса. Также представленные данные о трех охарактеризованных в работе фагах могут внести свой вклад в расширение знаний об эволюции и видовом разнообразии коринефагов и быть полезными для создания устойчивых к фагам штаммов.

4.2. Разработка метода прецизионной интеграции генетического материала на основе Dual-In/Out стратегии для конструирования рекомбинантного штамма *C. glutamicum*

Поскольку недостающий генетический элемент, а именно, ген эксцизназы фага φ16 был биоинформатически идентифицирован в результате проведенного исследования коринефагов, предлагаемая нами для *C. 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 Rac профага *E. coli* и двух сайт-специфических системах: коринефага $\phi 16$ и Cre/loxP фага P1 *E. coli*.

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

Для конструирования промышленных штаммов-продуцентов предпочтительно применять методы редактирования генома, основанные на использовании природных генетических элементов данного микроорганизма либо близкородственного ему. Таким образом, инструмент для модификации генома *C. glutamicum* может быть создан на основе ранее идентифицированных элементов сайт-специфической системы рекомбинации коринефага $\phi 16$, используя подход «self-cloning». Функциональность фаговой интегразы $\phi 16$ (gp33, согласно нашей аннотации) и $\text{attP}_{\phi 16}$ -сайта была ранее продемонстрирована посредством интеграции нереплицирующейся в коринебактериях плазмиды p16130 в природный $\text{attB}_{\phi 16}$ -сайт хромосомы *C. glutamicum* ATCC 21792c (Moreau et al. 1999a).

Аналогичная самоинтегрирующаяся плазида pSTV-Cm^R-(Int- attP) $_{\phi 16}$ была сконструирована для тестирования способности $\phi 16$ -int (gp33) осуществлять интеграцию в природный $\text{attB}_{\phi 16}$ -сайт промышленно значимого штамма *C. glutamicum* ATCC 13869. Плазида pSTV-Cm^R-(Int- attP) $_{\phi 16}$ содержала фрагмент фаговой ДНК размером 1,7 т. п. н. (27583-29279 п. н., KY250482), включающий ген интегразы $\phi 16$ под природным промотором и $\text{attP}_{\phi 16}$ -сайт, расположенный вблизи стоп-кодона интегразы. Плазида была сконструирована на базе репликона *E. coli* p15A для наработки в промежуточном хозяине, содержала сайт множественного клонирования (MCS), окруженный терминаторами T_{L3}, T₆₇₄ и ген устойчивости к хлорамфениколу под контролем сильного фагового промотора P_{GAI} (Pátek et al. 1996) для обеспечения достаточного уровня экспрессии в одной копии на хромосоме *C. glutamicum* («Материалы и методы»). Для осуществления интеграции в природный $\text{attB}_{\phi 16}$ -сайт полученную плазмиду вводили в *C. glutamicum* ATCC 13869 методом электротрансформации («Материалы и методы»). Эффективность интеграции *in*

cis в природный $attB_{\phi 16}$ -сайт составляла $2,9 \times 10^4$ трансформантов на мкг плазмидной ДНК. Схематичное изображение сайт-специфической интеграции *in cis* представлено на Рисунке 12.

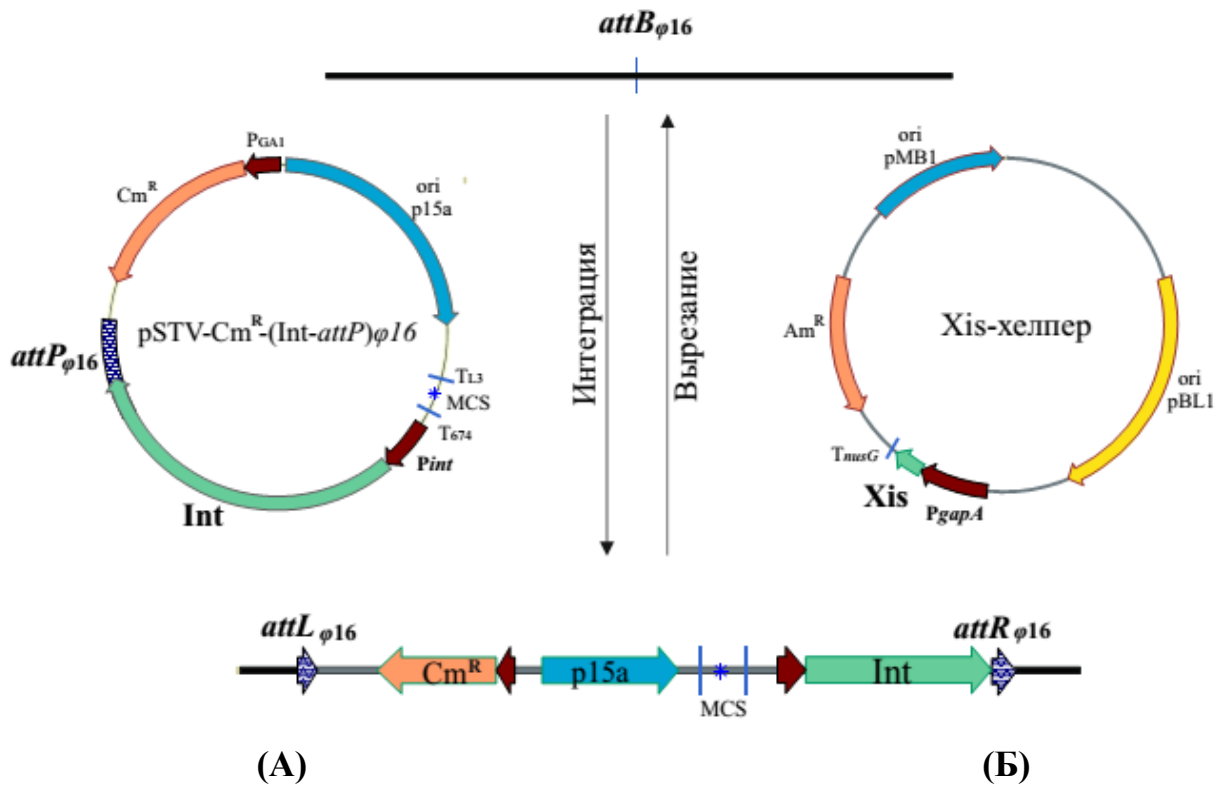


Рисунок 12 – Схематичное изображение $\phi 16$ -опосредованной сайт-специфической интеграции «*in cis*» и $\phi 16$ -зависимой эксцизии. Сайт-специфическая интеграция *in cis* в природный $attB_{\phi 16}$ -сайт на хромосоме *S. glutamicum* самоинтегративной нереплицирующейся в коринебактериях плазмиды $pSTV-Cm^R-(Int-attP)_{\phi 16}$, экспрессирующей ген интегразы $\phi 16$ и несущей фаговый $attP_{\phi 16}$ (А). Сайт-специфическое вырезание $pSTV-Cm^R-(Int-attP)_{\phi 16}$ из природного $attB$ -сайта на хромосоме *S. glutamicum* с помощью Xis-хелпера ($pVC-Am^R-Xis_{\phi 16}$), экспрессирующего ген эксцизионазы $\phi 16$ (Б)

Для проверки функциональности предсказанной эксцизионазы была сконструирована плазмида $pVC-Am^R-Xis_{\phi 16}$ (Xis-хелпер) (Рисунке 12). Xis-хелпер был сконструирован на базе *E. coli* – *S. glutamicum* шаттл-вектора $pVC7N$ (Hashiro et al, 2019), содержал ген предполагаемой эксцизионазы фага $\phi 16$ (ORF47) под контролем P_{dapA} промотора, а также ген устойчивости к апрамицину в качестве селективного маркера («Материалы и методы»). Xis-хелпер был введен в штамм с интегрированной в природный $attB_{\phi 16}$ -сайт плазмидой $pSTV-Cm^R-(Int-attP)_{\phi 16}$. Эффективность сайт-специфического

вырезания интегрированной плазмиды из природного $attB_{\phi 16}$ -сайта составляла более 95% (95 Cm^S из 100 протестированных клонов), что однозначно подтверждало правильность аннотации фаговой эксцизионазы (gp47).

С целью создания генно-инженерного инструментария на основе элементов сайт-специфической системы фага $\phi 16$ для интеграции *in trans* были сконструированы две дополнительные плазмиды: интегративная плазмида и хелпер для интеграции. Интегративная плазмида, названная pCRIM- Cm^R - $attP_{\phi 16}$ (Рисунок 13), была получена на основе pSTV- Cm^R -(Int- $attP$) $_{\phi 16}$ и в отличие от исходной плазмиды содержала только последовательность $attP_{\phi 16}$ (27583-27997, KY250482), а ген интегразы с промоторной областью был делегирован.

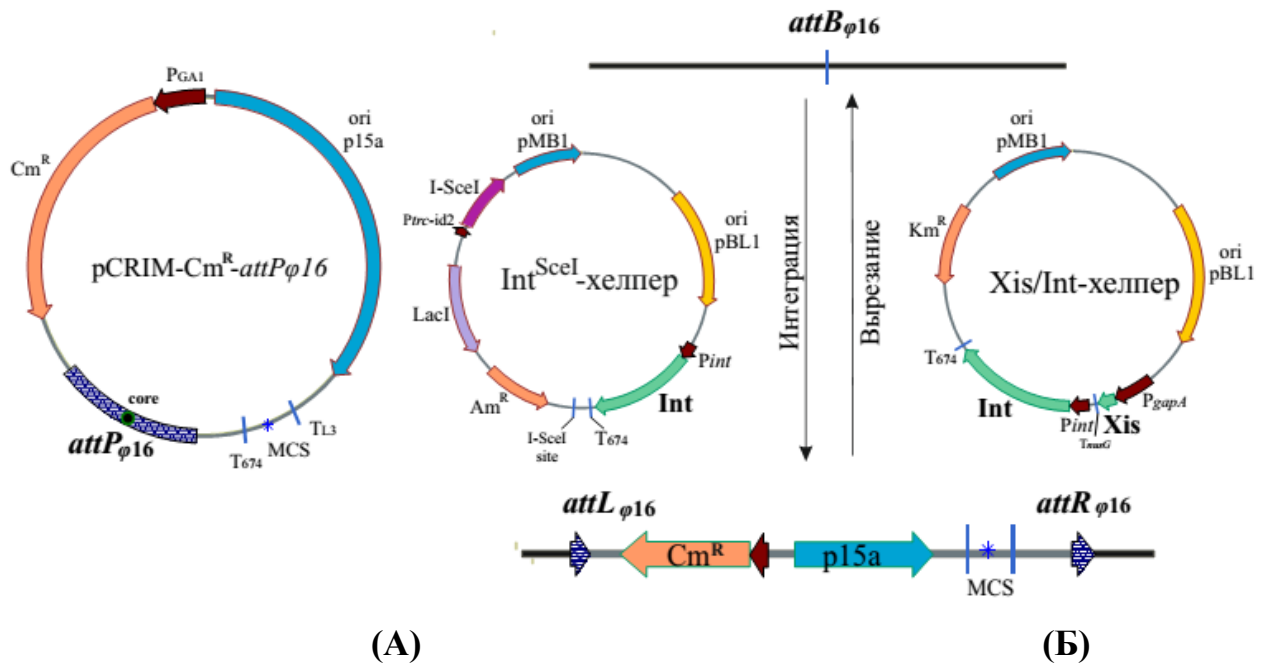


Рисунок 13 – Схематическое изображение генно-инженерного инструментария, разработанного на основе элементов сайт-специфической системы рекомбинации фага $\phi 16$. Интеграция *in trans* нерепликативной в *S. glutamicum* плазмиды pCRIM- Cm^R - $attP_{\phi 16}$ в природный $attB_{\phi 16}$ -сайт на хромосоме *S. glutamicum* с помощью Int^{SceI}-хелпера (А). Вырезание pSTV- Cm^R - $attP_{\phi 16}$ из природного $attB_{\phi 16}$ -сайта на хромосоме *S. glutamicum* с образованием нативного $attB_{\phi 16}$ -сайта, осуществляемое Xis/Int-хелпером (Б)

Для интеграции плазмиды pCRIM- Cm^R - $attP_{\phi 16}$ в $attB_{\phi 16}$ -сайт на хромосоме *S. glutamicum* ATCC 13869 была сконструирована плазмида-помощник pVC-Am^R-Int $_{\phi 16}$ (Int-хелпер) на основе вышеупомянутого шаттл-вектора pVC7N. Int-хелпер содержал ген интегразы фага $\phi 16$ (ORF33) под контролем природного

промотора (29085-29279, KY250482), а также ген устойчивости к апрамицину в качестве селективного маркера («Материалы и методы»).

Для облегчения процедуры излечения штаммов от вспомогательной плазмиды в рамках стратегии Dual-In/Out в состав Int-хелпера был введен 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 _{ϕ 16}-SceI (Int^{SceI}-хелпер, ОК651222), способная к IPTG-индуцибельному самоэлиминированию (Рисунок 13, «Материалы и методы»).

