

ГОРШКОВА Наталья Васильевна

**РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ИНТЕГРАЦИИ
РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК В ХРОМОСОМУ МЕТИЛОТРОФНЫХ
БАКТЕРИЙ И КОРИНЕБАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ ТРАНС-
ПОЗИЦИИ ФАГА MU**

Специальность 03.01.03. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории №3 Закрытого Акционерного Общества
«Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

ЗАО «АГРИ»

директор по науке, заведующий лабораторией,

г. Москва

Машко Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Федеральное государственное учреждение

Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук,

лаборатория молекулярной инженерии

главный научный сотрудник, г. Москва

Вейко Владимир Петрович

кандидат биологических наук

Институт молекулярной генетики

Российской академии наук

лаборатория репликации и репарации генома

старший научный сотрудник, г. Москва

Генинг Леонид Владимирович

Ведущая организация:

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 года в ____ часов на заседании
Диссертационного Совета Д.217.013.01 при ФГБУ «Государственный научно-
исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
по адресу: 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1,
Тел.: +7 (495) 315-37-47, e-mail: genetika@genetika.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Кур-
чатовский институт» -ГосНИИГенетика и на сайте <http://www.genetika.ru/>

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2018 года.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета,

кандидат химических наук, доцент

Т.Л. Воюшина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. С момента обнаружения в супернатанте культуры почвенной бактерии *Corynebacterium glutamicum* аминокислоты L-глутамата [Kinoshita et al., 1957] интерес к этим бактериям как потенциальным продуцентам аминокислот и других биологически активных соединений растет. Классификация *Corynebacterium glutamicum* как «generally recognized as safe» (GRAS) организм в конце концов превратила эту бактерию в «рабочую лошадку» для крупнотоннажного биотехнологического производства основной массы L-аминокислот (глутамата, лизина и триптофана) [Becker and Wittmann, 2012], диаминов, органических кислот, нуклеотидов, различных спиртов, рекомбинантных белков [Zahoor et al., 2012].

Современный прогресс в совершенствовании имеющихся и создании новых продуцентов биологически активных соединений на базе коринебактерий основывается на успехах применения X-омных технологий (Becker and Wittmann, 2012; 2015; Wittmann, 2010) и бурного развития генетического инструментария для модификации бактериального генома (Baritugo et al., 2018). Тем не менее, разработка быстрых и эффективных методов для получения генетически-модифицированных штаммов актуальна и сегодня.

Увеличение активности генов пути биосинтеза конечного продукта, как правило, является обязательным этапом в процессе конструирования высокопродуктивных штаммов. Поскольку существующие в большинстве развитых стран законодательные ограничения запрещают использование плазмид при создании промышленных продуцентов биологически активных веществ, то приоритетное значение имеет дальнейшее развитие методов конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов с амплифицированными копиями целевых генов в хромосоме.

С целью интеграции определенных фрагментов ДНК в хромосому *C. glutamicum* были разработаны различные интегративные векторы на основе коринефагов [Le Marrec et al., 1994; Moreau et al., 1999], мини-транспозонов, осуществляющие интеграцию фрагментов ДНК в случайные места на хромосоме с использованием «cut-and-past» механизма [Suzuki et al., 2006; Tsuge et al., 2007]. Однако низкая эффективность встраивания гетерологичных генов из-за наличия мощной системы рестрикции в клетках *C. glutamicum*, а также ограниченное количество сайтов-мишеней, а, следовательно, интегрируемых в хромосому *C. glutamicum* копий целевых генов являются недостатками всех вышеперечисленных методов. Кроме того, для осуществления последовательной интеграции нескольких копий целевой группы генов требуется существенно увеличенное время и, как правило, усложнение процедуры.

В этой связи нам представлялось, что известная для клеток грамотрицательных бактерий система репликативной транспозиции бактериофага Mu (см., для обзора, *Akhverdyan et al.*, 2011) могла бы оказаться чрезвычайно полезной и для штаммов *C. glutamicum* в случае успешной адаптации двухкомпонетного варианта этой системы интеграции для экспрессии в грамположительных бактериях.

Цель и задачи работы. Целью настоящей диссертационной работы была адаптация системы транспозиции фага Mu в геном *C. glutamicum* для конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов-продуцентов.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

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

- осуществить конструирование хелперных плазмид, содержащих гены факторов транспозиции MuA, MuB в составе вектора, способного к репликации в клетках *C. glutamicum*;
- исследовать возможность использования ранее сконструированных для *M. methylotrophus* AS1 интегративных плазмид в качестве донора транспозиции целевых генов в составе mini-Mu(LR) или mini-Mu(LER)-элементов в хромосому *C. glutamicum*, где MuL/R – специфические «левый» и «правый» концевой участок ДНК Mu, а E – энхансер транспозиции [*Leung et al.*, 1989; *Mizuuchi M and Mizuuchi K.*, 1989; *Surette et al.*, 1989];
- изучить влияние присутствия и расположения асимметричного энхансера относительно MuL/R на эффективность интеграции и амплификации mini-Mu единицы в хромосоме *C. glutamicum*.

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

- сконструировать интегративные плазмиды с вырезаемыми ДНК-элементами, облегчающими отбор на всех этапах транспозиции;
- осуществить интеграцию, амплификацию и фиксацию нескольких копий различных mini-Mu единиц в хромосоме *C. glutamicum*;
- оценить стабильность сконструированных штаммов.

Научная новизна и практическая значимость работы. Двухплазмидная система транспозиции бактериофага Mu впервые успешно адаптирована для целей интеграции рекомбинантной ДНК *in vivo* в хромосому *C. glutamicum*.

Установлено, что основным механизмом функционирования mini-Mu-транспозона в клетках *C. glutamicum* в рамках данной системы является реплика-

тивная транспозиция, с использованием которой может быть осуществлена амплификация интегрированных фрагментов ДНК в бактериальном геноме.

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

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

Разработанный генетический инструмент был успешно использован в работах ЗАО «АГРИ» при конструировании штаммов *C. glutamicum* - продуцентов некоторых аминокислот и других соединений.

Положения, выносимые на защиту:

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

- «хелперную», обеспечивающую экспрессию генов MuAB факторов транспозиции, способную к автономной репликации в клетках *C. glutamicum*, но удаляемую из популяции в неселективных условиях культивирования;
- «интегративную», с условно зависимой репликацией, содержащую фланкированный L и R концами ДНК фага Mu интегрируемый ген и селективные маркеры – mini-Mu(LR) элемент, и дополнительно энхансер E – mini-Mu(LER) элемент, причем весь mini-Mu(LER) элемент, за исключением целевого гена с флангами MuL/R, может быть удален Cre-рекомбиназой фага P1;
- «хелперную», обеспечивающую экспрессию гена *cre* фага P1, способную к автономной репликации в клетках *C. glutamicum*, но утрачивающуюся в неселективных условиях культивирования.

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

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

4. Конструирование штаммов, производных ATCC 13869, содержащих одновременно в хромосоме различное количество копий двух генов, кодирующих желтый и зеленый флуоресцентные белки, тестируемых генетическими методами, флуоресценцией и Саузерн-гибридизацией, явилось демонстрацией разработанной стратегии.

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

Публикации и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 4 – статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 патентная заявка. Материалы диссертации докладывались на конкурсе работ сотрудников ЗАО «АГРИ» (июнь 2017) и на Международной научной конференции (Лиссабон, Португалия, декабрь, 2010), были представлены в постерном сообщении на 12-ом Международном симпозиуме по «Метаболической инженерии» (Мюнхен, Германия, июнь 2018). Диссертационная работа была апробирована на совместном семинаре Научного Совета ЗАО «АГРИ» и секции «Молекулярная биология» Ученого Совета ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика 23 апреля 2018 года.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из 7 разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы» и «Благодарности». Работа изложена на 134 страницах, включая 31 рисунок и 5 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 226 источников, в том числе 5 на русском языке

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

На разных стадиях своего жизненного цикла бактериофаг Mu дважды использует механизм транспозиции с образованием общего промежуточного продукта, разрешение которого на стадии лизогенизации фагом Mu клетки-хозяина осуществляется по механизму репаративной транспозиции («nick-join-repair»), а на стадии литического роста – с использованием репликативного механизма («nick-join-replicative»), предполагающего обязательное образование структуры коинтеграта на промежуточном этапе. В первом случае это приводит к интеграции линейной ДНК фага Mu в случайные места генома *E. coli* и стабильному состоянию профага, а во втором – к появлению множества копий фага Mu в геноме хозяина и в конечном итоге к формированию фагового потомства [Symonds *et al.*, 1987; Chaconas *et al.*, 1981].

Оба пути транспозиции фага Mu катализируются белок-нуклеиновым комплексом, названным транспозомой [Harshey and Jayaram, 2006]. Сборка этого комплекса достаточно сложный процесс, требующий ряд специфических участков ДНК фага, фаговых белков и белков клетки-хозяина, включенных в сложный цикл белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий на суперспирализованной ДНК. Изгибы молекулы ДНК и тесное взаимодействие доменов, принадлежащих разным мономерам транспозаз, являются необходимыми условиями при формировании функционально-активных сайтов.

Поскольку разработанная ранее Mu-зависимая двухкомпонентная система транспозиции гетерологичной ДНК в геном грамотрицательных бактерий оказалась высокоэффективным и удобным методом хромосомального редактирования, было интересно адаптировать эту систему и для грамположительных бактерий. С этой целью был выбран штамм *C. glutamicum* ATCC 13869.

