

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

*Бубнов*

**Бубнов Дмитрий Михайлович**

**ИНСТРУМЕНТЫ ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ *ESCHERICHIA*  
*COLI* И ДРУГИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА  
*ENTEROBACTERIALES***

**Специальности: 1.5.11. Микробиология**

**1.5.6. Биотехнология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание учёной степени**

**кандидата биологических наук**

Москва - 2023

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Нетрусов Александр Иванович**  
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Манухов Илья Владимирович**,  
доктор биологических наук, ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Физтех-школа физики и исследований имени Л.Д. Ландау, лаборатория молекулярной генетики, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией  
**Дорошенко Вера Георгиевна**,  
доктор биологических наук, доцент, Акционерное общество «Научно-исследовательский Институт Аджиномото-Генетика», лаборатория 1, старший научный сотрудник  
**Калёбина Татьяна Сергеевна**, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится <<12>> декабря 2023 года в 15 ч 30 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

Тел: 8(495)-939-35-46, электронная почта: [nvkostina@mail.ru](mailto:nvkostina@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2774>

Автореферат разослан <<09>> ноября 2023 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Прогресс последних десятилетий в разработке инструментов геномной инженерии и исследовании механизмов жизнедеятельности клетки *Escherichia coli* сделал возможными работы по глубокому изменению биологии этого организма в результате обширной модификации нативных систем и привнесения новых функций. Так, в качестве примера можно привести цикл работ, в результате которых путём внесения направленных модификаций и лабораторной эволюции были созданы штаммы *E. coli*, способные, подобно автотрофным организмам, получать весь углерод в ходе ассимиляции CO<sub>2</sub> в восстановительном пентозофосфатном пути (Antonovsky et al., 2016; Gleizer et al., 2019; Flamholz et al., 2020). Выполнение таких исследований требует наличия удобных и эффективных инструментов, предназначенных для привнесения гетерологичных метаболических путей и интеграции контролируемых их крупных кластеров в бактериальный геном. Вместе с тем, основной инструмент инженерии генома *E. coli*, система гомологичной рекомбинации Red бактериофага λ, по литературным данным, не позволяет интегрировать фрагменты ДНК длиной более ~4,0 т.п.н. (Kuhlman et al., 2010; Maresca et al., 2010), что вынуждает использовать более сложные в техническом исполнении и трудоёмкие стратегии, комбинирующие Red и внесение разрыва в сайт интеграции с помощью CRISPR/Cas9 (Jiang et al., 2015; Pyne et al., 2015; Chung et al., 2017; Reisch et al., 2017) или хоминг-эндонуклеазы I-SceI (Kuhlman et al., 2010).

Несмотря на то, что в последнее десятилетие внимание исследователей обращено на систему CRISPR-Cas9, технологии на основе Red рекомбинации всё ещё имеет незадействованный потенциал. Так, обычно для манипуляций хромосомой при посредстве λRed используют интегративные кассеты, содержащие ген устойчивости к антибиотикам и маркер негативной селекции (Bird et al., 2011; Li et al., 2013; Khetrapal et al., 2015; Miyazaki, 2015). Последний обычно рассматривают как вспомогательный элемент, предназначенный только для удаления и последующего повторного использования маркера устойчивости и конструирования «бесшрамовых» мутаций. Вместе с тем, эффективная негативная селекция могла бы позволить удалять интегративную кассету с одновременной интеграцией любой синтетической конструкции путём отбора рекомбинантов, выживающих в селективных условиях. Такой подход комбинирует этап удаления маркера с доставкой целевых конструкций в хромосому, в значительной степени упрощая и ускоряя получение рекомбинантных штаммов. Эта стратегия была бы более простой и надёжной по сравнению Cas9-методами, поскольку она основана только на Red-рекомбинации как хорошо зарекомендовавшей себя и надёжной технологии. В связи с этим не возникает необходимости

оптимизировать условия эксперимента и конструировать вектора, экспрессирующие уникальные gRNA для каждого целевого локуса. Наконец, применение эффективной стратегии негативной селекции предоставило бы удобную возможность для конструирования нескольких мутаций параллельно с их последующей комбинацией трансдукцией фагом P1 (Li et al., 2013; Khetrapal et al., 2015). Единственным недостающим компонентом предложенного подхода является стратегия негативной селекции, которая обеспечивала бы отбор строгий настолько, что он позволил бы различить редких рекомбинантов среди множества спонтанных мутантов, выживающих в селективных условиях. В связи с этим, настоящая работа была посвящена разработке нового достаточно эффективного метода негативной селекции и сопутствующих элементов, необходимых для реализации описанной выше стратегии интеграции в геном *Escherichia coli*, а также адаптации этих инструментов для работы с немодельными представителями порядка *Enterobacteriales*.

**Цель работы:** создание инструментов для интеграции немаркированных конструкций в геном *Escherichia coli* и других представителей порядка *Enterobacteriales* на основе системы Red рекомбинации бактериофага  $\lambda$ .

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Разработка стратегии негативной селекции, функционирующей независимо от генотипа штамма и обладающей предельно возможной эффективностью;
2. Создание на основе новой стратегии негативной селекции и Red-рекомбинации технологии интеграции в геном *Escherichia coli* протяженных конструкций, не содержащих селективных маркеров;
3. Адаптация технологии интеграции для использования в работе с немодельными представителями порядка *Enterobacteriales*.