Для тестирования функциональности сконструированных элементов в *S. glutamicum* ATCC 13869 был введен Int^{SceI}-хелпер. Далее штамм, содержащий хелпер, был электропорирован интегративной плазмидой pCRIM-Cm^R-attP _{ϕ 16}, в результате чего был получен штамм **13869B::L-pCRIM-Cm-R** (Таблица 1). Эффективность интеграции *in trans* в природный attB _{ϕ 16} составила $2,8 \times 10^4$ трансформантов на мкг плазмидной ДНК и незначительно отличалась от эффективности интеграции *in cis*.

Для сайт-специфического вырезания pCRIM-Cm^R-attP _{ϕ 16}, интегрированной в природный attB _{ϕ 16} сайт, была сконструирована дополнительная хелперная плаزمида. Эта плаزمида pVC-Km^R-(Xis/Int) _{ϕ 16} (Xis/Int-хелпер, ОК651223), также как и Xis-хелпер была создана на основе вектора pVC7N. Помимо гена интегразы ϕ 16 (ORF33) под контролем природного промотора, Xis/Int-хелпер содержал конститутивно экспрессирующийся с коринебактериального промотора P_{gapA} ген эксцизионазы фага ϕ 16 (ORF47), плазмида также несла ген устойчивости к канамицину для прямого отбора (Рисунок 13, «Материалы и методы»). Для проверки функциональности attL/R _{ϕ 16} рекомбинантных сайтов и сконструированного хелпера Xis/Int-хелпер был введен в ранее полученный штамм **13869B::L-pCRIM-Cm-R**. Эффективность сайт-специфического вырезания интегративной плазмиды из природного attB _{ϕ 16} сайта 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 $\phi 16$ для интеграции целевых генов в хромосому, состоящий из одной интегративной и двух хелперных плазмид (Рисунок 13).

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

В целях дальнейшего применения $pCRIM-Cm^R-attP_{\phi 16}$ 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 плаزمида $pCRIM-Cm^R-lox-attP_{\phi 16}$ (Рисунок 14(A)) была интегрирована в природный $attB_{\phi 16}$ с помощью Int^{SceI} -хелпера. Cre-опосредованное вырезание предполагалось осуществлять с помощью вспомогательной плазмиды $p06-Km^R-P_{dapA}$ -Cre, представленной на Рисунке 14(Б) (Cre-хелпер, ОК651224).

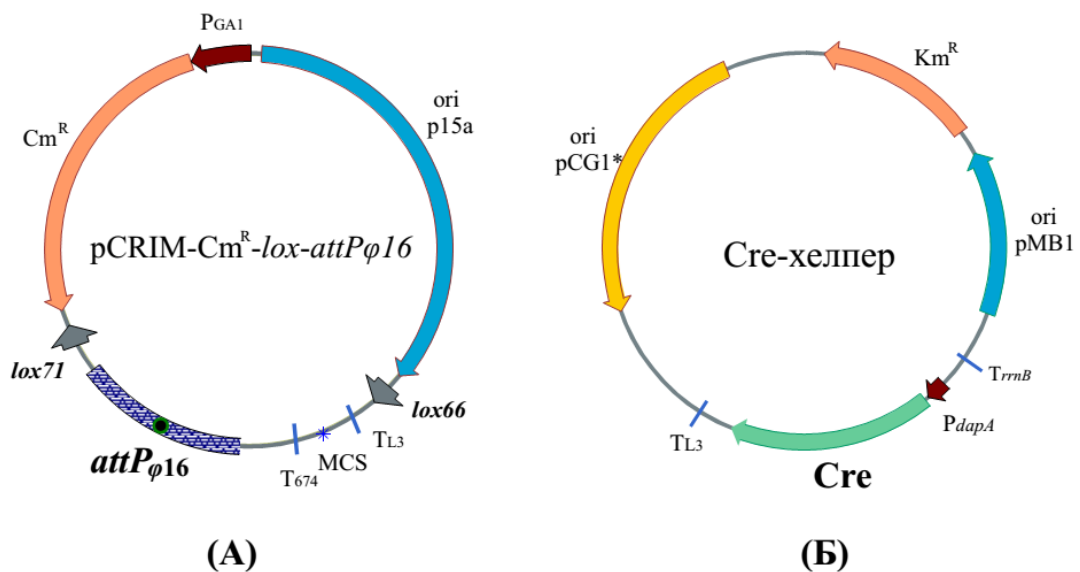


Рисунок 14 – Схемы плазмид $pCRIM-Cm^R-lox-attP_{\phi 16}$ (А) и Cre-хелпера (Б)

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*, содержала $p15A$ репликон *E.coli*, а также 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 рекомбинантными сайтами *lox66/71*, составляла более 97% (97 См^S из 100 протестированных клонов). В результате были сконструированы элементы на основе сайт-специфической системы фага P1 (Рисунок 14).

4.2.3. Конструирование элементов RecET-зависимой системы гомологичной рекомбинации для создания искусственных *attB*_{φ16}-сайтов в *C. glutamicum*

В предлагаемой нами стратегии интеграцию маркированного предшественника *attB*_{φ16} 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, содержащим гомологичные плечи с оптимальной длиной (примерно 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 представленных 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 RecE⁵⁶⁴ был впервые использован для осуществления рекомбинации в *C. glutamicum*. RecE⁵⁶⁴, являясь наиболее «длинным» из описанных ранее укороченных производных RecE (например, RecE⁵⁸⁸, RecE⁵⁹⁵, RecE⁶⁰², RecE⁶⁰⁶ (Zhang et al, 1998; Muyrers et al, 2000b; Fu et al, 2012)), сохраняет свою *exoVIII* нуклеазную активность, связанную с экзонуклеазным доменом, охватывающим последние 260 аминокислот на С-конце RecE (Chu et al, 1989; Zhang et al, 2009). Решение использовать самый «длинный» укороченный вариант RecE было основано на стремлении устранить часть гетерологичного гена с неоптимальной для *Corynebacteria* (по данным инструмента %MinMax (Rodriguez et al, 2018)) трансляцией в области 367-433 ак. о., при этом надеясь на сохранение специфической рекомбинирующей активности, характерной для полноразмерного RecE (Fu et al, 2012).

Таким образом, была сконструирована вспомогательная плаزمида pVC-Am^R-LacI-P_{trc-id2}-RecE⁵⁶⁴T, представленная на Рисунке 15(A) (RecET-хелпер,

OK651221). 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 кодону Met только 564–866 ак. о. полноразмерного белка (Zhang et al, 2009), а также полноразмерный RecT Рас профага *E. coli*. Экспрессия обоих генов, стоящих в опероне, находилась под контролем IPTG-индуцируемого $P_{trc-id2}$ промотора (Скороходова и др, 2006) строго регулируемого LacI («Материалы и методы»).

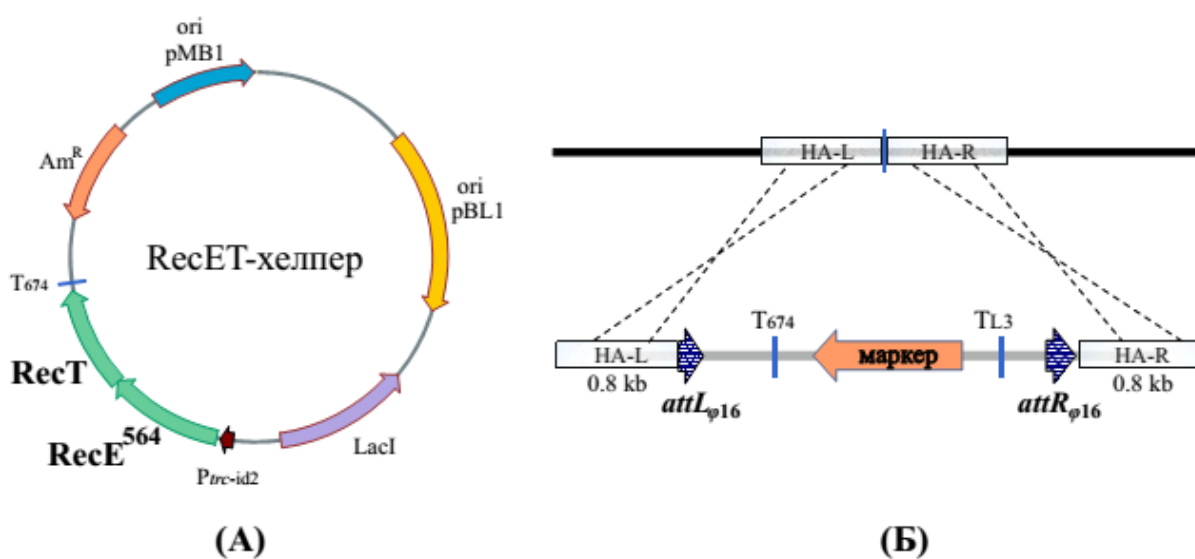


Рисунок 15 – Схематическое изображение RecET-хелпера (А) и линейного фрагмента для создания искусственного $attB_{\phi16}$ -сайта (Б)

Функциональность полученного RecET-хелпера была продемонстрирована на примере интеграции линейных фрагментов, сконструированных для создания искусственных $attB_{\phi16}$ -сайтов в выбранных участках хромосомы. Линейный фрагмент содержал маркер устойчивости к антибиотику, окруженный терминаторами T_{L3} и T₆₇₄. Маркер, в свою очередь, был фланкирован $attL/R_{\phi16}$ рекомбинантными сайтами для последующего вырезания и окружен плечами гомологии длиной 0,8 т. п. н. (Рисунок 15(Б)).

В качестве матрицы для амплификации центральной части линейного фрагмента была использована одна из двух специально сконструированных плазмид pUCIDT-Ap^R-L-Cm^R-R / pUCIDT-Ap^R-L-Sm^R-R (Рисунок 16), не способных реплицироваться в *S. glutamicum* (OK651225, OK651226). Для

сборки линейного фрагмента, центральная часть, содержащая маркер, была объединена с плечами гомологии с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами («Материалы и методы», Таблица 2).

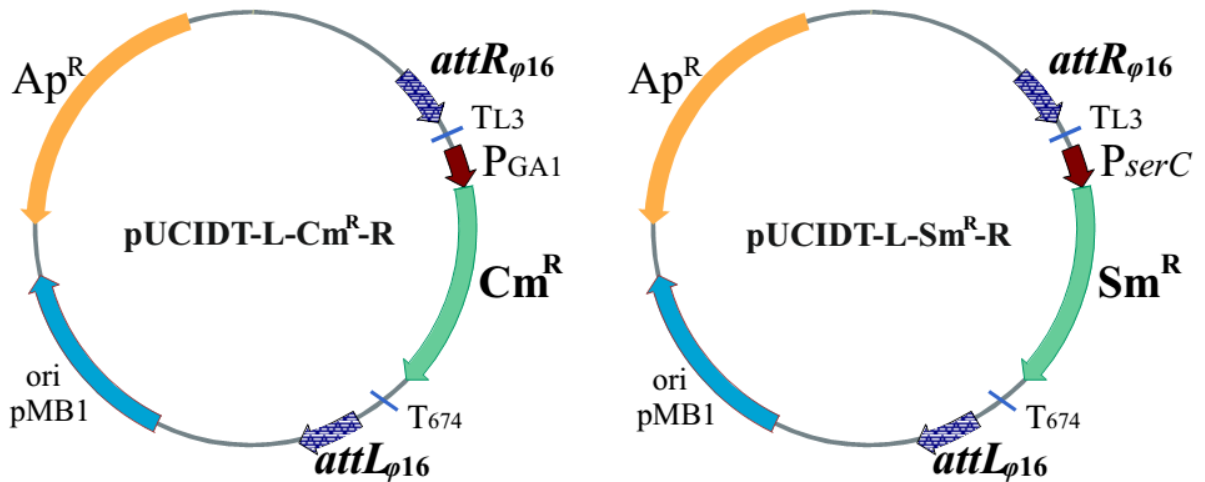


Рисунок 16 – Схема плазмид pUCIDT-Ap^R-L-Cm^R-R / pUCIDT-Ap^R-L-Sm^R-R

В результате были получены три линейных фрагмента, условно обозначенные как **ds#542Sm**, **ds#1741Sm** и **ds#1865Sm** (double-stranded DNA fragment), нацеленные на разные участки хромосомы, интеграция в которые не приводила к гибели клетки. В название 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. 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 штамм *C. glutamicum* 13869, несущий ResET-хелпер, был электропорирован линейными фрагментами в соответствии с протоколом («Материалы и методы»), в результате чего были получены три независимых маркированных штамма (**13869#542::Sm**, **13869#1741::Sm** и **13869#1865::Sm**), содержащие вырезаемый маркер в различных точках хромосомы (Таблица 1). В проведенных нами экспериментах тестируемый ResET-хелпер успешно осуществлял рекомбинацию между линейными фрагментами и кольцевой хромосомой *C. glutamicum* с частотой $\approx 6,8 \times 10^{-6}$ (\approx

750 клонов / 2 мкгДНК / $1,1 \times 10^8$ клеток, выживших после электропорации). Результаты настоящего исследования однозначно подтверждают возможность использования укороченного RecE^{564} совместно с RecT в *C. glutamicum* для осуществления гомологичной рекомбинации, как минимум, между линейным фрагментом (с длиной гомологичных плечей 800 п. н.) и кольцевой бактериальной хромосомой.