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

Особенностью этой системы является то, что необходимые для транспозиции элементы и гены белковых факторов находятся в составе разных векторов, при этом одна из плазмид – интегративная, содержит между Mu-*attL* и Mu-*attR* концами фага целевой ген и гены селективных маркеров, не способна к автономной репликации, а другая - хелперная, обеспечивает экспрессию факторов транспозиции MuAB, относительно стабильно поддерживается в штамме-реципиенте даже в неселективных условиях. В разработанных ранее системах хелперные плазмиды были сконструированы на базе векторов, способных к автономной репликации только в грамотрицательных бактериях. Поэтому для проверки функцио-

нальности и активности системы транспозиции фага Му в новом грамположительном организме *Corynebacterium glutamicum* предстояло ввести гены факторов транспозиции MuAB в состав плазмиды, способной к автономной репликации в этой бактерии.

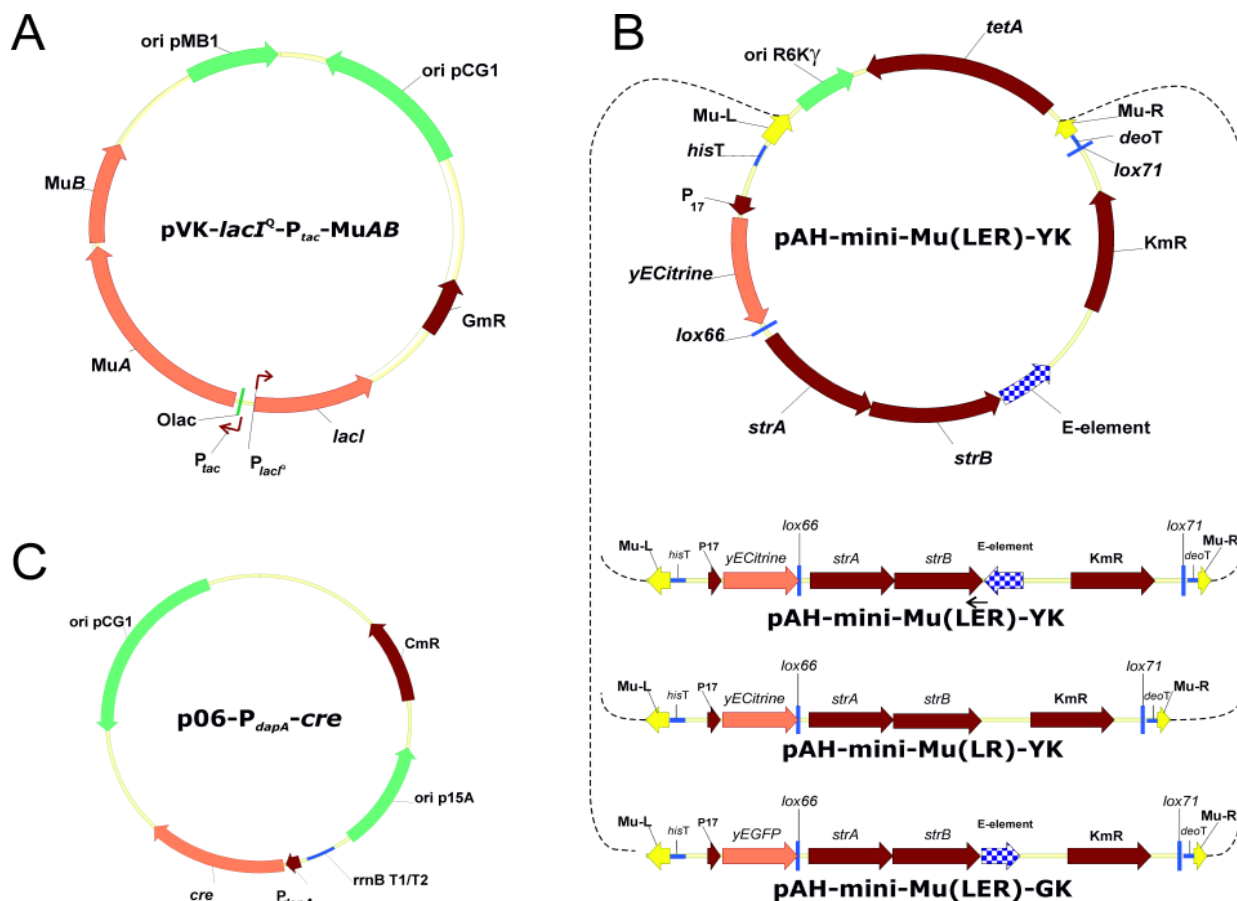


Рисунок 1 - Схематическая карта плазмид, включенных в систему интеграции mini-Mu единиц в хромосому *C. glutamicum*, используя репликативный путь транспозиции фага Mu: (A) плазмида-помощник pVK-*lacI*^Q-P_{tac}-MuAB, содержащая гены факторов транспозиции MuA, MuB; (B) интегративные плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-YK, pAH-mini-Mu(L̄ER)-YK, pAH-mini-Mu(LR)-YK, и pAH-mini-Mu(LER)-GK; (C) плазмида-помощник, содержащая ген Cre рекомбиназы, p06-P_{dapA}-cre

Было сконструировано два варианта хелперных плазмид: pVK9-*lacI*^Q-P_{tac}-MuAB и pVK-P_{dap}-MuAB (Рисунок 1) на базе довольно стабильной в *C. glutamicum* плазмиды pVK9-Gm^R (производная pVK9 [Nakamura et al., 2006]), но в то же время обладающей способностью теряться при культивировании в неселективных условиях. Для первого варианта экспрессия MuAB находилась под транскрипционным контролем IPTG-индуцибельного генетического модуля, содержащего промоторно-операторный элемент конструкции P_{tac}/O_{lac} и *lacI*^Q репрессора [Eggeling and Bott, 2005; Kirchner and Tauch, 2003; Nešvera and Pátek, 2011; Ravasi et al., 2012], а для второго - под контролем конститутивного *C. glutamicum* P_{dapA} промотора средней силы [Pátek, 2005; Pátek et al., 1996]. Также было сконструировано несколько

вариантов интегративной плазмиды, содержащей mini-Mu единицы разного состава, с использованием *pir*⁺-зависимого γ -репликона плазмиды R6K *E. coli* [Metcalf et al., 1994], а, следовательно, не способных поддерживаться в клетках *C. glutamicum*, что вместе с присутствием маркера отбора транспозиции в составе mini-Mu единицы позволяет напрямую вести селекцию первичных интегрантов в *C. glutamicum* клетках (Рисунок 1).

На не содержащей ДНК фага Mu части интегративной плазмиды находился ген *tetA* транспозона Tn10 [Hillen and Berens, 1994; Lawley et al., 2000] под контролем конститутивного промотора, экспрессия которого в клетках *C. glutamicum* была очень важна для подтверждения образования коинтеграта в случае репликативной транспозиции и последующего его возможного разрешения, поскольку коинтеграты обладают Tc^R фенотипом в отличие от Tc^S-фенотипа их «разрешенных» вариантов и интегрантов, полученных в ходе репаративной транспозиции. Для обеспечения селективности процессов Mu-зависимой первичной и внутрихромосомальной транспозиции в клетках *C. glutamicum* состав mini-Mu единицы включал гены устойчивости к канамицину Km^R (Tn5) [Cherepanov and Wackernagel, 1995], стрептомицину Sm^R (RSF1010) [Bagdasarian et al., 1982]. Ожидалось, что клоны, содержащие несколько копий mini-Mu единицы в хромосоме *C. glutamicum* в результате внутрихромосомальной амплификации, могут быть отобраны на высоких концентрациях стрептомицина, поскольку уровень экспрессии одной копии *strAB* генов в клетках ранее исследуемой метилотрофной бактерии был относительно низким, позволяющий вести селекцию амплификантов [Abalakina et al., 2008].

Все mini-Mu единицы содержали структурные гены *yECitrine* или *yEGFP*, кодирующие желтый флуоресцентный белок, *yEYFP*, или зеленый флуоресцентный белок, *yEGFP* [Sheff and Thorn, 2004], возможность использования которых для предварительной оценки эффективности амплификации не исключалась, поскольку уровень экспрессии флуоресцентных белков легко можно измерить количественно с помощью метода спектрофлуорофотометрии [Chalfie et al., 1994]. Экспрессия генов *yECitrine* или *yEGFP* на mini-Mu(LER)-YK (или -GK) единицах, соответственно, находилась под транскрипционным контролем конститутивного *M. methylotrophus* промотора P_{17Mme} [Abalakina et al., 2008].

Варианты интегративных плазмид отличались составом mini-Mu единиц, главным образом, присутствием и ориентацией энхансера (E) относительно L- и R-концов ДНК фага Mu (Рисунок 1).

Модуль, содержащий E-элемент и гены Km^R, Sm^R, был фланкирован *lox66/lox71* последовательностями [Albert et al., 1995], что позволило бы в дальнейшем необратимо удалить его на завершающей стадии эксперимента по амплификации из содержащейся в хромосоме mini-Mu единицы с помощью Cre рекомбиназы фага P1 [Abremski and Hoess, 1984], ген которой находится в составе скон-

струированной хелперной плазмиды p06-P_{dapA}-cre (производной pVK9 [Nakamura et al., 2006]) под контролем конститутивного *C. glutamicum* P_{dapA} промотора средней силы (Рисунок 1).