4.2.4. Конструирование искусственных $\text{attB}_{\phi 16}$ -сайтов и проверка их функциональности

Для создания искусственных $\text{attB}_{\phi 16}$ в качестве «платформ» для последующей интеграции три ранее полученных штамма, содержащие маркер, фланкированный $\text{attL/R}_{\phi 16}$ -сайтами (**13869#542::Sm**, **13869#1741::Sm** и **13869#1865::Sm**), были электротрансформированы Xis/Int -хелпером. Эффективность вырезания маркера составила более 95% во всех трех случаях и была равна эффективности вырезания интегративной плазмиды из природного $\text{attB}_{\phi 16}$ -сайта, что однозначно подтверждает функциональность тестируемых $\text{attL/R}_{\phi 16}$ рекомбинантных сайтов. Таким образом, каждый из полученных штаммов **13869#542::B**, **13869#1741::B** и **13869#1865::B** (Таблица 1) содержал два $\text{attB}_{\phi 16}$ -сайта: один природный и один искусственно созданный (Рисунок 17).

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

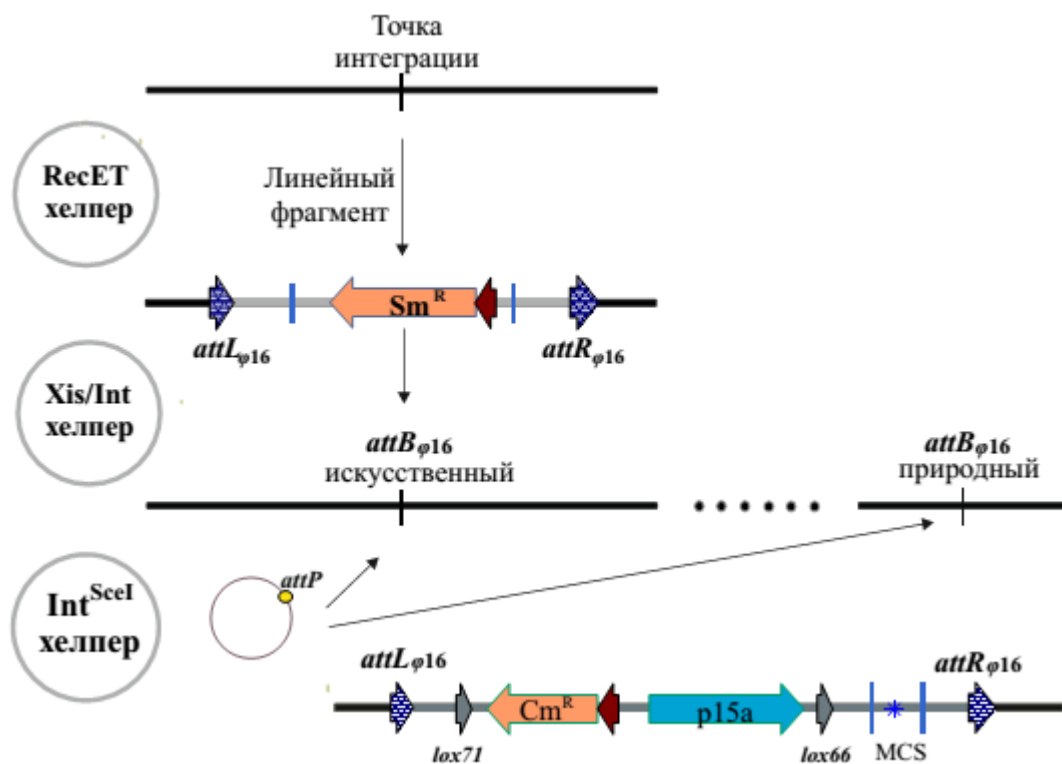


Рисунок 17 – Схема конструирования искусственных $attB_{\phi 16}$ -сайтов и проверка их функциональности

4.2.5. Проверка возможности переноса маркированных инсерций методом электротрансформации геномной ДНК в *S. 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 *S. glutamicum*.

Двумя основными методами переноса мутаций в геномной инженерии бактерий являются общая трансдукция и электротрансформация геномной ДНК. Общая фаговая трансдукция - это эффективный и широко используемый метод

для объединения положительных мутаций, применяемый в различных бактериях. Однако данный метод не может быть применен в *C. glutamicum* в связи с отсутствием известных трансдуцирующих коринебактериальных фагов. Электротрансформация геномной ДНК - другой эффективный метод, разработанный для работы с бактериями, для которых не были идентифицированы трансдуцирующие фаги (Choi et al, 2006; Kilbane and Bielaga, 1991). Несмотря на то, что метод электротрансформации геномной ДНК является достойной альтернативой уже упомянутому методу фаговой трансдукции, нам не удалось найти информацию о его применении в *C. glutamicum*. В связи с чем в данной работе была протестирована возможность переноса маркированных инсерций методом электротрансформации геномной ДНК в *C. glutamicum*.

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, содержал одну копию mini-Mu(LER) единицы в различных положениях (**#258**, **#1883** и **#2123**) (Таблица 1). Чтобы исключить эффект контаминации в качестве реципиента для объединения маркированных модификаций был использован Sm^R штамм **13869B::L-pCRIM-Cm-R**, ранее полученный в данной работе (Таблица 1). 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 Mu-единицами был развернут, что означало отсутствие нормальных плеч для прохождения рекомбинации. Выделение геномной ДНК и процедуру электротрансформации проводили согласно описанным протоколам («Материалы и методы»). 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 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 3).

Таблица 3 - 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	0±0
#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

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.

Далее мы решили проверить, подтверждается ли эта закономерность для модификаций, расположенных в локусах, выбранных Mu-зависимой системой при внутримолекулярной транспозиции. С этой целью с помощью RecE⁵⁶⁴T-опосредованной рекомбинации Cm маркер был интегрирован в точку, координата которой соответствовала положению в геноме одной из двух mini-Mu единиц двухкопийного амплификанта - вышеупомянутого клона № 10 (Gorshkova et al, 2018), ранее служившего в качестве отрицательного контроля. В результате были получены соответствующие независимые штаммы **13869#484::Cm** и **13869#2370::Cm**. Интересно, что только одна из двух маркированных точек (#2370), была успешно перенесена посредством электротрансформации геномной ДНК. Поскольку три ранее успешно перенесенные mini-Mu единицы, расположенные в точках **#258**, **#1883** и **#2123**, являлись результатом первичной интеграции, мы предположили, что механизмы поиска сайта мишени при внутримолекулярной и межмолекулярной транспозиции отличаются. И участки, выбранные Mu-зависимой системой транспозиции при первичной интеграции, в отличие от выбранных в результате внутривромосомной амплификации, с большей вероятностью способны к эффективной RecA-зависимой рекомбинации. Тогда касательно клона № 10 можно предположить, что в положение **#2370** была осуществлена первичная интеграция mini-Mu единицы, а в позиции **#484** располагалась ее амплифицированная копия.

4.2.6. Создание библиотеки mini-Mu интегрантов в *S. glutamicum*

Поскольку эксперимент выявил закономерность, что mini-Mu единицы, явившиеся результатом первичной межмолекулярной Mu-зависимой транспозиции, были перенесены с достаточной эффективностью, для

дальнейшего подтверждения данной гипотезы было решено расширить выборку тестируемых точек. С этой целью была осуществлена Му-зависимая интеграция mini-Mu единиц. Интеграция была выполнена в соответствии с протоколом («Материалы и методы») с использованием интегративной плазмиды pАН-mini-Mu(LER)-YS (MG014200) и хелпера для Му-транспозиции pVK-lacI^Q-Ptac-MuAB (MG014199) (Рисунок 18).

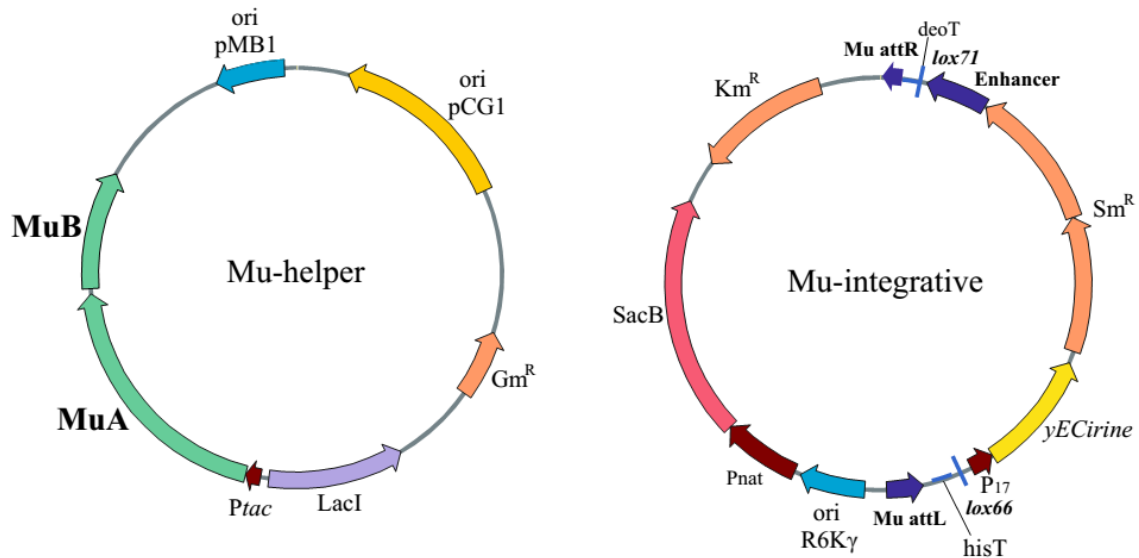


Рисунок 18 – Схема плазмид: Му-хелпер и Му-интегративная

После осуществления Му-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 3). Определение точек интеграции mini-Mu транспозона в хромосоме *S. glutamicum* было осуществлено согласно описанному протоколу («Материалы и методы»), точные координаты были представлены в Таблице 3. 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 16-676 колоний на 20 мкг геномной ДНК и 10⁸ выживших после электротрансформации клеток (Таблица 3). Отрицательный

контроль (без добавления геномной ДНК) содержал только 1-3 спонтанных Sm^R клона. 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 3). 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; подобная разница в эффективности переноса наблюдалась для всех трех тестируемых штаммов *C. glutamicum*.

На основании полученных данных была выявлена закономерность, что участки ДНК, доступные для интеграции mini-Mu единиц в результате межмолекулярной транспозиции, могут быть успешно рекомбинированы. Поэтому в текущем исследовании был предложен способ, основанный на применении Mu-зависимой системы транспозиции для идентификации точек, способных к переносу.

В данной работе мы представили ограниченное количество точек, пригодных для конструирования в них *attB*_{φ16}-сайтов с целью последующего переноса интегрированных в них модификаций посредством электротрансформации геномной ДНК, но, применяя систему Mu-зависимой транспозиции с дальнейшим определением положения интеграции mini-Mu единиц, можно практически бесконечно расширять представленную библиотеку. В настоящее время интеграция на основе Mu транспозиции используется как рутинная процедура, не представляющая особой сложности в исполнении, а эффективность данной системы такова, что позволяет получить до нескольких сотен клонов за один раз. Дальнейшее расширение библиотеки займет чуть больше одной недели с момента введения Mu-хелпера до идентификации

координат точек интеграции mini-Mu единиц в полученных клонах. Также метод позволяет сразу отбросить нежизнеспособные и медленно растущие варианты. Поскольку все точки, даже выбранные с помощью системы транспозиции фага Mu, переносятся с разной частотой, представляется удобным предварительно протестировать полученные клоны с целью отбора наиболее рекомбинационно эффективных еще до определения их положения.

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 пусть и с некоторыми ограничениями был впервые продемонстрирован для *S. glutamicum*.

4.2.7. 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 19). 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 ранее сконструированный $attB_{\phi 16}$ (второй

«In»). На четвертом этапе происходит Cre-зависимое удаление маркированной векторной части, окруженной модифицированными *lox66/71* сайтами (второй «Out»). 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 переносу с помощью электропорации геномной ДНК.

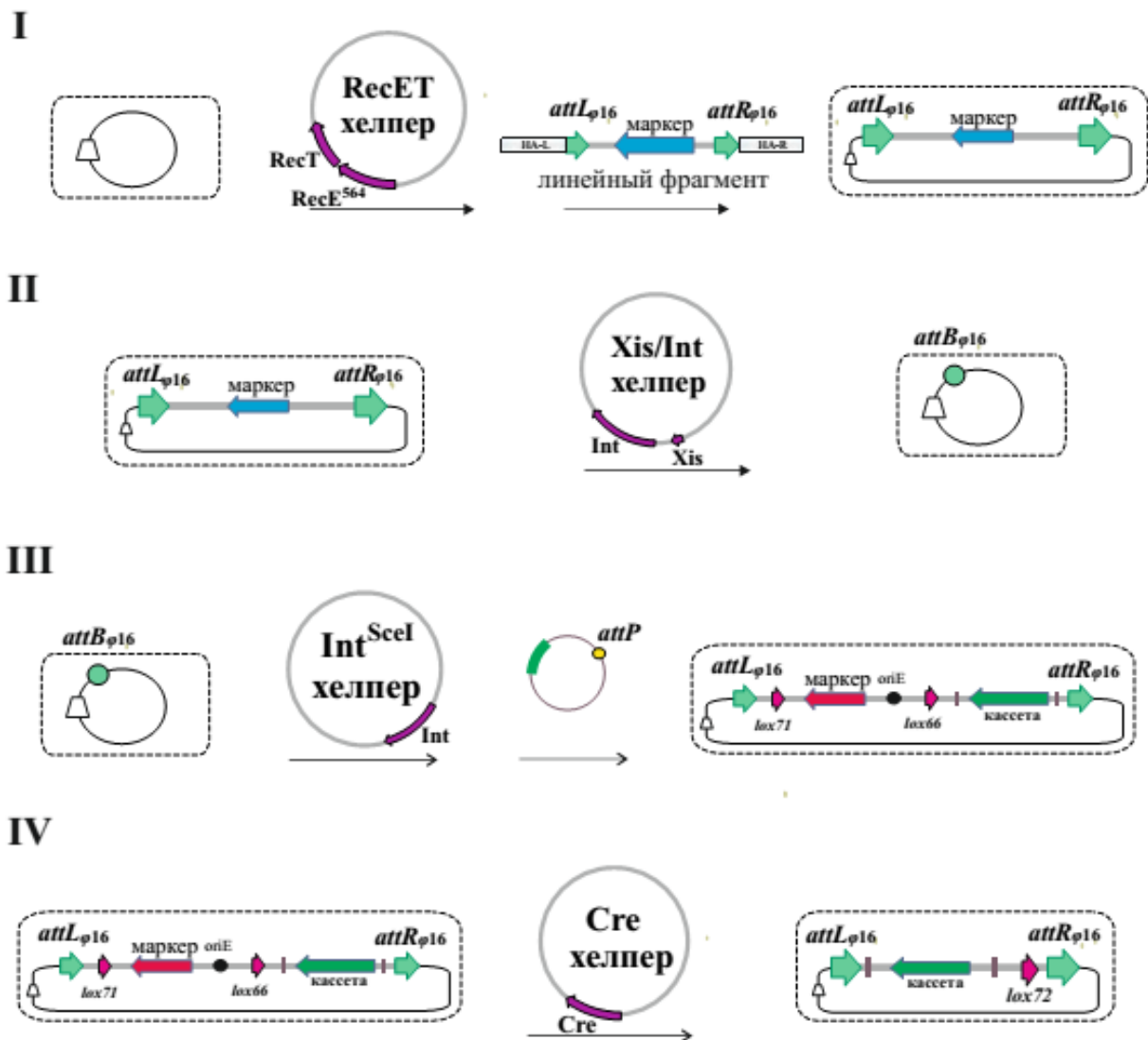


Рисунок 19 – Схематическое изображение Dual-In/Out стратегии, разработанной для введения гетерологичной ДНК в заданную точку на хромосоме *C. glutamicum*

4.2.8. 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 $attB_{\phi 16}$ -сайты с последующим объединением всех инсерций в одном штамме. Этот метод был продемонстрирован для двух промышленно значимых штаммов *S. glutamicum* ATCC13869 (**13869**) и *S. glutamicum* ATCC13032 (**13032**).

Изначально для создания штаммов с различным положением искусственного $attB_{\phi 16}$ необходимо было инактивировать природный сайт для предотвращения в него интеграции. С этой целью была сделана делеция $attB_{\phi 16}$ (29 п.н.), расположенного в CDS2239 **13869**, на основе гомологичной рекомбинации с использованием условно реплицирующейся плазмиды pBS5T, несущей фрагмент гомологии 1,6 т. п. н., лишенный 30 центральных нуклеотидов, соответствующих ядру последовательности сайта $attB_{\phi 16}$. Отсутствие последовательности «ядра» $attB_{\phi 16}$ -сайта в полученном штамме **13869ΔB** было подтверждено секвенированием.

Три из одиннадцати точек, идентифицированных Mu-зависимой системой транспозиции и способных к переносу посредством электротрансформации геномной ДНК, были выбраны на хромосоме **13869** (#400, #668 и #2370) для создания искусственных $attB_{\phi 16}$ -сайтов. Конструирование штаммов, содержащих искусственный $attB_{\phi 16}$ -сайт в различных положениях на хромосоме, состояло из двух этапов: (1) RecE⁵⁶⁴T-опосредованная интеграция вырезаемого маркера в выбранные локусы хромосомы; (2) Xis/Int $_{\phi 16}$ -зависимое вырезание маркера окруженного $attL/R_{\phi 16}$ -сайтами с образованием $attB_{\phi 16}$ -сайта. Три маркированных Cm линейных ДНК фрагмента, нацеленных на интеграцию в точки #400, #668 и #2370 (Таблица 2) хромосомы **13869**, были сконструированы, как описано выше. Для осуществления интеграции линейных фрагментов RecET-хелпер был введен в ранее полученный штамм **13869ΔB**. Штамм **13869ΔB**, содержащий вспомогательную плазмиду, был электропорирован 2 мкг линейных ДНК фрагментов **ds#400Cm**, **ds#668Cm** и **ds#2370Cm**, в результате

чего были получены три независимых маркированных штамма **13869ΔВ#400::Cm**, **13869ΔВ#668::Cm** и **13869ΔВ#2370::Cm**, соответственно (Таблица 1). Затем в каждом штамме маркер был вырезан с помощью ранее сконструированного Xis/Int-хелпера. В результате были получены три безмаркерных штамма, содержащих искусственный $attB_{\phi 16}$ -сайт в различных локусах хромосомы: **13869ΔВ#400::В**, **13869ΔВ#668::В** и **13869ΔВ#2370::В** (Таблица 1) для последующей интеграции генов флуоресцентных белков. Для этого на базе интегративной плазмиды pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16} были получены две новые плазмиды pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16}-G и pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16}-R путем клонирования гена yEGFP под контролем конститутивного промотора P_{dapA} (*C. glutamicum*) в MluI/XhoI сайты и ген TurboRFP под промотором P_{cskA} (*E. coli*) в сайт EcoRV, соответственно (Рисунок 20).

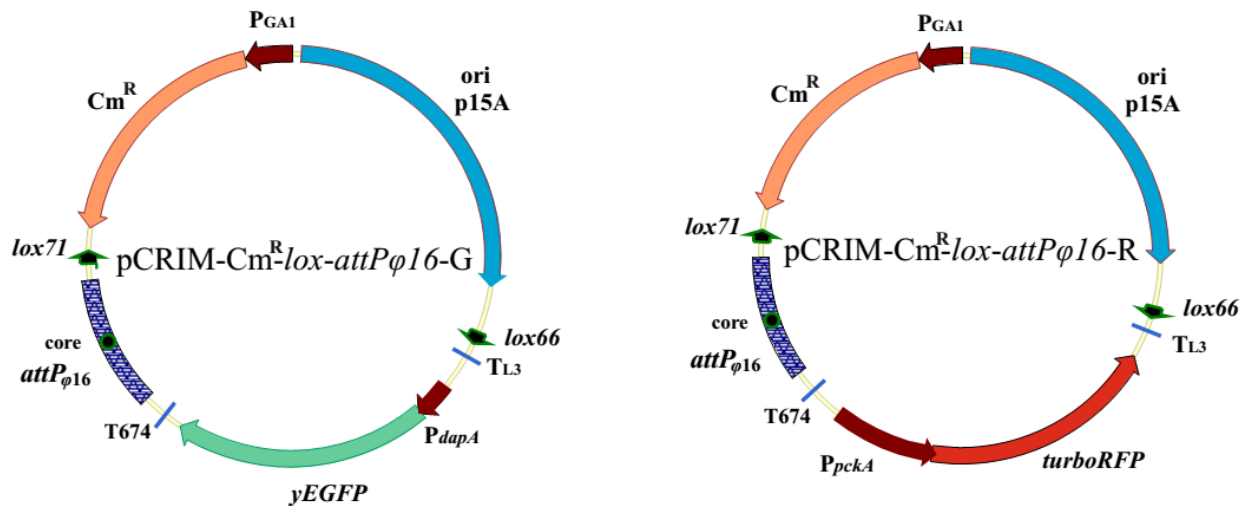


Рисунок 20 – Схемы интегративных плазмид pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16}-G и pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16}-R, кодирующие гены флуоресцентных белков yEGFP и TurboRFP

Интегративная плазида pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16}-G, содержащая ген yEGFP, была интегрирована в искусственный $attB_{\phi 16}$ -сайт хромосомы ранее полученных штаммов **13869ΔВ#400::В** и **13869ΔВ#2370::В** с помощью Int^{SceI}-хелпера, в результате чего были получены штаммы **13869ΔВ#400::G-Cm** и **13869ΔВ#2370::G-Cm**, соответственно. Интегративная плазида pCRIM-Cm^R-lox-attP_{φ16}-R, содержащая ген TurboRFP, была введена в **13869ΔВ#668::В**, в результате чего был получен штамм **13869ΔВ#668::R-Cm** (Таблица 1). Затем из всех полученных маркированных штаммов Int^{SceI}-хелпер был элиминирован

вследствие IPTG индуцированной экспрессии мегануклеазы I-SceI («Материалы и методы»).

Для объединения генов флуоресцентных белков в одном штамме в качестве реципиента был выбран штамм **13869ΔВ#400::G-Cm**. Для вырезания фланкированной *lox*-сайтами маркированной векторной части интегративной плазмиды Cre-хелпер был введен в **13869ΔВ#400::G-Cm**. В результате Cre-опосредованной эксцизии был получен штамм **13869ΔВ#400::G**. Эффективность вырезания составила более 97%. Таким образом, безмаркерный реципиентный штамм **13869ΔВ#400::G** был подготовлен для переноса целевых кассет. Геномная ДНК из двух других штаммов **13869ΔВ#668::R-Cm** и **13869ΔВ#2370::G-Cm** была выделена, и две маркированные кассеты, содержащие гены флуоресцентных белков, были последовательно введены путем электротрансформации геномной ДНК в штамм-реципиент с последующим Cre-зависимым вырезанием маркированной векторной части после каждого акта переноса. В результате был получен безмаркерный бесплазмидный штамм **13869ΔВ#400::G#668::R#2370::G**, геном которого содержал 2 копии гена уEGFP и одну копию гена TurboRFP. Для подтверждения функциональности интегрированных генов измерение флуоресценции проводили после каждого этапа объединения вставок, результаты измерений представлены на Рисунке 21.

Также стратегия Dual-In/Out с последующей комбинацией генов флуоресцентных белков была продемонстрирована для геномной инженерии штамма *C. glutamicum* ATCC 13032 (**13032**). С помощью предложенного метода был сконструирован штамм **13032В::G#2393::R** (Таблица 1), содержащий одну копию гена уEGFP, интегрированного в природный *attB_{φ16}*-сайт и одну копию гена TurboRFP в точке #2393. Аналогичным образом было проведено измерение флуоресценции в полученных штаммах. Результаты представлены на Рисунке 21.

Как видно из Рисунка 21, 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.

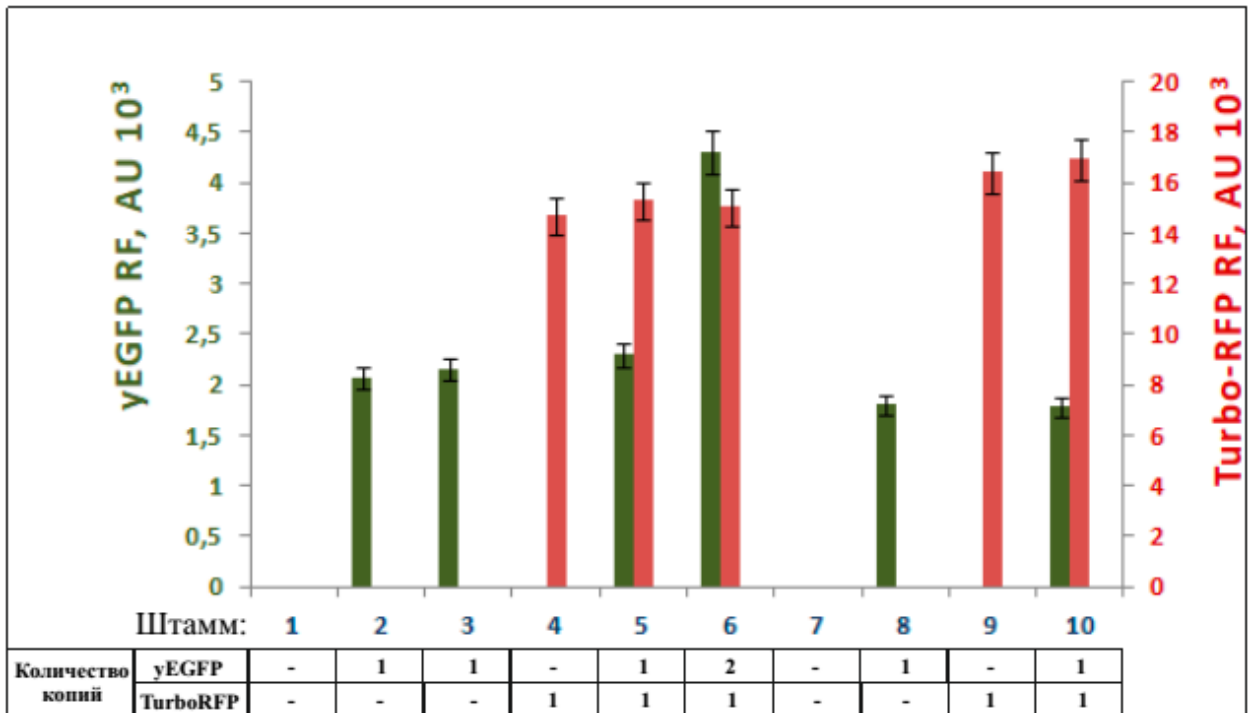


Рисунок 21 – Относительная интенсивность флуоресценции уEGFP и TurboRFP. Родительский штамм 13869 (1), производные 13869 штамма с различной комбинацией генов уEGFP и TurboRFP: 13869ΔВ#400::G (2) 13869ΔВ#2370::G (3), 13869ΔВ#669::R (4), 13869ΔВ#400::G#669::R (5), 13869ΔВ#400::G#669::R#2370::G (6) и родительского штамма 13032 (7), и его производные 13032В::G (8), 13032ΔВ#2393::R (9), 13032В::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.