При вырезании E-содержащих фрагментов из интегрированных mini-Mu(LER) единиц они приобретают mini-Mu(LR) подобный вид и содержат гены *yECitrine* или *yEGFP*, заключенные между Mu-L/R концами.

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

В клетки штамма *C. glutamicum* ATCC 13869, использованного в качестве реципиента, первоначально вводили хелперную плазмиду pVK-lacI^Q-P_{tac}-MuAB, а затем - плазмиду pАН-mini-Mu(LER)-YK в условиях индукции экспрессии MuAB (при добавлении IPTG) с селекцией целевых интегрантов на среде с канамицином. Появление Km^R трансформантов с частотой $1,6 \times 10^{-4}$ (то есть ≈ 200 клонов/ 100 нг ДНК/ $3,2 \times 10^6$ выживших после электропорации клеток), предположительно, явилось результатом интеграции mini-Mu единицы в хромосому хозяина за счет либо репаративного, либо репликативного путей транспозиции Mu [Craig, 1996; Watson et al., 2004]. Анализ полученных Km^R трансформантов обнаружил два типа отличающихся по фенотипу колоний. Небольшая доля трансформантов (1-5%) проявляла Sm^R (устойчивы к 250 мкг/мл стрептомицина) и Tc^S фенотип, и, вероятнее всего, явилась либо результатом репаративной транспозиции, либо «разрешенным» коинтегратором. Однако подавляющее большинство отобранных трансформантов обладали Sm^{HR} (95-99%) фенотипом, так как росли на средах, содержащих 750 мкг/мл стрептомицина, и практически все Sm^{HR} клоны были устойчивы к тетрациклину, что соответствовало структуре коинтеграта. При этом оказалось, что, хотя Sm^{HR}, Tc^R фенотип полученных клонов был достаточно стабильным (97% отдельных колоний сохраняли его после пяти - восьми генераций в неселективных условиях), однако <3% приобретали Sm^R, Tc^S, скорее всего, из-за разрешения коинтеграта.

Анализ *yECitrine*-опосредованной флуоресценции в полученных Sm^{HR} клонах и их Sm^R производных, излеченных от хелперной плазмиды, выявил, что уровень относительной флуоресценции, регистрируемый в клетках предполагаемых коинтеграторов, был в 2 раза выше тестируемого в их Tc^S производных (Рисунок 2А).

Интеграцию mini-Mu транспозона в хромосому *C. glutamicum* ATCC 13869 окончательно подтверждали гибридизацией по Саузерну «меченого» на структурную часть гена Km^R зонда, используемого в качестве маркера mini-Mu транспозона, и хромосомы, гидролизованной по уникальному сайту рестрикции *Sma*I эндонуклеазы, имеющемуся внутри mini-Mu транспозона, но не затрагивающему ген Km^R (Рисунок 2В). Было обнаружено, что все проверенные Sm^{HR} и Tc^R клоны со-

держали две копии mini-Mu единицы в хромосоме бактерии, а их Sm^R и Tc^S производные только одну. При этом размеры одного фрагмента ДНК хромосомы, содержащего ген Km^R , во всех обладающих Sm^{HR} , Tc^R фенотипом клонов, были одинаковыми и соответствовали линейной форме плазмиды pАН-mini-Mu(LER)-YK. Другой фрагмент ДНК хромосомы родительских Sm^{HR} , Tc^R клонов оказался идентичен фрагменту ДНК хромосомы их Sm^R , Tc^S производных, поскольку был образован в рестрикции эндонуклеазой по *SmaI* сайту, содержащемуся внутри mini-Mu единицы, и *SmaI*, ближайшему к Mu-R концу на хромосоме бактерии (Рисунок 3), подтверждая сохранение первоначальных точек интеграции mini-Mu транспозона в геноме бактерии после разрешения коинтеграта, что полностью согласуется с моделью репликативной транспозиции, сопровождающейся образованием коинтеграта с последующим его разрешением.

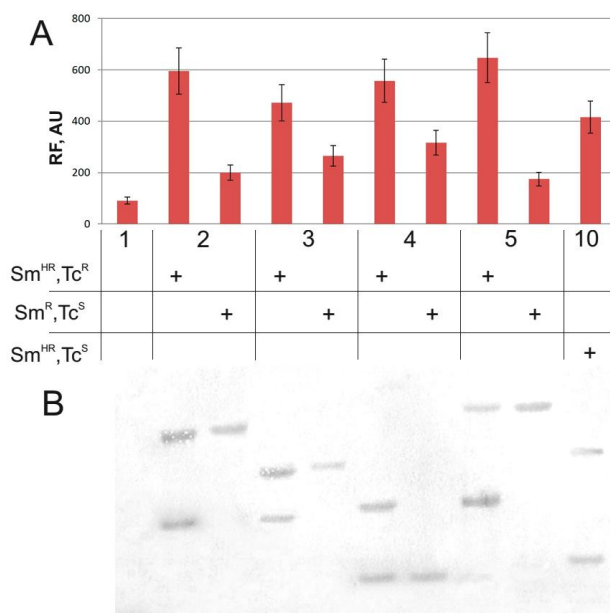


Рисунок 2 - уECitrine удельная флуоресценция (A) и результаты гибридизации по Саузерну (B), выполненные для родительского штамма (1), независимых коинтегратов (Sm^{HR} , Tc^R) и их соответствующих разрешенных интегрнтов ($Sm^R Tc^S$) (2, 3, 4, 5). Для гибридизации по Саузерну геномная ДНК отдельных клонов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

Для выявления механизма появления интегрнтов, обладающих Sm^R , Tc^S фенотипом, $RecA^-$ мутант штамма *C. glutamicum* ATCC13869 был выбран в качестве реципиента, и в него проведена Mu-зависимая интеграция mini-Mu(LER) единицы по стандартной схеме. Эффективность появления Km^R трансформантов в этом опыте составила $(0,5 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ (Km^R клонов/ 100 нг плазмидной ДНК/ количество выживших клеток). Для $RecA^-$ мутанта, аналогично изогенному $RecA^+$ штамму, было обнаружено, что примерно 97-98% полученных Km^R трансформан-

тов обладали Sm^{HR} , Tc^R фенотипом, а остальные 2-3% оказались Sm^R , Tc^S . Но в отличие от Sm^{HR} , Tc^R коинтеграгов, полученных в Rec^+ штамме, фенотип их Rec^- аналогов был значительно более стабильным: Sm^R , Tc^S «резолванты», появление которых зависит только от белков клетки-хозяина, принимающих участие в механизме общей рекомбинации, главным образом, от активности продукта гена *recA* [Fitzpatrick et. al., 1994], не были отобраны после пяти-восьми генераций культивирования в неселективных условиях. Из чего следует, что небольшая часть первичных интегрантов, обладающих Sm^R , Tc^S фенотипом, в *recA* штамме (<5%), вероятно, были получены через репаративный путь транспозиции mini-Mu единицы с интегративной плазмиды.

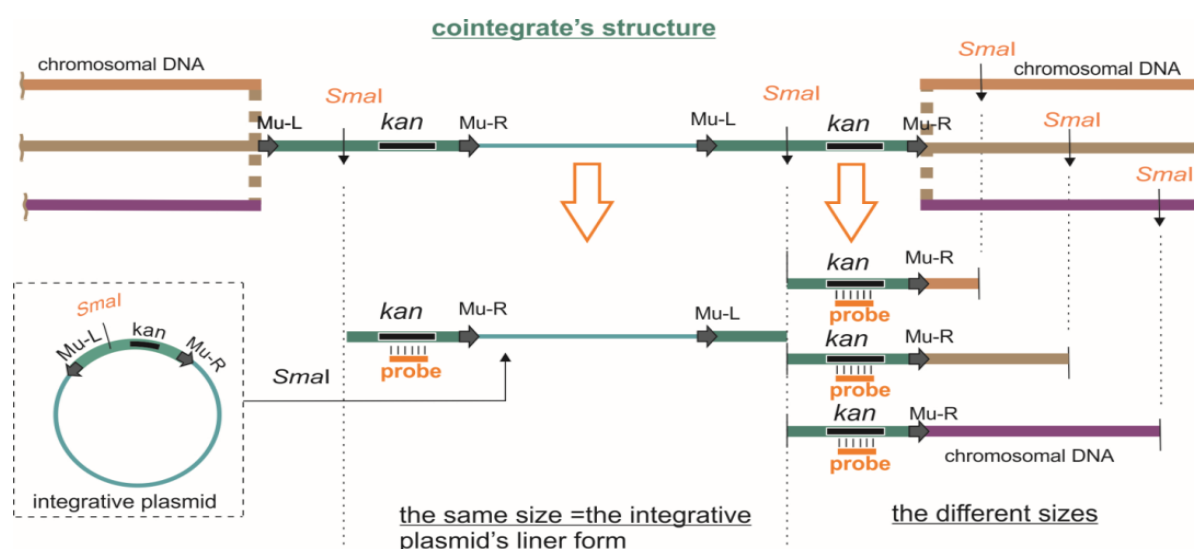


Рисунок 3 - Пояснение к Рисунку 2 - Схема образования структуры коинтеграта и его разрешение в процессе репликативной транспозиции mini-Mu(LE_R)-YK в хромосоме *C. glutamicum* с последующим определением числа копий mini-Mu(LE_R)-YK единиц с помощью гибридизации по Саузерну

2. Амплификация mini-Mu(LE_R)-YK единицы в хромосоме

C. glutamicum ATCC 13869, оптимизация процесса

2.1 Исследование природы происхождения клона №10

Результаты, представленные на Рисунке 2В, объясняют причину стабильно сохраняющегося Sm^{HR} Tc^S фенотипа клона №10 вследствие присутствия двух копий Km^R гена в его хромосоме.