4.2.9. Увеличение эффективности переноса модификаций методом электротрансформации геномной ДНК *C. 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 *C. 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 4), 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 4). Ожидаемая структура ДНК вновь полученных клонов была полностью подтверждена ПЦР.

Таблица 4 – 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 kb)	198,108	16±3	207±25
542	L-Sm-R (1.8 kb)	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 RecE⁵⁶⁴T-зависимой системы гомологичной рекомбинации.

Было показано, что гетерологичная экспрессия RecE⁵⁶⁴T в клетках *S. glutamicum*, усиливая гомологичную рекомбинацию, способствует увеличению эффективности переноса генетических модификаций, сконструированных не только в локусах, предварительно идентифицированных с помощью Mu-зависимой системы транспозиции, но и в произвольно выбранных участках хромосомы *S. glutamicum*. Таким образом, в случае, когда в штамме-продуценте допустима экспрессия генов RecE⁵⁶⁴T-системы, модификации с любой локализацией могут быть перенесены посредством электротрансформации геномной ДНК, что значительно расширяет границы применимости разработанного метода.

4.2.10. Преимущества разработанного метода

Разработанный метод, основанный на стратегии Dual-In/Out с последующим объединением полученных инсерций посредством электротрансформации геномной ДНК, имеет ряд преимуществ перед уже существующим набором инструментов для модификации хромосомы *S. glutamicum*. По сравнению с RecA-гомологичной рекомбинацией, основанной на использовании нерепликативных векторов, Dual-In/Out стратегия позволяет эффективно вводить необходимое количество идентичных кассет, а в отличие от RecE⁵⁶⁴T-опосредованной рекомбинации длина интегрируемых кассет ограничивается только емкостью интегративной плазмиды. В связи с появлением возможности объединения кассет можно не конструировать каждую модификацию последовательно в штамме-продуценте, как это делалось раньше в *S. glutamicum*, а создавать параллельно, причем в любых произвольно выбранных точках на хромосоме, нарушение которых не влияет на жизнеспособность клетки. Кроме того, стало возможно тестировать сконструированные инсерции по-отдельности, а для синергетического эффекта

комбинировать только лучшие. В случае, когда в штамме-продуcente не допустима экспрессия генов RecET-системы, метод предлагает конструирование модификаций в точках, заранее выбранных с помощью Mu-зависимой системы транспозиции, поскольку, как было отмечено в работе, эти участки генома *C. glutamicum* способны к высокоэффективной RecA-зависимой гомологичной рекомбинации. Mu-зависимая система транспозиции также как и стратегия Dual-In/Out позволяет вводить несколько протяженных кассет. Однако повторяющиеся раунды интеграции кассет с помощью системы на основе фага Mu вызывают множественные перестройки генома, в то время как стратегия Dual-In/Out позволяет нам осуществлять точную интеграцию больших и повторяющихся вставок в заранее выбранные точки. Можно надеяться, что разработанная высокоэффективная и прецизионная стратегия может быть широко использована в качестве удобного генетического инструментария для редактирования генома при создании различных лабораторных и промышленных штаммов *C. glutamicum*.

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 *S. 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 *S. glutamicum* посредством электротрансформации геномной ДНК.
4. Было показано, что гетерологичная экспрессия RecE^{564T} в клетках *S. glutamicum*, усиливая гомологичную рекомбинацию, существенно увеличивает эффективность переноса генетических модификаций.
5. Функциональность метода была продемонстрирована для двух промышленно значимых штаммов *S. glutamicum* ATCC 13869 и ATCC 13032.

Список сокращений

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации

RBS – сайт связывания рибосомы

5'-UTR – 5'-нетранслируемая область

asRNA – малая антисмысловая РНК

ORF – открытая рамка считывания

SD – последовательность Шайна-Далгарно

G – гуанин

C – цитозин

A – аденин

T – тимин

IPTG – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид

BLAST – средство поиска основного локального выравнивания

ак. о. – аминокислотные остатки

АТФ – аденозин-5'-трифосфат

ВКПМ – Российская национальная коллекция промышленных микроорганизмов
Института генетики и селекции промышленных микроорганизмов

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотреитол

дцДНК – двухцепочечная ДНК

ОП – оптическая плотность

оцДНК – одноцепочечная ДНК

п. н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

т. п. н. – тысяч пар нуклеотидов

тРНК – транспортная РНК

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

Список цитируемой литературы

1. Abbani M.A., Papagiannis C.V., Sam M.D., Cascio D., Johnson R.C., Clubb R.T. (2007). Structure of the cooperative excisionase (Xis)-DNA complex reveals a micronucleoprotein filament that regulates phage lambda intasome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 2109–2114.
2. Abe S., Takayama K., Kinoshita S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol.* 13(3): 279–301.
3. Abraham Z.H. and Symonds N. (1990). Purification of overexpressed gam gene protein from bacteriophage Mu by denaturation-renaturation techniques and a study of its DNA- binding properties. *Biochem J.* 269(3): 679–684.
4. Abremski K. and Hoess R. (1984). Bacteriophage P1 Site-Specific Recombination. Purification and Properties of the Cre Recombinase Protein. *J Biol Chem.* 259: 1509–1514.
5. Adham S.A., Campelo A.B., Ramos A., Gil J.A. (2001). Construction of a xylanase-producing strain of *Brevibacterium lactofermentum* by stable integration of an engineered xysA gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol.* 67: 5425–5430.
6. Akhverdyan V.Z., Gak E.R., Tokmakova I.L., Stoynova N.V., Yomantas Y.A.V., Mashko S.V. (2011). Application of the bacteriophage Mu-driven system for the integration/amplification of target genes in the chromosomes of engineered Gram-negative bacteria - Mini review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 91: 857–871.
7. Alain A.V., Asai Y., Inui M., Kobayashi M., Kurusu Y., Yukawa H. (1994). Transposon mutagenesis of coryneform bacteria. *Mol Gen Genet.* 245: 397–405.
8. Andrews B. J., Proteau G.A., Beatty L.G., Sadowski P.D. (1985). The F1p Recombinase of the 2 Micron Circle DNA of Yeast: Interaction with Its Target Sequences. *Cell.* 40: 795–803.
9. Ankri S., Reyes O., Leblon G. (1996). Electrotransformation of highly DNA-restrictive corynebacteria with synthetic DNA. *Plasmid.* 35: 62–66.
10. Appasani K., Thaler D.S., Goldberg E.B. (1999). Bacteriophage T4 gp2 interferes with cell viability and with bacteriophage lambda Red recombination. *J Bacteriol.* 181(4): 1352–1355.
11. Ausubel F.M. (1974). Radiochemical purification of bacteriophage lambda integrase. *Nature.* 247: 152–154.
12. Baker T.A., Mizuuchi M., Mizuuchi K. (1991). MuB protein allosterically activates strand transfer by the transposase of phage Mu. *Cell.* 65: 1003–1013.
13. Barbour S.D., Nagaishi H., Templin A., Clark A.J. (1970). Biochemical and genetic studies of recombination proficiency in *Escherichia coli*. II. Rec+

- revertants caused by indirect suppression of rec-mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 67(1): 128–35.
14. Bardonnet N. and Blanco C. (1991). Improved vectors for transcriptional signal screening in corynebacteria. FEMS Microbiol Lett. 84: 97–102.
 15. Baritugo K-A., Kim T.H., Yokimiko D., Choi J., Hong S.H., Jeong K.J., Choi J.H., Joo J.C., Park S.J. (2018). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fermentative production of chemicals in biorefinery. Appl Microbiol Biotechnol. 102(9): 3915-3937.
 16. Bartek T., Makus P., Klein B., Lang S., Olidges M. (2008). Influence of L-isoleucine and pantothenate auxotrophy for L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum* revisited by metabolome analyses. Bioprocess Biosyst Eng. 31(3): 217–225.
 17. Baumgart M., Unthan S., Radek A., Herbst M., Siebert D., Bruehl N., et al. (2016). Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum*—Genome reduction as a tool toward improved strains for synthetic biology and industrial biotechnology. N Biotechnol. 33: S25–S25.
 18. Baumgart M., Unthan S., Ruckert C., Sivalingam J., Grunberger A., Kalinowski J., Bott M., Noack S., Frunzke J. (2013). Construction of a prophage-free variant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 for use as a platform strain for basic research and industrial biotechnology. Appl Environ Microbiol. 79(19): 6006–6015.
 19. Bayan N., Houssin C., Chami M., Leblon G. (2003). Mycomembrane and S-layer: Two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. J Biotechnol. 104(1-3): 55–67.
 20. Becker J., Klopprogge C., Herold A., Zelder O., Bolten C.J., Wittmann C. (2007). Metabolic flux of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* over expression and modification of G6P dehydrogenase. J Biotechnol. 132: 99–109.
 21. Becker J., Rohles C.M., Wittmann C. (2018). Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. Metab Eng. 50: 122–141.
 22. Becker J., Schäfer R., Kohlstedt M., Harder B. J., Borchert N.S., Stöveken N., Bremer E., Wittmann C. (2013). Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. Microb Cell Fact. 12: 110.
 23. Becker J. and Wittmann C. (2017). Industrial microorganisms: *Corynebacterium glutamicum*, in Industrial Biotechnology, Wittmann, C. and Liao, J.C., Eds., Germany, Weinheim, Wiley-VCH, 2017, pp. 183–203.
 24. Bernard K. (2012). The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J Clin Microbiol. 50(10): 3152–3158.

25. Bernard K.A. (2015). *Corynebacterium*: Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. 1–23.
26. Bikard D., Jiang W.Y., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L.A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 41: 7429–7437.
27. Binder S., Siedler S., Marienhagen J., Bott M., Eggeling L. (2013). Recombineering in *Corynebacterium glutamicum* combined with optical nanosensors: A general strategy for fast producer strain generation. *Nucleic Acids Res.* 41: 6360–6369.
28. Bonnassie S., Burini J.F., Oreglia J., Trautwetter A., Patte J.C., Sicard A.M. (1990). Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J Gen Microbiol.* 136: 2107–2112.
29. Broach J.R., Guarascio V.R., Jayaram M. (1982). Recombination within the Yeast Plasmid 2 μ Circle Is Site-Specific. *Cell.* 29: 227–234.
30. Brooks K. and Clark A.J. (1967). Behavior of λ bacteriophage in a recombination deficient strain of *Escherichia coli*. *J Virol.* 1: 283–293.
31. Brüssow H. and Desiere F. (2001). Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol Microbiol.* 39: 213–222.
32. Buck G. and Groman N.B. (1981). Genetic elements novel for *Corynebacterium diphtheriae*: specialized transducing elements and transposons. *J Bacteriol.* 148: 143–152.
33. Bukovska G., Klucar L., Vlcek C., Adamovic J., Turna J., Timko J. (2006). Complete nucleotide sequence and genome analysis of bacteriophage BFK20 – a lytic phage of the industrial producer *Brevibacterium flavum*. *Virology.* 348(1): 57–71.
34. Buschke N., Schäfer R., Becker J., Wittmann C. (2013). Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications - optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. *Bioresour Technol.* 135: 544–554.
35. Campbell A. (1962). Episomes. *Adv Genet.* 11: 101–114.
36. Chaconas G., Harshey R.M., Sarvetnick N., Bukhari A.I. (1981). Predominant end-products of prophage Mu DNA transposition during the lytic cycle are replicon fusions. *J Mol Biol.* 150: 341–359.
37. Chang H.W. and Julin D.A. (2001). Structure and function of the *Escherichia coli* RecE protein, a member of the RecB nuclease domain family. *J Biol Chem.* 276: 46004–46010.
38. Chen C.L., Pan T.Y., Kan S.C. et al. (2008). Genome sequence of the lytic bacteriophage P1201 from *Corynebacterium glutamicum* NCHU 87078: Evolutionary relationships to phages from Corynebacterineae. *Virology.* 378:

- 226–232.
39. Chevalier J., Pommier M.T., Cremieux A., Michel G. (1988). Influence of Tween 80 on the mycolic acid composition of three cutaneous corynebacteria. *J Gen Microbiol.* 134: 2457–2461.
 40. Cho J.S., Choi K.R., Prabowo C.P.S., Shin J.H., Yang D., Jang J., Lee S.Y. (2017). CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng.* 42: 157–167.
 41. Choi J.W., Yim S.S., Jeong K.J. (2017). Development of a high-copy-number plasmid via adaptive laboratory evolution of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102: 873–883.
 42. Choi K.H., Kumar A., Schweizer H.P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods.* 64: 391–397.
 43. Chu C.C., Templin A., Clark A.J. (1989). Suppression of a frameshift mutation in the *recE* gene of *Escherichia coli* K-12 occurs by gene fusion. *J Bacteriol.* 171(4): 2101–2109.
 44. Cianfanelli F.R., Cunrath O., Bumann D. (2020). Efficient dual-negative selection for bacterial genome editing. *BMC Microbiol.* 20: 1–6.
 45. Cleto S., Jensen J.V.K., Wendisch V.F., Lu T.K. (2016) *Corynebacterium glutamicum* Metabolic Engineering with CRISPR Interference (CRISPRi). *ACS Synth Biol.* 5: 375–385.
 46. Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 252(3): 1102–1106.
 47. Coros C.J., Sekino Y., Baker T.A., Chaconas G. (2003). Effect of mutations in the C-terminal domain of MuB on DNA binding and interactions with MuA transposase. *J Biol Chem.* 278: 31210–31217.
 48. Court D.L., Sawitzke J.A., Thomason L.C. (2002). Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet.* 36: 361–388.
 49. Deng C., Lv X., Li J., Liu Y., Du G., Liu L. (2020). Development of a DNA double-strand break-free base editing tool in *Corynebacterium glutamicum* for genome editing and metabolic engineering. *Metab Eng Commun.* 11: e00135.
 50. Eggeling L. and Bott M. (2005). Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton.
 51. Enquist L.W. and Skalka A. (1973). Replication of bacteriophage lambda DNA dependent on the function of host and viral genes. I. Interaction of red, gam and rec. *J Mol Biol.* 75(2): 185–212.
 52. Equbal M.J., Srivastava P., Agarwal G.P., Deb J.K. (2013). Novel expression system for *Corynebacterium acetoacidophilum* and *Escherichia coli* based on

- the T7 RNA polymerase-dependent promoter. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 7755–7766.
53. Esposito D. and Scocca J.J. (1997). The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res.* 25: 3605–3614.
 54. Fu J., Bian X., Hu S., Wang H., Huang F., Seibert P.M., Plaza A., Xia L., Müller R., Stewart A.F., Zhang Y. (2012). Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting. *Nat Biotechnol.* 30: 440–446.
 55. Gally D.L., Bogan J.A., Eisenstein B.I., Blomfield I.C. (1993). Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol.* 175(19): 6186–6193.
 56. Ge J., Lou Z., Harshey R.M. (2010). Immunity of replicating Mu to self-integration: A novel mechanism employing MuB protein. *Mob DNA.* 1: 1–14.
 57. Gillen J.R., Karu A.E., Nagaishi H., Clark A.J. (1977). Characterization of the deoxyribonuclease determined by lambda reverse as exonuclease VIII of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 113: 27–41.
 58. Gillen J.R., Willis D.K., Clark A.J. (1981). Genetic analysis of the RecE pathway of genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 145(1): 521–532.
 59. 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.
 60. Goryshin I.Y., Naumann T.A., Apodaca J., Reznikoff W.S. (2003). Chromosomal deletion formation system based on Tn5 double transposition: use for making minimal genomes and essential gene analysis. *Genome Res.* 13: 644–653.
 61. Gottesman M.M., Gottesman M.E., Gottesman S., M Gellert. (1974). Characterization of bacteriophage lambda reverse as an *Escherichia coli* phage carrying a unique set of host-derived recombination functions. *J Mol Biol.* 88(2): 471–87.
 62. Grindley N.D.F., Whiteson K.L., Rice P.A. (2006). Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev of Biochem.* 75: 567–605.
 63. Groenen M.A.M. and van de Putte P. (1986). Analysis of the ends of bacteriophage Mu using site-directed mutagenesis. *J Mol Biol.* 189: 597–602.
 64. Guillouet S., Rodal A.A., An G., Lessard P.A., Sinskey A.J. (1999). Expression of the *Escherichia coli* catabolic threonine dehydratase in *Corynebacterium*

- glutamicum* and its effect on isoleucine production. *Appl Environ Microbiol.* 65(7): 3100–3107.
65. Hall S.D. and Kolodner R.D. (1994). Homologous pairing and strand exchange promoted by the *Escherichia coli* RecT protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(8): 3205–3209.
 66. Hall S.D., Kane M.F., Kolodner R.D. (1993). Identification and characterization of the *Escherichia coli* RecT protein, a protein encoded by the *recE* region that promotes renaturation of homologous single-stranded DNA. *J Bacteriol.* 175(1): 277–287.
 67. Hammes W., Schleifer K.H., Kandler O. (1973). Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J Bacteriol.* 116: 1029–1053.
 68. Harshey R.M. (1984). Transposition without duplication of infecting bacteriophage Mu DNA. *Nature.* 311(5986): 580–581.
 69. Harshey R.M. (2014). Transposable phage Mu. *Microbiol Spectr.* 2(5): 10.
 70. Harshey R.M. and Jayaram M. (2006). The Mu transpososome through a topological lens. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 41(6): 387–405.
 71. Hartbrich A., Schmitz G., Weuster-Botz D., De Graaf A.A., Wandrey C. (1996). Development and application of a membrane cyclone reactor for *in vivo* NMR spectroscopy with high microbial cell densities. *Biotechnol Bioeng.* 51(6): 624–635.
 72. Hashiro S., Mitsuhashi M., Yasueda H. (2019). Overexpression system for recombinant RNA in *Corynebacterium glutamicum* using a strong promoter derived from corynephage BFK20. *J Biosci Bioeng.* 128: 255–263.
 73. Hendrix R.W. (2003). Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol.* 6(5): 506–11.
 74. Hermann T., Pfefferle W., Baumann C., Busker E., Schaffer S., Bott M., Sahn H., Dusch N., Kalinowski J., Pühler A., Bendt A.K., Krämer R., Burkovski A. (2001). Proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis.* 22(9): 1712–1723.
 75. Howe M.M. and Bade E.G. (1975). Molecular Biology of Bacteriophage. *Science.* 190(4215): 624–631.
 76. Hu J., Li Y., Zhang H., Tan Y., Wang X. (2014). Construction of a novel expression system for use in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid.* 75: 18–26.
 77. Huang H., Chai C., Yang S., Jiang W., Gu Y. (2019). Phage serine integrase-mediated genome engineering for efficient expression of chemical biosynthetic pathway in gas-fermenting *Clostridium ljungdahlii*. *Metab Eng.* 52: 293–302.
 78. Huang Y., Li L., Xie S., Zhao N., Han S., Lin Y., Zheng S. (2017). Recombineering using RecET in *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 via a self-excisable cassette. *Sci Rep.* 7: 1–8.

79. Hüser A.T., Chassagnole C., Lindley N.D., Merkamm M., Guyonvarch A., Elisáková V., Pátek M., Kalinowski J., Brune I., Pühler A., Tauch A. (2005). Rational design of a *Corynebacterium glutamicum* pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling. *Appl Environ Microbiol.* 71(6): 3255–3268.
80. Ikeda K. (1909). On a new seasoning. *J Tokyo Chem Soc.* 30: 820–36.
81. Ikeda M. and Nakagawa S. (2003). The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62(2-3): 99–109.
82. Ikeda M., Mitsunashi S., Tanaka K., Hayashi M. (2009). Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer. *Appl Environ Microbiol.* 75(6): 1635–1641.
83. Ikeda M., Okamoto K., Katsumata R. (1999). Cloning of the transketolase gene and the effect of its dosage on aromatic amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 201–206.
84. Inui M., Murakami S., Okino S., Kawaguchi H., Vertès A.A., Yukawa H. (2004). Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 7(4): 182–196.
85. Iyer L.M., Koonin E.V., Aravind L. (2002). Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Redbeta, ERF and RAD52. *BMC Genomics.* 3(1): 8.
86. Jacquier A. and Dujon B. (1985). An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell.* 41: 383–394.
87. Jäger W., Schäfer A., Pühler A., Labes G., Wohllenen W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. 174: 5462–5465.
88. Jensen V.K.J. (2015). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of glutamate derivatives: Dissertation / Jensen V.K.J. // Bielefeld, Universität Bielefeld, 116 p.
89. Jiang H., Yang J.Y., Harshey R.M. (1999). Criss-crossed interactions between the enhancer and the att sites of phage Mu during DNA transposition. *EMBO J.* 18: 3845–3855.
90. Jiang Y., Qian F., Yang J., Liu Y., Dong F., Xu C., Sun B., Chen B., Xu X., Li Y., Wang R., Yang S. (2017). CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun.* 8: 1–11.

91. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337: 816–821.
92. Johnson R.C. (2015). Site-specific DNA inversion by serine recombinases. *Microbiol Spectr*. 3(1): MDNA3-0047-2014.
93. Jorge J.M.P., Nguyen A.Q.D., Pérez-García F., Kind S., Wendisch V.F. (2017a). Improved fermentative production of gamma-aminobutyric acid via the putrescine route: systems metabolic engineering for production from glucose, amino sugars and xylose. *Biotechnol Bioeng*. 114(4): 862–873.
94. Jorge J.M.P., Pérez-García F., Wendisch V.F. (2017b). A new metabolic route for the fermentative production of 5-aminovalerate from glucose and alternative carbon sources. *Bioresour Technol*. 245: 1701–1709.
95. Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., et al. (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol*. 104(1-3): 5–25.
96. Kalinowski J., Wolters D., Poetsch A. (2008). Proteomics of *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria, pp. 55-78. In Burkovski A (ed.). *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
97. Kang M.K., Lee J., Um Y., Lee T., Bott M., Park S.J., Woo H.M. (2014a). Synthetic biology platform of CoryneBrick vectors for gene expression in *Corynebacterium glutamicum* and its application to xylose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98: 5991–6002.
98. Kang M.S., Han S.S., Kim M.Y., et al. (2014b). High-level expression in *Corynebacterium glutamicum* of nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* for acrylamide production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98: 4379–4387.
99. Karakousis G., Ye N., Li Z., Chiu S.K., Reddy G., Radding C.M. (1998). The beta protein of phage lambda binds preferentially to an intermediate in DNA renaturation. *J Mol Biol*. 276(4): 721–31.
100. Katsumata R, Ozaki A, Oka T, Furuya A (1984). Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J Bacteriol*. 159: 306–311.
101. Kikuchi Y., Itaya H., Date M., Matsui K., Wu L.F. (2009). TatABC overexpression improves *Corynebacterium glutamicum* Tat-dependent protein secretion. *Appl Environ Microbiol*. 75(3): 603-607.
102. Kilbane J. and Bielaga B. (1991). Instantaneous gene transfer from donor to recipient microorganisms via electroporation. *Biotechniques*. 10: 354–365.
103. Kim I.K., Jeong W.K., Lim S.H., Hwang I.K., Kim Y.H. (2011). The small ribosomal protein S12P gene *rpsL* as an efficient positive selection marker in

- allelic exchange mutation systems for *Corynebacterium glutamicum*. J Microbiol Methods. 84: 128–130.
104. Kim J., Hirasawa T., Sato Y., Nagahisa K., Furusawa C., Shimizu H. (2009). Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol. 81: 1097–1106.
 105. Kind S. and Wittmann C. (2011). Bio-based production of the platform chemical 1,5-diaminopentane. Appl Microbiol Biotechnol. 91(5): 1287–1296.
 106. Kinoshita S., Udaka S., Shimono M. (1957). Studies on the amino acid fermentation Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J Gen Appl Microbiol. 3(3): 193–205.
 107. Kmiec E. and Holloman W.K. (1981). β -Protein of bacteriophage λ promotes renaturation of DNA. J Biol Chem. 256: 12636–12639.
 108. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature. 533: 420–424.
 109. Kortmann M., Kuhl V., Klaffl S., Bott M. (2015). A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: Construction and comparative evaluation at the single-cell level. Microb Biotechnol. 8: 253–265.
 110. Kovall R. and Matthews B.W. (1997). Toroidal structure of λ -exonuclease. Science. 277: 1824–1827.
 111. Krause H.M. and Higgins N.P. (1986). Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu repressor and *Escherichia coli* integration host factor. J Biol Chem. 261: 3744–3752.
 112. Kuo C.F., Zou A., Jayaram M., Getzoff E., Harshey R. (1991). DNA-protein complex during attachment-site synapsis in Mu DNA transposition. EMBO J. 10: 1585–1591.
 113. Kurusu Y., Kainuma M., Inui M., Satoh Y., Yukawa H. (1990). Electroporation-transformation system for coryneform bacteria by auxotrophic complementation. Agric Biol Chem. 54(2): 443–447.
 114. Kushner S.R., Nagaishi H., Clark A.J. (1974). Isolation of exonuclease VIII: the enzyme associated with *sbcA* indirect suppressor. Proc Natl Acad Sci U S A. 71(9): 3593–3597.
 115. Kuzminov A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. Microbiol Mol Biol Rev. 63(4): 751–813.
 116. Landy A. (1993). Mechanistic and structural complexity in the site-specific recombination pathway of Int and FLP. Curr Opin Genet Dev. 3(5): 699–707.
 117. Landy A. (2015). The λ Integrase site-specific recombination pathway. Microbiol Spectr. 176: 139–148.