Появление генетически не отличимых прямых повторов mini-Mu транспозона в хромосоме может возникнуть в результате двух независимых актов интеграции или с очень низкой вероятностью при репликативной амплификации интегрированной на первой стадии mini-Mu единицы с последующим слиянием двух продуктов транспозиции в ходе общей рекомбинации между участками mini-Mu ДНК. Встраивание двух инвертированных повторов mini-Mu-единиц в случайные позиции на хромосоме может быть также следствием двух независимых актов интегра-

ции mini-Mu-единиц или результатом внутрихромосомальной амплификации, обязательно сопровождающейся инверсией участка хромосомы *C. glutamicum*, заключенного между двумя противоположно направленными повторами mini-Mu единиц. Поэтому происхождение клона № 10, содержащего две mini-Mu копии в хромосоме, может быть установлено определением точек интеграции mini-Mu в геноме бактерии.

Для клона №10 было выполнено молекулярное клонирование фрагмента ДНК хромосомы, содержащего mini-Mu единицу. Все плазмидные ДНК, выделенные из трех независимо полученных Km^R *E. coli* трансформантов, содержали только одну из двух копий mini-Mu единицы в составе 11,2 т.п.н. ДНК фрагмента хромосомы *C. glutamicum*, обработанной *StuI* эндонуклеазой. Анализ последовательности установил, что граничащая с клонированной mini-Mu единицей последовательность ДНК хромосомы хозяина соответствует перевернутой структуре генома *C. glutamicum*.

Координаты точек встраивания в геном хозяина были идентифицированы и соответствовали 484.726 п.н. и 2.370.010 п.н. последовательности генома *C. glutamicum* ATCC 13869 (GenBank AN AP017557.2). На основании полученных результатов было сделано заключение, что обнаруженная структура клонированного *StuI* -фрагмента могла быть получена только в результате внутримолекулярной репликативной транспозиции первоначально интегрированного mini-Mu транспозона, поскольку сопровождалась перестройкой генома.

2.2 Влияние уровня экспрессии MuAB на эффективность внутримолекулярной транспозиции mini-Mu единицы в хромосоме *C. glutamicum* ATCC 13869

Поскольку возможность внутримолекулярной транспозиции в геноме *C. glutamicum* была продемонстрирована, представляло интерес оценить эффективность этого процесса и, в частности, зависимость ее от уровня экспрессии факторов транспозиции MuAB.

Эксперимент проводился с использованием двух вариантов хелперных плазмид, состав которых отличался только промоторным участком, контролирующим экспрессию генов MuAB, pVK-Gm^R-(P_{dap}-MuAB) и pVK9-Gm^R-(lacI^Q-P_{tac}-MuAB). Для осуществления внутримолекулярной репликативной транспозиции штамм *C. glutamicum* ATCC13869 с одной копией mini-Mu(LER)-YK единицы в хромосоме, содержащий введенную с помощью электротрансформации хелперную плазмиду, культивировали в течение ночи при 37°C в жидкой ВНИ среде с антибиотиком, а в случае pVK9-Gm^R-(lacI^Q-P_{tac}-MuAB) также с IPTG-зависимой индукцией факторов транспозиции MuAB. Отбор Sm^{HR} вариантов, имеющих несколько копий mini-Mu единиц в геноме, вели на высокой концентрации (750мг/мл) стрептомицина. Несколько отобранных случайным образом Sm^{HR} кло-

нов излечивали от хелперной плазмиды и тестировали в них относительные уровни флуоресценции желтого белка уECitrine.

В случае использования хелпера pVK-Gm^R-(P_{dap}-MuAB) частота отбора Sm^{HR} клонов составила $\approx 10^{-4}$ от числа всех посеянных на чашку Sm^R клеток, при этом только в восьми из ста произвольно выбранных Sm^{HR} вариантах уровень относительной флуоресценции уECitrine превышал контрольный, содержащий одну копию транспозона в геноме, в 2 раза (Рисунок 4А). Появление всего лишь одной дополнительной копии в геноме клонов, для которых фиксировался повышенный уровень относительной флуоресценции, было подтверждено гибридизацией по Саузерну (Рисунок 4В), из чего следует, что эффективность амплификации в этом случае составила $\sim 10^{-5}$ клеток.

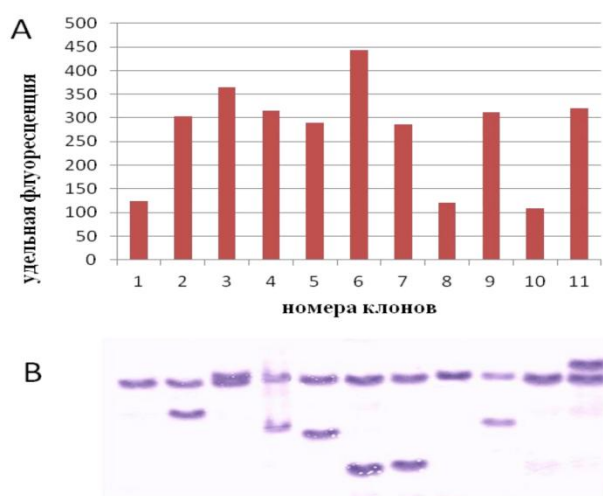


Рисунок 4 - уECitrine удельная флуоресценция (А) и результаты гибридизации по Саузерну (В), выполненные для Sm^{HR} клонов, полученных после амплификации mini-Mu(LER)-YK единиц с помощью хелперной плазмиды pVK-Gm^R-(P_{dap}-MuAB) (2-11) и родительского Sm^R клона, содержащего одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы (1). Для гибридизации по Саузерну геномная ДНК отдельных клонов была выделена и обработана SmaI эндонуклеазой (имеет только один сайт узнавания, находящийся внутри mini-Mu, но не затрагивающий ген *kan*) и гибридизована с амплифицированным с помощью ПЦР фрагментом ДНК, содержащим ген *kan*

Частота возникновения Sm^{HR} клонов в случае использования хелпера pVK9-Gm^R-(lacI^Q-P_{tac}-MuAB) составила $\approx 5.0 \pm 2.0 \times 10^{-3}$ от числа всех посеянных на чашку клеток. Данные по флуоресценции и результаты гибридизации по Саузерну соответствующей хромосомной ДНК со структурной частью гена Km^R, входящего в состав mini-Mu(LER)-YK единицы, представлены на Рисунке 5А и В, соответственно. Результаты эксперимента подтвердили, что все протестированные Sm^{HR} клоны были получены по механизму внутримолекулярной репликативной транспозиции фага Mu изначально интегрированной в хромосому бактерии mini-Mu единицы, и в итоге содержали две или три копии в хромосоме.

Поскольку использование хелпера pVK9-Gm^R-(*lacI*^Q-P_{tac}-MuAB) привело к значительному повышению не только эффективности внутрихромосомальной амплификации, но и множественности транспозиции по сравнению с аналогичной хелперной плазмидой со сниженным уровнем экспрессии генов MuAB вследствие их транскрипции с более слабого промотора, можно предположить, что множественность внутрихромосомальной транспозиции можно будет контролировать уровнем экспрессии генов MuAB.

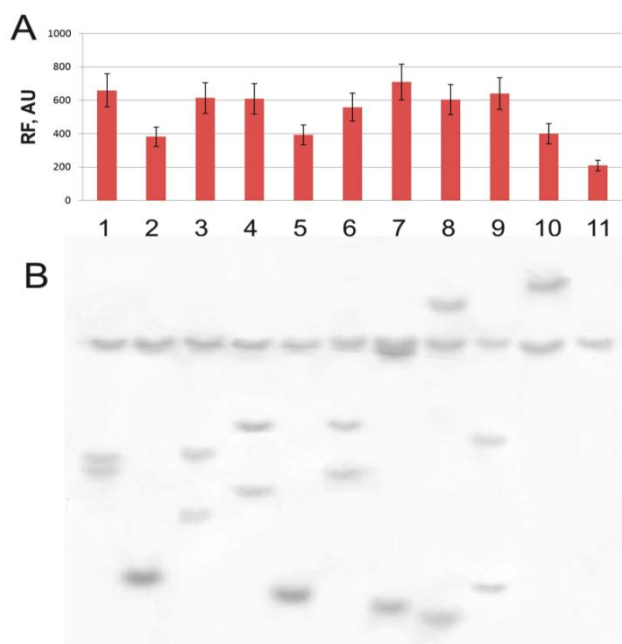


Рисунок 5 - уECitrine удельная флуоресценция (A) и результаты гибридизации по Саузерну (B), выполненные для Sm^{HR} клонов, полученных после амплификации mini-Mu(LER)-YK единиц с помощью хелперной плазмиды pVK-Gm^R-(*lacI*^Q-P_{tac}-MuAB) (1-10) и родительского Sm^R клона, содержащего одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы (11). Для гибридизации по Саузерну геномная ДНК отдельных клонов была выделена и обработана SmaI эндонуклеазой (имеет только один сайт узнавания, находящийся внутри mini-Mu, но не затрагивающий ген *kan*) и гибридизована с амплифицированным с помощью ПЦР фрагментом ДНК, содержащим ген *kan*

2.3 Влияние E-элемента и его ориентации на эффективность транспозиции mini-Mu единицы в хромосоме *C. glutamicum* ATCC 13869

Известно, что в клетках *E. coli* энхансер E является важным структурным элементом генома фага Mu, присутствие которого в природной ориентации относительно L/R на mini-Mu важно для правильной сборки транспозосомы и стимулирования транспозиции (в 100 раз) *in vivo* [Lavoie and Chaconas, 1995; Watson and Chaconas, 1996]. Для оценки влияния E – элемента и его ориентации на эффективность Mu-зависимой транспозиции в геноме *C. glutamicum* была осуществлена электротрансформация трех нативных суперспирализованных плазмид, содержащих mini-Mu(LER)-YK, mini-Mu(L̄ER)-YK, и mini-Mu(LR)-YK единицы, в *C. glutamicum* ATCC 13869 в присутствии факторов транспозиции MuAB.

В этом эксперименте самая высокая частота транспозиции отмечалась для mini-Mu(LER) элемента, которая, однако, только в 20 раз превысила самую низкую, полученную для mini-Mu(LR) элемента (Таблица 1). По-видимому, для сравнительно небольших интегративных плазмид, благодаря близкому пространственному расположению концов Mu-L/R в структуре суперскрученной ДНК, процесс образования минимальной транспозосомы протекает достаточно эффективно даже в отсутствии E-элемента. Энхансер же в обратной ориентации, $\overleftarrow{LER}$, в соответствующей плазмиде имеет недостаточную структурную свободу, чтобы значительно повысить эффективность сборки полноразмерной транспозосомы, поскольку количество интегрантов, содержащих в хромосоме mini-Mu($\overleftarrow{LER}$) единицу, не достигает максимального значения, регистрируемого для mini-Mu(LER) элемента (Таблица 1).

Таблица 1- Влияние суперспирализованной (SH) и «релаксированной» форм плазмиды, а также расположения E -элемента на эффективность транспозиции

Тип интегративной плазмиды	Эффективность интеграции/100нг ДНК/ число выживших клеток	
	SH плазида	«Релаксированная» плазида
pАН-mini-Mu(LR)-YK	$(0.8 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(2.9 \pm 0.6) \times 10^{-8}$
pАН-mini-Mu($\overleftarrow{LER}$)-YK	$(1.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	$(3 \pm 1) \times 10^{-7}$
pАН-mini-Mu(LER)-YK	$(1.6 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	$(9 \pm 3) \times 10^{-7}$

Для осуществления множественной транспозиции «разрешенные» производные отобранных на первом этапе коинтеграторов, содержащие по одной копии всех трех вариантов mini-Mu единиц в хромосоме, не потерявшие плазмиду-помощник pVK-lacI^Q-P_{tac}-MuAB, растили в жидкой среде в условиях индукции экспрессии генов MuAB с последующей селекцией амплификантов на высокой концентрации Sm (750 мкг/мл).

В присутствии в геноме *C. glutamicum* mini-Mu(LER) кассеты эффективность амплификации составила $3 \pm 1 \times 10^{-3}$ клеток ($\approx 200-400$ Sm^{HR} клонов получали на 10^5 Sm^R высевных на чашку клеток). Приблизительно в пять раз меньше Sm^{HR} клонов было получено для штамма, содержащего mini-Mu($\overleftarrow{LER}$) единицу в хромосоме, и только несколько Sm^{HR} клонов было отобрано в случае mini-Mu(LR) варианта (Таблица 2).

Результаты гибридизации по Саузерну подтвердили наличие от двух до трех копий гена Km^R в хромосоме всех Sm^{HR} клонов, производных mini-Mu(LER)-YK содержащего штамма, и в некоторых Sm^{HR} клонах, полученных в результате внутривнутрихромосомальной транспозиции mini-Mu($\overleftarrow{LER}$)-YK единицы. Но лишь одна ис-

ходная копия, детектируемая с помощью «меченого» зонда на структурную часть гена Km^R , сохранялась в проверенных Sm^{HR} клонах, имеющих mini-Mu(LR)-YK единицу в хромосоме (Рисунок 6).

Таблица 2 - Количество Sm^{HR} клонов, отобранных на высокой концентрации стрептомицина (0,75; 1,0 мг/мл) в результате внутримолекулярной транспозиции mini-Mu единицы в хромосоме штамма *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 в зависимости от присутствия и ориентации энхансерного элемента (E)

Sm мг/мл	Всего посеянных Sm^R клеток	mini-Mu(LR)-YK		mini-Mu(L $\overleftarrow{E}$ R)-YK		mini-Mu(LER)-YK	
		конт-роль	амплификация	конт-роль	амплификация	конт-роль	амплификация
0.75	10^5	-	13 $\pm$ 7	7 $\pm$ 5	74 $\pm$ 19	8 $\pm$ 5	415 $\pm$ 57
1.0	10^5	-	-	2 $\pm$ 1	46 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	241 $\pm$ 17

Данные этого эксперимента свидетельствуют, что обратная ориентация энхансера, $\overleftarrow{E}$, снизила частоту амплификации соответствующей mini-Mu единицы до значений, по крайней мере, в два раза ниже уровня $6,0 \pm 1,5 \times 10^{-4}$ клеток. Отсутствие же E-элемента в структуре mini-Mu(LR) уменьшило частоту Mu-зависимой внутримолекулярной репликативной транспозиции до уровня ниже 10^{-5} клеток, поскольку в экспериментах с этим типом кассеты амплификация не была выявлена, что соответствует литературным данным, полученным для *E. coli* [Lavoie and Chaconas, 1995].

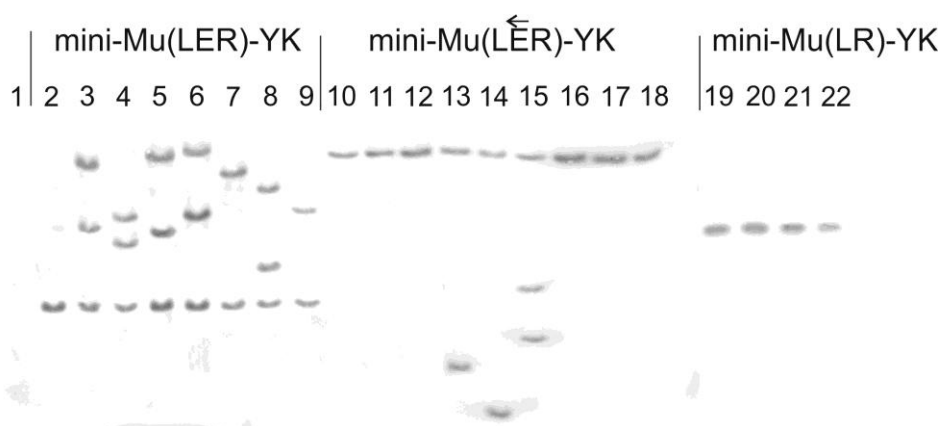


Рисунок 6 - Результаты гибридизации по Саузерну родительского штамма (1) и клонов, содержащих в хромосоме по одной копии mini-Mu(LER)-YK единицы (2), mini-Mu(L $\overleftarrow{E}$ R)-YK единицы (10), и mini-Mu(LR)-YK единицы (19), а также их производных, отобранных после амплификации при росте в условиях индукции экспрессии MuAB (3–9), (11–18) и (20–22), соответственно. Для гибридизации по Саузерну геномная ДНК отдельных клонов была выделена и обработана *Sma*I эндонуклеазой (имеет только один сайт узнавания, находящийся внутри mini-Mu, но не затрагивающий ген *kan*) и гибридизована с амплифицированным с помощью ПЦР фрагментом ДНК, содержащим ген *kan*

Однако выявленная максимальная эффективность внутрихромосомальной амплификации ($5,0 \pm 2,0 \times 10^{-3}$ клеток) оказалась на два порядка ниже эффективности образования коинтеграгов, полученных путем μ -зависимой репликативной транспозиции mini- μ (LER) единицы с уже содержащейся в клетке сверхспирализованной интегративной плазмиды в присутствии хелперной плазмиды pVK9-Gm^R-(*lacI*^Q-P_{tac}- μ AB), поскольку эффективность транспозиции в этом случае составляет $\approx 10^{-1}$ клеток.

Для выяснения причины такой разницы было проведено дополнительное исследование.

2.4 Транспозиция mini- μ единицы с «релаксированной» формы интегративной плазмиды в хромосому *C. glutamicum* ATCC 13869 – аналог внутрихромосомальной репликативной транспозиции

Помимо L/R концов и E-элемента генома бактериофага μ , шесть субъединиц μ транспозазы, а также ДНК-изгибающие белки-помощники клетки хозяина HU и сайт-специфический «integration host factor» IHF участвуют в формировании LER синапсиса [Harshey, 2014]. Когда уровень суперспирализации (σ) донорной ДНК становится низким [Surette and Chaconas, 1989], т. е. сравнимым со связанной с белками молекулой хромосомальной ДНК *in vivo* [Dillon and Dorman, 2010], хозяинский белок IHF облегчает перенос mini- μ единицы, осуществляя изгиб ДНК на E-элементе, расположенном в *cis* ориентации по отношению к L/R концам.

Кроме того, для эффективного синапсиса и формирования транспозосомы, являющегося обязательным условием инициации репликации ДНК всего генома профага μ , необходимо наличие сайта связывания с гиразой (SGS), находящегося в центре генома профага μ , даже если он содержит нативный E элемент. Связывание гиразы в SGS сайте стимулирует быстрый, эффективный синапсис L/R концов ДНК профага μ , несмотря на напряжения и ограничения, обусловленные структурой бактериального нуклеоида, делая это путем формирования суперскрученной петли, в основании которой концы профага оказываются сближены [Pato, 2004; Pato and Banerjee, 2000].