118. Lange J., Müller F., Takors R., Bombach B. (2018). Harnessing novel chromosomal integration loci to utilize an organosolv-derived hemicellulose fraction for isobutanol production with engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Biotechnol.* 11(1): 257–263.
119. Lausberg F., Chattopadhyay A.R., Heyer A., Eggeling L., Freudl R. (2012). A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. *Plasmid.* 68: 142–147.
120. Le Marrec C., Moreau S., Loury S., Blanco C., Trautwetter A. (1996). Genetic characterization of site-specific integration functions of ϕ AAU2 infecting “*Arthrobacter aureus*” C70. *J Bacteriol.* 178: 1996–2004.
121. Lee J.Y., Choy H.E., Lee J.H., Kim G.J. (2015). Generation of minicells from an endotoxin-free gram-positive strain *Corynebacterium glutamicum*. *J Microbiol Biotechnol.* 25(4): 554–558.
122. Lee J.Y., Na Y.A., Kim E., Lee H.S., Kim P. (2016). The Actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. *J Microbiol Biotechnol.* 26(5): 807–822.
123. Lee S.S., Shin H., Jo S., Lee S.M., Um Y., Woo H.M. (2018). Rapid identification of unknown carboxyl esterase activity in *Corynebacterium glutamicum* using RNA-guided CRISPR interference. *Enzyme Microb Technol.* 114: 63–68.
124. Leßmeier L. and Wendisch V.F. (2015). Identification of two mutations increasing the methanol tolerance of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiol.* 15: 216.
125. Letek M., Valbuena N., Ramos A., Ordonez E., Gil J.A., Mateos L.M. (2006). Characterization and use of catabolite-repressed promoters from gluconate genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 188: 409–423.
126. Levchenko I., Luo L., Baker T.A. (1995). Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes Dev.* 9: 2399–2408.
127. Li C., Swofford C.A., Rückert C., Sinskey A.J. (2021). Optimizing Recombineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng.* 118(6): 2255–2264.
128. Li M., Chen J., Wang Y., Liu J., Huang J., Chen N., Zheng P., Sun J. (2020). Efficient multiplex gene repression by CRISPR-dCpf1 in *Corynebacterium glutamicum*. *Front Bioeng Biotechnol.* 8: 357.
129. Liebl W., Bayerl A., Schein B., Stillner U., Schleifer, K.H. (1989). High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett.* 65(3) 299–303.
130. Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W., Schleifer K.H. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, “*Brevibacterium flavum*” DSM 20411, “*Brevibacterium lactofermentum*” DSM 20412 and DSM 1412, and

- Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int J Syst Evol Microbiol.* 41(2): 255-260.
131. Liu J., Wang Y., Lu Y., Zheng P., Sun J., Ma Y. (2017b). Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact.* 16: 1–17.
 132. Liu W., Tang D., Wang H., Lian J., Huang L., Xu Z. (2019). Combined genome editing and transcriptional repression for metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* using a catalytically active Cas12a. *Appl Microbiol Biotechnol.* 103: 8911–8922.
 133. Liu X., Zhang W., Zhao Z., Dai X., Yang Y., Bai Z. (2017a). Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Crit Rev Biotechnol.* 37(4): 541–551.
 134. Liu X., Zhao Z., Dong G., Li Y., Peng F., Liu C., Zhang F., Linhardt R.J., Yang Y., Bai Z. (2020). Identification, repair and characterization of a benzyl alcohol-inducible promoter for recombinant proteins overexpression in *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microb Technol.* 141: 1–7.
 135. Luo G., Zhao N., Jiang S., Zheng S. (2021). Application of RecET-Cre/*loxP* system in *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 for L-leucine production. *Biotechnol Lett.* 43: 297–306.
 136. Lv Y., Liao J., Wu Z., Han S., Lin Y., Zheng S. (2012). Genome sequence of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, which provides insight into amino acid biosynthesis in coryneform bacteria. *J Bacteriol.* 194(3): 742-743.
 137. Ma W., Wang X., Mao Y., Wang Z., Chen T., Zhao X. (2015). Development of a markerless gene replacement system in *Corynebacterium glutamicum* using *upp* as a counter-selection marker. *Biotechnol Lett.* 37: 609–617.
 138. Mariconda S., Namgoong S.Y., Yoon K.H., Jiang H., Harshey R.M. (2000). Domain III function of Mu transposase analysed by directed placement of subunits within the transpososome. *J Biosci.* 25: 347–360.
 139. Marques F., Luzhetskyy A., Mendes M.V. (2020). Engineering *Corynebacterium glutamicum* with a comprehensive genomic library and phage-based vectors. *Metab Eng.* 62: 221–234.
 140. Marsic N., Roje S., Stojiljkovic I., Salaj-Smic E., Trgovcevic Z. (1993). *In vivo* studies on the interaction of RecBCD enzyme and lambda Gam protein. *J Bacteriol.* 175(15): 4738–4743.
 141. Matsuda Y., Itaya H., Kitahara Y., Theresia N.M., Kutukova E.A., Yomantas Y.A.V., Date M., Kikuchi Y., Wachi M. (2014). Double mutation of cell wall proteins CspB and PBP1a increases secretion of the antibody Fab fragment from *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact.* 13(1): 56.

142. Mentz A., Neshat A., Pfeifer-Sancar K., Pühler A., Rückert C., Kalinowski J. (2013). Comprehensive discovery and characterization of small RNAs in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC Genomics*. 14(1): 714.
143. Minaeva N.I., Gak E.R., Zimenkov D.V., Skorokhodova A.Y., Biryukova I.V., Mashko S.V. (2008). Dual-In/Out strategy for genes integration into bacterial chromosome: a novel approach to step-by-step construction of plasmid-less marker-less recombinant *E. coli* strains with predesigned genome structure. *BMC Biotechnol.* 8: 63.
144. Miwa K., Matsui K., Terabe M., Ito K., Ishida M., Takagi H., Nakamori S., Sano K. (1985). Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 39: 281–286.
145. Mizuno N., Dramićánin M., Mizuuchi M., Adam J., Wang Y., Han Y.W., Yang W., Steven A.C., Mizuuchi K., Ramoñ-Maiques S. (2013). MuB is an AAA+ ATPase that forms helical filaments to control target selection for DNA transposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: 2441–2450.
146. Mizuuchi K. (1992). Transpositional recombination: Mechanistic insights from studies of Mu and other elements. *Annu Rev Biochem*. 61: 1011–1051.
147. Moreau S., Blanco C., Trautwetter A. (1999a). Site-specific integration of corynephage ϕ 16: Construction of an integration vector. *Microbiology*. 145: 539–548.
148. Moreau S., Le Marrec C., Blanco C., Trautwetter A. (1999b). Analysis of the integration functions of ϕ 304L: An integrase module among corynephages. *Virology*. 255: 150–159.
149. Moreau S., Leret V., Marrec C.L., Varangot H., Ayache M., Bonnassie S., Blanco C., Trautwetter A. (1995). Prophage distribution in coryneform bacteria. *Res Microbiol*. 146: 493–505.
150. Muniyappa K. and Radding C.M. (1986). The homologous recombination system of phage λ . Pairing activities of β protein. *J Biol Chem*. 261: 7472–7478.
151. Murphy K.C. (1998). Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 180(8): 2063–2071.
152. Muyrers J.P., Zhang Y., Benes V., Testa G., Ansorge W., Stewart A.F. (2000b). Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep*. 1(3): 239–243.
153. Muyrers J.P., Zhang Y., Buchholz F., Stewart A.F. (2000a). RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes*. 15: 1971–1982.
154. Mythili E., Kumar K.A., Muniyappa K. (1996). Characterization of the DNA-binding domain of β protein, a component of phage λ Red-pathway, by UV catalyzed cross-linking. *Gene*. 182: 81–87.

155. Nakamura Y., Nishio Y., Ikeo K., Gojobori T. (2003). The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. *Gene*. 317(1-2): 149–155.
156. Nakayama C., Teplow D.B., Harshey R.M. (1987). Structural domains in phage Mu transposase: Identification of the site-specific DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84: 1809–1813.
157. Nakayama K., Tanaka H., Hagino H., Kinoshita S. (1966). Studies on lysine fermentation: Part V. Concerted feedback inhibition of aspartokinase and the absence of lysine inhibition on aspartic semialdehyde-pyruvate condensation in *Micrococcus glutamicus*. *Agric Biol Chem*. 30: 611–616.
158. Nešvera J. and Pátek M. (2008). Plasmids and promoters in corynebacteria and their applications. In: Burkovski A (ed) *Corynebacteria. Genomics and molecular biology*. Caister, Norfolk, pp 113–154.
159. Nešvera J. and Pátek M. (2011). Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90: 1641–1654.
160. Noirot P. and Kolodner R.D. (1998). DNA strand invasion promoted by *Escherichia coli* RecT protein. *J Biol Chem*. 273(20): 12274–12280.
161. Nouioui I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpides N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Göker M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum actinobacteria. *Front Microbiol*. 9: 1–119.
162. Nunes-Düby S.E., Kwon H.J., Tirumalai R.S., Ellenberger T., Landy A. (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res*. 26: 391–406.
163. Ohse M., Takahashi K., Kadowaki Y., Kusaoke H. (1995). Effects of plasmid DNA sizes and several other factors on transformation of *Bacillus subtilis* ISW1214 with plasmid DNA by electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 59(8): 1433–1437.
164. Okibe N., Suzuki N., Inui M., Yukawa H. (2010). Isolation, evaluation and use of two strong, carbon source- inducible promoters from *Corynebacterium glutamicum*. *Lett Appl Microbiol*. 50: 173–180.
165. Olorunniji F.J., Rosser S.J., Stark W.M. (2016). Site-specific recombinases: Molecular machines for the genetic revolution. *Biochem J*. 473: 673–684.
166. Oram M., Woolston J.E., Jacobson A.D., Holmes R.K., Oram D.M. (2007). Bacteriophage-based vectors for site-specific insertion of DNA in the chromosome of *Corynebacteria*. *Gene*. 391(1-2): 53–62.
167. Ozaki A., Katsumata R., Oka T., Furuya A. (1984). Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet*. 196: 175–178.
168. Papagiannis C.V., Sam M.D., Abbani M.A., Yoo D., Cascio D., Clubb R.T.,

- Johnson R.C. (2007). Fis targets assembly of the Xis nucleoprotein filament to promote excisive recombination by phage lambda. *J Mol Biol.* 367: 328–343.
169. Park S.H., Kim H.U., Kim T.Y., Park J.S., Kim S.S., Lee S.Y. (2014). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nat Commun.* 5:4618.
170. Passy S.I., Yu X., Li Z., Radding C.M., Egelman E.H. (1999). Rings and filaments of β protein from bacteriophage λ suggest a superfamily of recombination proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 4279–4284.
171. Pátek M. and Nešvera J. (2013). Promoters and plasmid vectors of *Corynebacterium glutamicum*. In: Tatsumi N., Inui M. (eds) *Corynebacterium glutamicum: biology and biotechnology*. Springer, Berlin, pp 51–88.
172. Pátek M., Eikmanns B.J., Pátek J., Sahn H. (1996). Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: Cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology.* 142: 1297–1309.
173. Pátek M., Holátko J., Busche T., Kalinowski J., Nešvera J. (2013). *Corynebacterium glutamicum* promoters: A practical approach. *Microb Biotechnol.* 6:103–117.
174. Pato M.L. and Banerjee M. (2000). Genetic analysis of the strong gyrase site (SGS) of bacteriophage Mu: Localization of determinants required for promoting Mu replication. *Mol Microbiol.* 37: 800–810.
175. Peng F., Wang X., Sun Y., Dong G., Yang Y., Liu X., Bai Z. (2017). Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb Cell Fact.* 16: 201.
176. Perez-Garcia F., Peters-Wendisch P., Wendisch V.F. (2016). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for fast production of L-lysine and L-pipecolic acid. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100(18): 8075–8090.
177. Plassmeier J.K., Busche T., Molck S., Persicke M., Pühler A., Rückert C., Kalinowski J. (2013). A propionate-inducible expression system based on the *Corynebacterium glutamicum prpD2* promoter and PrpR activator and its application for the redirection of amino acid biosynthesis pathways. *J Biotechnol.* 163: 225–232.
178. Poteete A.R. (2001). What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett.* 201(1): 9–14.
179. Puech V., Chami M., Lemassu A., Lanéelle M.A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daffé M. (2001). 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* 147(5):1365–1382.