На основании этого было предположено, что, поскольку комплекс хромосомы с белками значительно уменьшает плотность суперспирализации ДНК (Dillon and Dorman, 2010), процесс транспозиции с интегративной плазмиды, находящейся в «релаксированной» форме, мог бы стать аналогом внутрихромосомальной амплификации. Действительно, зависимость эффективности транспозиции от наличия и ориентации E в составе mini- μ наблюдалась и в этом случае, причем самая высокая частота отбора интегрантов также отмечалась для плазмиды с mini- μ (LER), а самая низкая - с mini- μ (LR) (Таблица 1).

Однако электротрансформация «релаксированных» форм всех плазмид в клетку снизила эффективность транспозиции более чем на два порядка по сравне-

нию с их суперспирализованными аналогами, подтвердив сделанное предположение. Действительно, выявленная эффективность электропорации/ проникновения в штамм *C. glutamicum* ATCC 13869 суперспирализованной плазмидной ДНК была $\approx 1 \times 10^{-3}$ / (100 нг ДНК · количество выживших клеток). В то же время эффективность транспозиции (проникновение в клетку и образование коинтеграгов) с находящейся в «релаксированной» форме интегративной плазмиды с mini-Mu(LER) единицей в тот же штамм была снижена до $\approx 10^{-6}$ / (100 нг ДНК · количество выживших клеток). Таким образом, эффективность внутриклеточного образования коинтеграгов между «релаксированной» интегративной плазмидой и хромосомой *C. glutamicum* составила приблизительно 1×10^{-3} клеток. Эта оценка очень близка к экспериментально обнаруженной эффективности внутривнутриклеточной амплификации mini-Mu(LER) единицы, которая составила $\approx 3,0 \pm 1,5 \times 10^{-3}$ клеток. Совпадение частот наблюдается и в случае mini-Mu(LER) кассеты.

Формирование коинтеграта между «релаксированной» формой интегративной плазмиды с mini-Mu(LR) единицей и *C. glutamicum* хромосомой встречается в 30 раз реже, чем с той же формой интегративной плазмиды с mini-Mu(LER), однако разница в частотах внутримолекулярной транспозиции этих mini-Mu единиц была значительно выше, поскольку амплификация не была обнаружена для mini-Mu(LR) единицы в условиях проводимого эксперимента. По-видимому, сближение концов ДНК фага Му без участия E-элемента при образовании транспозосомы представляет значительно меньше трудностей для «релаксированного» плазмидного субстрата относительно небольшого размера, но является серьезной проблемой, когда в качестве субстрата выступает «частично» суперспирализованная бактериальная хромосома.

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

Поскольку в отсутствии E-элемента в составе mini-Mu единицы процесс репликативной транспозиции идет с очень низкой эффективностью в клетках *C. glutamicum*, то можно было предполагать, что удаление E элемента из состава всех интегрированных в геном *C. glutamicum* mini-Mu(LER) единиц приведет к значительному снижению внутримолекулярной транспозиции mini-Mu(LR) в присутствии не содержащей энхансер хелперной плазмиды, что позволит провести интеграцию и последующую независимую амплификацию другой mini-Mu(LER) единицы в геноме *C. glutamicum* без изменения количества и локализации первоначально интегрированных, но уже не содержащих E-элемент mini-Mu(LR). Для осуществления этой стратегии из интегранта штамма *C. glutamicum* ATCC13869, содержащего одну копию mini-Mu(LER)-УК (обозначенный 1УК), и двух его производных, полученных Му-зависимой амплификацией этой кассеты и содержащих две и три копии в хромосоме (обозначенные 2УК и 3УК, соответственно), изле-

ченных от хелперной плазмиды $pVK-lacI^Q-P_{tac}-MuAB$, была вырезана с помощью *Sce* рекомбиназы с последующим удалением хелперной плазмиды $p06-P_{dapA}-cre$ внутренняя часть *mini-Mu* транспозона, расположенная между сайтами *lox66/lox71* и включающая как *E*-элемент, так и маркеры Km^R и Sm^R . Флуоресценция, обусловленная экспрессией белка *yECitrine*, и последующие результаты гибридизации по Саузерну, полученные с использованием «метки» на структурную часть гена *yECitrine*, подтвердили сохранение количества «укороченных» копий *mini-Mu*(LR)-подобных единиц для трех $Km^S Sm^S$ производных (обозначенных 1Y, 2Y и 3Y, соответственно) (данные не показаны).

Полученные три штамма были использованы для *Mu*-зависимой интеграции с последующей амплификацией новой *mini-Mu*-(LER)-GK единицы, которая отличалась от ранее используемой *mini-Mu*-(LER)-YK тем, что содержала ген *yEGFP* вместо гена *yECitrine*.

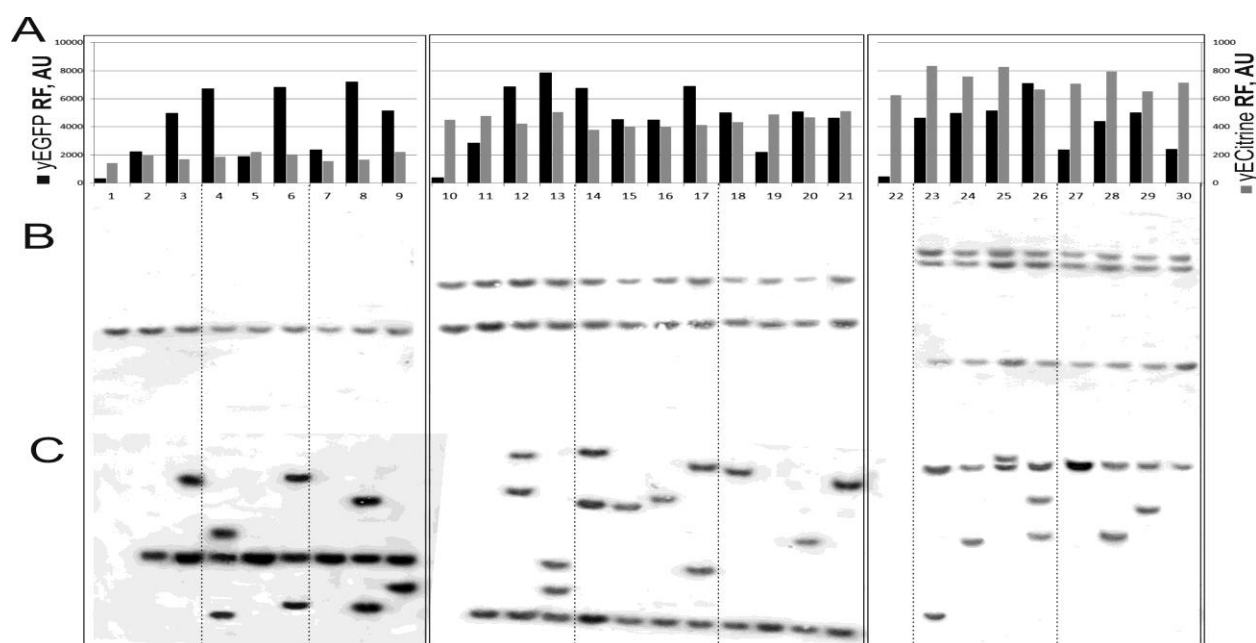


Рисунок 7- *yECitrine* и *yEGFP* удельная флуоресценция (A) и результаты гибридизации по Саузерну, используя *yECitrine* (B) или *yEGFP* (C) в качестве проб; (1) родительский штамм, содержащий одну копию *mini-Mu*(LR)-Y единицы, 1Y; (2) производный от клона 1Y, содержащий еще одну копию *mini-Mu*(LER)-GK единицы и (3–9) его производные после амплификации *mini-Mu*(LER)-GK единиц; (10) родительский штамм, содержащий две копии *mini-Mu*(LR)-Y-единиц, 2Y; (11) производный клона 2Y, содержащий еще одну копию *mini-Mu*(LER)-GK единицы и (12–21) его производные - клоны после амплификации *mini-Mu*(LER)-GK единицы; (22 нет результатов гибридизации по Саузерну - родительский штамм, содержащий три копии *mini-Mu*(LR)-Y-единиц, 3Y); (30) производный клона 3Y, содержащий еще одну копию *mini-Mu*(LER)-GK единицы и (23–29) его производные - клоны после амплификации *mini-Mu*(LER)-GK единиц. Геномную ДНК обрабатывали *SphI* эндонуклеазой. *SphI* эндонуклеаза имеет уникальный сайт узнавания в структуре *mini-Mu* единицы, который не затрагивает *yECitrine* *yEGFP*; позиция и количество исходных копий *mini-Mu*(LR)-Y единиц сохраняются при внутримолекулярной амплификации *mini-Mu*(LER)-GK единиц

Представленные результаты относительной флуоресценции, обусловленной экспрессией белков уECitrine и уEGFP, а также гибридизации по Саузерну с пробами на гены уECitrine и уEGFP (Рисунок 7) подтверждают, что интеграция и последующая амплификация, приводящая к трем копиям mini-Mu(LER)-GK единицы в хромосоме выбранного штамма – реципиента, была успешно реализована, и двойные *C. glutamicum* интегранты были получены. Более того, позиции на хромосоме mini-Mu(LR)-Y кассет в ходе Mu-зависимой внутрихромосомальной амплификации mini-Mu(LER)-GK единиц были сохранены (зафиксированы).

4. Универсальность метода Mu-зависимой транспозиции для *C. glutamicum*.

Новый интегративный вектор

С помощью той же двухплазмидной системы была продемонстрирована репликативная Mu-зависимая транспозиция в хромосому широко исследуемого в лабораторных условиях штамма дикого типа *C. glutamicum* ATCC13032 и его производного MB001 [Baumgart et al., 2013]. Сравнительный анализ частот электропорации реплицирующейся в клетке плазмиды и эффективности транспозиции выявил, что аналогично исследованному в данной работе штамму *C. glutamicum* ATCC13869 эффективность переноса с уже находящейся в клетках интегративной плазмиды в хромосому штаммов *C. glutamicum* ATCC13032, MB001 в эксперименте Mu-зависимой транспозиции составляет $\approx 10^{-1}$ клеток (Таблица 3).

Таблица 3 – Частота электротрансформации способной к автономной репликации плазмиды и эффективность Mu-зависимой транспозиции плазмиды рАН-mini(LER) в клетках *C. glutamicum* штаммов

	Частота электротрансформации/100 нг ДНК/число выживших клеток	Эффективность интеграции/100 нг ДНК/число выживших клеток
ATCC13032	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$\sim 0,8 \cdot 10^{-7}$
MB001	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$\sim 2 \cdot 10^{-6}$
ATCC13869	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$

В целях использования системы Mu-зависимой транспозиции в качестве полезного инструмента для модификации хромосомы не только *C. glutamicum*, но и других организмов, была сконструирована более удобная интегративная плаزمида рАН-mini-Mu(LER)-YS (Рисунок 8). Маркер Km^R может быть использован для отбора коинтеграторов на этой плазмиде, при этом экспрессия *Bacillus subtilis* гена *sacB* облегчает отбор *C. glutamicum* «резолвантов» на среде, содержащей сахарозу (15-30% «резолвантов» было отобрано в этом эксперименте в сравнении с 1-3% при использовании плазмиды рАН-mini-Mu(LER)-YK [Gorshkova et al., 2017]). Маркер Sm^R, входящий в состав mini-Mu единицы на новой плазмиде, можно использовать как для прямого отбора интегрантов, так и для последующей селекции

внутрихромосомальной амплификации mini-Mu(LER) единицы, а наличие гена *yECitrine* помогает осуществить количественную оценку полученного числа копий mini-Mu в отобранных Sm^{HR} клонах флуоресцентным методом анализа. Все ДНК-элементы, способствующие проведению и отбору транспозиции (E, Sm^R и *yECitrine*), фланкированы *lox66/lox71*-сайтами, и могут быть удалены из встроенной в хромосому mini-Mu единицы с помощью Cre рекомбиназы фага P1 с сохранением только небольшой, не содержащей маркера, части интегративной плазмиды с целевым геном в хромосоме.

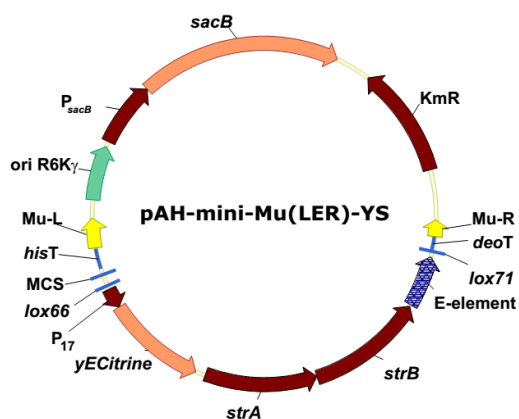


Рисунок 8 - Схема новой интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(LER)-YS (GenBank AN. MG014200)

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

Для демонстрации универсального характера новая стратегия, базирующаяся на различиях в эффективности внутрихромосомальной репликативной транспозиции mini-Mu(LER) и mini-Mu(LR) единиц, была применена к ранее изученной метилотрофной бактерии *Methylophilus methylotrophus* AS1.

Эксперимент проводили с использованием сконструированной для данной работы интегративной плазмиды pAH-mini-Mu(LER) (Рисунок 1) и ранее сконструированной на базе вектора pRK310 IncPα-группы, не содержащей энхансер хелперной плазмиды p17TP310, экспрессия MuAB с которой осуществлялась под контролем конститутивного *M. methylotrophus* промотора P_{17Mme} (Рисунок 9) [Токмакова, 2010; Akhverdyan et al., 2011].

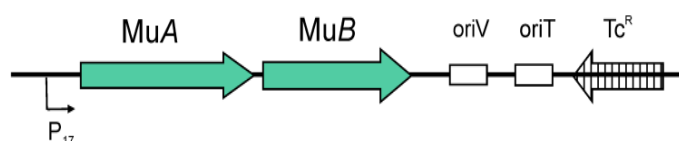


Рисунок - 9 - Схематическое изображение хелперной плазмиды p17TP310 (E-minus), производной плазмиды pRK310 IncPα-группы (Ditta et al., 1985), имеет репликон (*oriV*), экспрессия MuA MuB генов находится под контролем конститутивного промотора P_{17Mme} (Abalakina et al., 2008)

Для вырезания ДНК фрагмента mini-Mu транспозона, фланкированного lox66/lox71 последовательностями, с целью преобразования *in vivo* интегрированных в хромосому *M. methylotrophus* AS1 mini-Mu(LER) единиц в mini-Mu(LR) дополнительно была сконструирована плазмида pT-P_{lac}-cre на базе вектора IncPa группы pRK310 [Ditta et al., 1985], в составе которой экспрессия гена, кодирующего Cre-рекомбиназу фага P1, осуществлялась под контролем P_{lac} промотора.

Интеграцию, а затем амплификацию mini-Mu(LER)-GK транспозона проводили в условиях индукции факторов транспозиции согласно ранее разработанной методике [Токмакова, 2010]. Результаты подтверждали генетическими методами, измерением флуоресценции и Саузерн-гибридизацией. После Cre-зависимого вырезания ДНК-фрагментов с маркерами устойчивости к антибиотикам и энхансерной областью из хромосомы клонов, отобранных на высокой концентрации стрептомицина (2 мг/мл) и содержащих одну или две копии mini-Mu(LER)-GK единицы в геноме, по той же схеме была последовательно осуществлена интеграция и амплификация новой mini-Mu(LER)-YK единицы. Количество содержащихся в хромосоме копий генов *yEGFP* и *yECitrine* в случайно отобранных клонах предварительно оценивали, регистрируя уровни удельной флуоресценции *yEGFP* и *yECitrine* (Рисунок 10А) и подтверждали ДНК-гибридизацией по Саузерну с пробами на гены *yECitrine* и *yEGFP* (Рисунок 10Б).

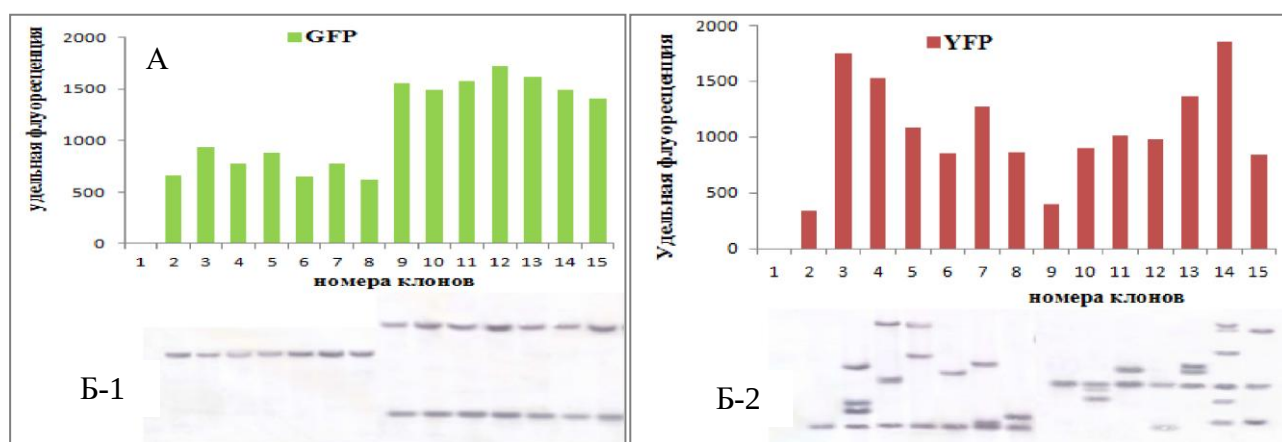


Рисунок 10 - Удельная флуоресценция *yEGFP* и *yECitrine* (А) и результаты гибридизации по Саузерну клонов *M. methylotrophus* AS1, содержащих в хромосоме копии mini-Mu(LR)-G и mini-Mu(LER)-YK транспозонов одновременно, используя *yEGFP* (Б-1) или *yECitrine* (Б-2) в качестве проб, (1) *M. methylotrophus* AS1 дикий штамм; (2) производный клон 1G, содержащий одну копию mini-Mu(LR)-G единицы и еще одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы, и (3–8) его производные после амплификации mini-Mu(LER)-YK единиц; (9) производный клон 2G, содержащий две копии mini-Mu(LR)-G-единиц и еще одну копию mini-Mu(LER)-YK единицы, и (10–15) его производные - клоны после амплификации mini-Mu(LER)-YK единицы; геномную ДНК обрабатывали *SphI* эндонуклеазой; *SphI* эндонуклеаза имеет уникальный сайт узнавания в структуре mini-Mu единицы, который не затрагивает *yECitrine* и *yEGFP*; позиция и количество исходных копий mini-Mu(LR)-G единиц сохраняются при внутримолекулярной амплификации mini-Mu(LER)-YK единиц

Было установлено, что в результате Mu-зависимой внутрихромосомальной транспозиции количество копий mini-Mu(LER)-YK единиц увеличилось до 2-5 на геном *M. methylotrophus* AS1, в то время как количество и позиции первоначально интегрированных mini-Mu(LR)-G единиц сохранились, что подтверждает универсальный характер разработанной стратегии. Отмечалась корреляция между регистрируемым в клетках уровнем флуоресценции yEGFP, yECitrine и числом копий yEGFP, yECitrine генов в хромосоме.