180. Radding C.M. (1970). The role of exonuclease and β protein of bacteriophage λ in genetic recombination. I. Effects of red mutants on protein structure. *J Mol Biol.* 52: 491–499.
181. Radford A.J. and Hodgson A.L. (1991). Construction and characterization of a *Mycobacterium - Escherichia coli* shuttle vector. *Plasmid.* 25(2): 149–153.
182. Ravasi P., Peiru S., Gramajo H., Menzella H.G. (2012). Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact.* 11:147.
183. Reed R.R. and Grindley N.D.F. (1981). Transposon-mediated sitespecific recombination *in vitro*: DNA cleavage and protein-DNA linkage at the recombination site. *Cell.* 25: 721–728.
184. Rice P.A. (2015). Serine resolvases. *Microbiol Spectr.* 3(2): MDNA3-0045-2014.
185. Rice P.A., Yang S.W., Mizuuchi K., Nash H.A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein- induced DNA U-turn. *Cell.* 87: 1295–1306.
186. Rodriguez A., Wright G., Emrich S., Clark P.L. (2018). %MinMax: A versatile tool for calculating and comparing synonymous codon usage and its impact on protein folding. *Protein Sci.* 27(1): 356–362.
187. Roldan L.A.S. and Baker T.A. (2001). Differential role of the MuB protein in phage Mu integration vs. replication: Mechanistic insights into two transposition pathways. *Mol Microbiol.* 40(1): 141–155.
188. Rybalchenko N., Golub E.I., Bi B., Radding C.M. (2004). Strand invasion promoted by recombination protein beta of coliphage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(49): 17056–60.
189. Rytter J.V., Helmark S., Chen J., Lezyk M.J., Solem C., Jensen P.R. (2014). Synthetic promoter libraries for *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 2617–2623.
190. Sakai S., Tsuchida Y., Okino S., Ichihashi O., Kawaguchi H., Watanabe T., Inui M., Yukawa H. (2007). Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Appl Environ Microbiol.* 73(7): 2349–2353.
191. Sambrook J. and Russell D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual.*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.
192. Santamaría R., Gil J.A., Mesas J.M., Martín J.F. (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J Gen Microbiol.* 130: 2237–2246.
193. Schäfer A., Kalinowski J., Simon R., Seep-Feldhaus A.H., Pühler A. (1990). High-frequency conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J Bacteriol.* 172(3): 1663–1666.
194. Schäfer A., Tauch A., Droste N., Pühler A., Kalinowski J. (1997). The *Corynebacterium glutamicum cglIM* gene encoding a 5-cytosine

- methyltransferase enzyme confers a specific DNA methylation pattern in an McrBC- deficient *Escherichia coli* strain. *Gene*. 203(2): 95–101.
195. Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. (1994). 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*. 145(1): 69-73.
 196. Schwarzer A. and Pühler A. (1991). Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Nat Biotechnol*. 9: 84–87.
 197. Shang X., Chai X., Lu X., Li Y., Zhang Y., Wang G., Zhang C., Liu S., Zhang Y., Ma J., Wen T. (2017). Native promoters of *Corynebacterium glutamicum* and its application in L-lysine production. *Biotechnol Lett*. 40: 383–391.
 198. Shapiro J.A. (1979). Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76: 1933–1937.
 199. Sheff M.A. and Thorn K.S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 21(8):661–670.
 200. Shen J., Chen J., Jensen P.R., Solem C. (2017). A novel genetic tool for metabolic optimization of *Corynebacterium glutamicum*: efficient and repetitive chromosomal integration of synthetic promoter-driven expression libraries. *Appl Microbiol Biotechnol*. 101: 4737–4746.
 201. Signer E.R. and Weil J. (1968). Recombination in bacteriophage λ . I. Mutants deficient in general recombination. *J Mol Biol*. 34: 261–271.
 202. Singh S., Rockenbach K., Dedrick R.M., Van Demark A.P., Hatfull G.F. (2014). Cross-talk between diverse serine integrases. *J Mol Biol*. 426(2):318–331.
 203. Smith M.C. (2015). Phage-encoded serine integrases and other large serine recombinases. *Microbiol Spectr*. 3(4).
 204. Smith M.C. and Thorpe H.M. (2002). Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol*. 44: 299–307.
 205. Song Y., Matsumoto K., Yamada M., Gohda A., Brigham C.J., Sinskey A.J., Taguchi S. (2012). Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 93(5): 1917–1925.
 206. Sonnen H., Schneider J., Kutzner H.J. (1990). Characterization of phi GA1, an inducible phage particle from *Brevibacterium flavum*. *J Gen Microbiol*. 136(3): 567-71.
 207. Sonnen H., Thierbach G., Kautz S., Kalinowski J., Schneider J., Pühler A., Kutzner H.J. (1991). Characterization of pGA1, a new plasmid from *Corynebacterium glutamicum* LP-6. *Gene*. 107: 69–74.
 208. Srivastava P. and Deb J.K. (2002). Construction of fusion vectors of *Corynebacteria*: expression of glutathione-S-transferase fusion protein in

- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 21476. FEMS Microbiol Lett. 212: 209–216.
209. Stähler N., Oikawa T., Bott M., Eggeling L. (2011). *Corynebacterium glutamicum* as a host for synthesis and export of D-amino acids. J Bacteriol. 193(7): 1702-1709.
210. Stahl F.W. (1998). Recombination in phage λ : One geneticist's historical perspective. Gene. 223: 95–102.
211. Sternberg N. and Hoess R. (1983). The molecular genetics of bacteriophage P1. Annu Rev Genet. 17: 123–154.
212. Surette M.G. and Chaconas G. (1992). The Mu transpositional enhancer can function in trans: Requirement of the enhancer for synapsis but not strand cleavage. Cell. 68: 1101–1108.
213. Surette M.G., Lavoie B.D., Chaconas G. (1989). 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). EMBO J. 8: 3483–3489.
214. Suzuki N. and Inui M. (2013). Genome Engineering of *Corynebacterium glutamicum*. Berlin: Springer.
215. Suzuki N., Nonaka H., Tsuge Y., Inui M., Yukawa H. (2005a). New multiple-deletion method for the *Corynebacterium glutamicum* genome, using a mutant *lox* sequence. Appl Environ Microbiol. 71: 8472–8480.
216. Suzuki N., Nonaka H., Tsuge Y., Okayama S., Inui M., Yukawa H. (2005c). Multiple large segment deletion method for *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol. 69: 151–161.
217. Suzuki N., Okayama S., Nonaka H., Tsuge Y., Inui M., Yukawa H. (2005b). Large-scale engineering of the *Corynebacterium glutamicum* genome. Appl Environ Microbiol. 71: 3369–3372.
218. Suzuki N., Watanabe K., Okibe N., Tsuchida Y., Inui M., Yukawa H. (2009). Identification of new secreted proteins and secretion of heterologous amylase by *C. glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol. 82(3): 491–500.
219. Takahashi N. and Kobayashi I. (1990). Evidence for the double-strand break repair model of bacteriophage lambda recombination. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(7): 2790–2794.
220. Tan Y., Xu D., Li Y., Wang X. (2012). Construction of a novel *sacB*-based system for marker-free gene deletion in *Corynebacterium glutamicum*. Plasmid. 67: 44–52.
221. Tauch A., Götter S., Pühler A., Kalinowski J., Thierbach G. (2002). The alanine racemase gene *alr* is an alternative to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains. J Biotechnol. 99(1): 79–91.

222. Tauch A., Pühler A., Kalinowski J., Thierbach G. (2003). Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *J Biotechnol.* 104: 27–40.
223. Taylor A.L. (1963). Bacteriophage-induced mutation in *Escherichia Coli*. *Genetics.* 50: 1043–1051.
224. Thresher R.J., Makhov A.M., Hall S.D., Kolodner R., Griffith J.D. (1995). Electron microscopic visualization of RecT protein and its complexes with DNA. *J Mol Biol.* 254(3): 364–371.
225. Tsuchiya M. and Morinaga Y. (1988). Genetic control systems of *Escherichia coli* can confer inducible expression of cloned genes in coryneform bacteria. *Bio/Technology.* 6: 428–430.
226. Tsuge Y., Suzuki N., Inui M., Yukawa H. (2007). Random segment deletion excision system in based on IS31831 and Cre/*loxP* *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74:1333–1341.
227. Udaka S. and Kinoshita S. (1958). Studies on L-ornithine fermentation. I. The biosynthetic pathway of L-ornithine in *Micrococcus glutamicus*. *J Gen Appl Microbiol.* 4(4): 272–275.
228. Unthan S., Baumgart M., Radek A., Herbst M., Siebert D., Bruhl N., Bartsch A., Bott M., Wiechert W., Marin K., Hans S., Krämer R., Seibold G., Frunzke J., Kalinowski J., Rückert C., Wendisch V. F., Noack S. (2015). Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum*- a top-down approach to identify and delete irrelevant gene clusters. *Biotechnol J.* 10(2): 290–301.
229. Van der Rest M. E., Lange C., Molenaar D. (1999). A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52(4): 541–545.
230. Venkatesh T.V. and Radding C.M. (1993). Ribosomal protein S1 and NusA protein complexed to recombination protein beta of phage lambda. *J Bacteriol.* 175(6): 1844–1846.
231. Vertès A.A., Inui M., Kobayashi M., Kurusu Y., Yukawa H. (1993). Presence of mrr- and mcr-like restriction systems in coryneform bacteria. *Res Microbiol.* 144(3): 181–185.
232. Wang B., Hu Q., Zhang Y., Shi R., Chai X., Liu Z., Shang X., Shang Y., Wen T. (2018). A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact.* 17: 63.
233. Wang Q., Zhang J., Makishah N.H. Al., Sun X., Wen Z., Jiang Y., Yang S. (2021). Advances and perspectives for genome editing tools of *Corynebacterium glutamicum*. *12: 1–9.*

234. Wang T., Li Y., Li J., Zhang D., Cai N., Zhao G., Ma H., Shang C., Ma Q., Xu Q., Chen N. (2019a). An update of the suicide plasmid-mediated genome editing system in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Biotechnol.* 12: 907–919.
235. Wang Y., Liu Y., Li J., Yang Y., Ni X., Cheng H., Huang T., Guo Y., Ma H., Zheng P., Wang M., Sun J., Ma Y. (2019b). Expanding targeting scope, editing window, and base transition capability of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng.* 116: 3016–3029.
236. Wen Z., Minton N.P., Zhang Y., Li Q., Liu J., Jiang Y., Yang S. (2017). Enhanced solvent production by metabolic engineering of a twin-clostridial consortium. *Metab Eng.* 39: 38–48.
237. Wendisch V.F. (2003). Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol.* 104: 273–285.
238. Wendisch V.F., Jorge J.M.P., Pérez-García F., Sgobba E. (2016). Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 32(6): 105.
239. Wittmann C. (2010). Analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 120: 21–49.
240. Wu M., Xu Y., Yang J., Shang G. (2020). Homing endonuclease I-SceI-mediated *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104: 3597–3609.
241. Yang J. and Yang S. (2017). Comparative analysis of *Corynebacterium glutamicum* genomes: a new perspective for the industrial production of amino acids. *BMC Genomics.* 18: 940.
242. Yim S.S., An S.J., Kang M., Lee J., Jeong K.J. (2013). Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng.* 110: 2959–2969.
243. Yukawa H., Omumasaba C.A., Nonaka H., Kós P., Okai N., Suzuki N., Suda M., Tsuge Y., Watanabe J., Ikeda Y., Vertès A.A., Inui M. (2007). Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology.* 153(4): 1042–1058.
244. Zahoor A., Lindner S.N., Wendisch V.F. (2012). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. *Comput Struct Biotechnol J.* 3:e201210004.
245. Zhang J., Xing X., Herr A.B., Bell C.E. (2009). Crystal structure of *E. coli* RecE protein reveals a toroidal tetramer for processing double stranded DNA breaks. *Structure.* 17: 690–702.
246. Zhang Y., Buchholz F., Muyrers J.P.P., Stewart A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics.* 20: 123–128.

247. Zhang Y., Shang X., Lai S., Zhang G., Liang Y., Wen T. (2012). Development and application of an arabinose-inducible expression system by facilitating inducer uptake in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol.* 78: 5831–5838.
248. Zhao N., Li L., Luo G., Xie S., Lin Y., Han S., Huang Y., Zheng S. (2020). Multiplex gene editing and large DNA fragment deletion by the CRISPR/Cpf1-RecE/T system in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 47: 599–608.
249. Zhou L.B. and Zeng A.P. (2015). Engineering a Lysine-ON riboswitch for metabolic control of lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol.* 4: 1335–1340.
250. 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. (2004). Области хромосомы *E. coli*, предпочтительные для встраивания генов при использовании, системы интеграции на основе фага Ми. *Биотехнология.* 6: 3–18.
251. Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю. Минаева Н.И., Бирюкова И.В., Машко С.В. (2006). Введение симметричного $O_{lac-ideal}$ в область между «-35» и «-10» гибридного промотора P_{trc}/O_{lac} значительно увеличивает эффективность его репрессии белком LacI. *Биотехнология.* 3: 6–16.