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

Используя описанные выше конструкции хелперной и интегративной плазмиды, был продемонстрирован Mu-зависимый перенос mini-Mu(LER)-GK единицы в хромосому еще одной метилотрофной бактерии *M. extorquens* AM1, эффективность которого составила 50-100 колоний на 1 мкг плазмидной ДНК, что было подтверждено генетическим и спектрофлуорофотометрическим методами анализа для восьми случайно выбранных клонов (Рисунок 11). Полученные результаты свидетельствуют о том, что белки *M. extorquens* AM1 способны выполнять функции своих аналогов из клеток *E. coli* на всех стадиях репликативной транспозиции mini-Mu. Это позволяет использовать Mu-зависимую транспозицию для интеграции рекомбинантной ДНК в бактериальный геном *M. extorquens* AM1 в практических целях.

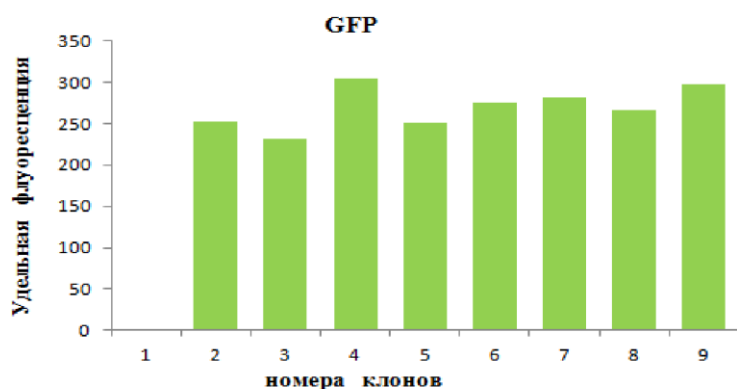


Рисунок 11 -Значения удельной флуоресценции yEGFP клонов *M. extorquens* AM1, отобранных при первичной интеграции mini-Mu(LER)-GK транспозона в хромосому: клон 1 - исходный штамм *M. extorquens* AM1; клоны 2-9 - первичные интегранты

ВЫВОДЫ

1. Му-зависимая система интеграции/амплификации рекомбинантной ДНК в бактериальную хромосому, разработанная ранее для *E. coli* и некоторых других грамотрицательных бактерий (например, *Methylophilus methylotrophus* AS-1), была модифицирована и впервые использована для интеграции mini-Mu элементов ДНК в геном трех штаммов грамположительной *Corynebacterium glutamicum* с последующей их амплификацией и фиксацией положения в геноме. Эта система включает три рекомбинантные плазмиды:

- «хелперную», обеспечивающую экспрессию генов MuAB факторов транспозиции, способную к автономной репликации в клетках *C. glutamicum*, но удаляемую из популяции в неселективных условиях культивирования (в отсутствии антибиотика);
- «интегративную», с условно зависимой (*oriR6Kγ*) репликацией, содержащую mini-Mu(LR) элемент, т.е., фланкированный L и R концами ДНК фага Mu интегрируемый ген и селективные маркеры, или mini-Mu(LER) – элемент, содержащий дополнительно энхансер E, причем E введен так, что практически весь mini-Mu(LER) элемент за исключением целевого гена с флангами MuL/R может быть удален Cre-рекомбиназой фага P1 в результате сайт-специфической рекомбинации между локусами *lox66/lox71* с формированием *lox72* сайта;
- «хелперную», обеспечивающую экспрессию гена *cre* фага P1, способную к автономной репликации в клетках *C. glutamicum*, но утрачивающуюся в неселективных условиях культивирования (в отсутствии антибиотика).

2. Показано, что при электротрансформации клеток *C. glutamicum*, содержащих «хелперную» плазмиду с экспрессирующимися генами MuAB, «интегративной» плазмидой может происходить интеграция mini-Mu элемента в хромосому бактериальной клетки в основном (более 95% случаев) по механизму репликативной транспозиции с образованием коинтеграта и возможным последующим его RecA-зависимым разрешением. При этом частота интеграции зависит от штамма-реципиента, оптимизированных условий электротрансформации и составляет в типичных экспериментах $\approx 2 \cdot 10^{-4}$ на клетку штамма ATCC13869.

3. В качестве маркеров отбора первичной интеграции и амплификации использовались гены устойчивости к канамицину (Km^R) и стрептомицину (Sm^R), соответственно, введенные в состав mini-Mu(LR)- или mini-Mu(LER)-элемента интегративной плазмиды. Для простоты отбора клонов, содержащих желаемое количество копий mini-Mu(LER)-элемента в бактериальной хромосоме, эффективно были использованы гены *yECitrine* и *yEGFP*, кодирующие желтый и зеленый флуоресцентные белки.

4. Показано, что эффективность репликативной транспозиции mini-Mu(LER) элемента в присутствии факторов MuAB в клетках коринебактерий зави-

сит от присутствия и ориентации E, а при его наличии эффективность существенно выше, чем для mini-Mu(LR) элемента, особенно при амплификации *in vivo* в хромосоме, имеющей сниженную плотность суперспирализации вследствие взаимодействия с клеточными белками. Последнее наблюдение позволило реализовать стратегию фиксации интегрированных и амплифицированных mini-Mu(LER) элементов в результате Cre-зависимого вырезания *in vivo* их E-содержащих ДНК фрагментов с преобразованием их в mini-Mu(LR) элементы, практически неспособных к дальнейшей амплификации в используемых экспериментальных условиях. Возможности разработанной системы продемонстрированы на примере созданных штаммов, содержащих различное количество копий mini-Mu элементов с генами флуоресцентных белков, тестируемых генетическими методами, флуоресценцией и Саузерн-гибридизацией.

5. Ранее разработанная система интеграции/амплификации mini-Mu элементов в хромосому грамотрицательного *Methylophilus methylotrophus* AS-1 была дополнена новыми элементами для реализации стратегии преобразования интегрированных mini-Mu(LER) элементов в mini-Mu(LR) за счет Cre-зависимого вырезания E-содержащего фрагмента ДНК и, тем самым, фиксации укороченной кассеты в месте ее интеграции. Кроме того, полноразмерная система Mu-зависимого редактирования бактериального генома была успешно адаптирована к еще одному представителю метилотрофов – *Methylobacterium extorquens* AM1, представляющему интерес для использования в качестве реципиента в промышленно ориентированных исследованиях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Абалакина Е.Г., Токмакова И.Л., **Горшкова Н.В.**, Смирнов С.В., Ахвердян В.З., Машко С.В., Йомантас Ю.В. Использование системы транспозиции бактериофага Му для интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *Methylophilus methylotrophus* // Биотехнология. – 2008. – №. 3. – С. 13-26.
2. Токмакова И.Л., Абалакина Е.Г., **Горшкова Н.В.**, Йомантас Ю.В. Способ придания бактерии, принадлежащей к роду *Methylophilus*, ауксотрофности по L-аминокислоте. // Патентная заявка РФ №2007111371. – 28.03.2007.
3. Abalakina E.G., Tokmakova I.L., **Gorshkova N.V.**, Gak E.R., Akhverdyan V.Z., Mashko S.V., Yomantas Y.A.V. Phage Mu-driven two-plasmid system for integration of recombinant DNA in the *Methylophilus methylotrophus* genome // Applied microbiology and biotechnology. – 2008. – V. 81. – №. 1. – P. 191-200.
4. Yomantas Y. V., Tokmakova I.L., **Gorshkova N.V.**, Abalakina E.G., Kazakova S.M., Gak E.R., Mashko S.V. Aromatic amino acid auxotrophs constructed by recombinant marker exchange in *Methylophilus methylotrophus* AS1 cells expressing the *aroP*-encoded transporter of *Escherichia coli*. // Applied and environmental microbiology. – 2010. – V. 76. – №. 1. – P. 75-83.
5. Mashko S., Stoyanova N., Zakataeva N., Smirnov S., Krylov A., Altman I., Geraskina N., **Gorshkova N.**, Igonina O., Kozaeva E., Kramor R., Malykh E., Samsonov V., Savrasova E., Sycheva E., Tokmakova I., Yampolskaya T. Combination of novel technologies with traditional metabolic engineering strategies for microbial production of amino acids and related desirable chemicals.// IMES Metabolic Engineering 12 (June 24th – 28th, 2018, Munich, Germany). Poster # 306, Abstr. p. 173.
6. **Gorshkova N.V.**, Lobanova J.S., Tokmakova I.L., Smirnov S.V., Akhverdyan V.Z., Krylov A.A., Mashko S.V. Mu-driven transposition of recombinant mini-Mu unit DNA in the *Corynebacterium glutamicum* chromosome // Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – V. 102. – №. 6. – P. 2867-2884.