### **Научная новизна работы**

В ходе настоящей работы на основе ориджина pMB1 был сконструирован репликон, активность которого подавляется в присутствии изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида, что позволяет стабильно поддерживать его или удалять из клеток, изменяя состав питательной среды. Было показано, что оптимизация процедуры  $\lambda$ Red-зависимой интегративной трансформации позволяет достичь частоты рекомбинации, достаточной для конструирования коротких делеций и инсерций в хромосоме *Escherichia coli* без использования прямой или негативной селекции. Для интеграции протяженных немаркированных фрагментов ДНК была разработана стратегия негативной селекции с использованием системы, состоящей из промоторов P<sub>L</sub> и P<sub>R</sub> бактериофага  $\lambda$ , репрессора CI, гена устойчивости к хлорамфениколу *cat*

и токсина Нок. Показано, что эффективность маркера *cl-hok*, выраженная как величина, обратная скорости возникновения спонтанных мутаций, позволяющих клеткам выживать в селективных условиях, достигает предельно возможных значений. Было показано, что основным фактором, ограничивающим эффективность интеграции протяжённых конструкций, синтезированных с помощью ПЦР, является эндонуклеаза EcoKI, разрушающая неметилированную ДНК в цитоплазме клеток, несущих дикий аллель *hsdR*. Впервые было продемонстрировано, что это ограничение может быть снято в результате коэкспрессии генов Red и антирестрикционной функции Ocr бактериофага T7, что позволило интегрировать немаркированные фрагменты ДНК длиной 6-8 т.п.н. в произвольные локусы хромосомы путём отбора рекомбинантов, потерявших маркер *cl-hok*. Было показано, что негативная селекция *cl-hok* и Red-рекомбинация при посредстве Ocr полностью функциональны не только в *Escherichia coli*, но и в других представителях порядка *Enterobacteriales*, а именно *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii* и *Pantoea ananatis*.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Созданная в ходе настоящей работы технология интеграции в бактериальную хромосому при помощи негативной селекции *cl-hok* и Ocr-опосредованной Red-рекомбинации может быть использована в широком круге задач, подразумевающих внесение в геном протяженных фрагментов ДНК, кодирующих гетерологичные метаболические пути и другие функции, контролируемые жизнедеятельность и фенотип клетки. К таким задачам можно отнести создание штаммов-продуцентов органических соединений; клонирование крупных кластеров генов в геном модельного объекта и их функциональный анализ в гетерологичном генетическом окружении; создание штаммов, обладающих исходно несвойственными им метаболическими возможностями, например, способностью расти на новых субстратах или разрушать ксенобиотики. Высокая эффективность негативной селекции *cl-hok* позволяет использовать этот маркер для исследования стабильности поддержания эписом в клетке или изучения нестабильности и эволюции генома в результате спонтанных структурных перестроек. Независимость созданной технологии от специфических клеточных функций, в частности систем метилирования и рестрикции, и функциональность в ряде энтеробактерий потенциально позволяет адаптировать её для исследования биологии клинически релевантных микроорганизмов, принадлежащих к порядку *Enterobacteriales*, таким как *Klebsiella*, *Shigella* или *Yersinia*.

### **Объект и предмет исследования**

Объектом исследования служили *Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* LT2, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 и *Pantoea ananatis* SC17(0), тогда как предметом исследования была разработка инструментов интеграции в геном данных микроорганизмов.

## Методология диссертационного исследования

В работе были использованы стандартные методы работы с культурами микроорганизмов и бактериофагов, а также методы молекулярного клонирования.

**Личный вклад** автора заключается в выборе направлений исследования, дизайне, планировании и выполнении экспериментов, анализе и интерпретации результатов, написании статей и представлении результатов работы на конференциях.

**Степень достоверности полученных данных** подтверждается использованием современных общепринятых экспериментальных методик, актуальных методов анализа и статистической обработки данных.

### Положения, выносимые на защиту

1. Негативная селекция на основе двухпромоторной системы  $P_L/P_R$ , её репрессора  $CI$ , гена устойчивости к хлорамфениколу и токсина Нок чрезвычайно устойчива к возникновению спонтанных мутантов, выживающих в селективных условиях. Высокая эффективность селекции достигается благодаря подавлению роста спонтанных  $cI$  мутантов в результате дерепрессии Нок.
2. Фрагментация ДНК в цитоплазме эндонуклеазой  $EcoKI$  в значительной степени препятствует интеграции протяжённых неметилированных конструкции в хромосому *Escherichia coli*. Подавление активности  $EcoKI$  в результате коэкспрессии антирестрикционной функции  $Osc$  фага T7 и генов Red увеличивает частоту рекомбинации более, чем на три порядка.
3. Негативная селекция  $cI-hok$  в сочетании с  $Osc$ -опосредованной Red-рекомбинацией позволяет интегрировать немаркированные фрагменты ДНК, синтезированные с помощью ПЦР и содержащие целые опероны, в произвольные локусы хромосомы, а также переносить немаркированные локусы между штаммами с помощью  $P1$ -трансдукции.
4. Технология интеграции с помощью негативной селекции  $cI-hok$  и  $Osc$ -опосредованной Red-рекомбинации универсальна и позволяет работать не только с *Escherichia coli*, но и с другими представителями порядка *Enterobacteriales*.

### Апробация работы

Результаты диссертационного исследования были представлены на XX Зимней молодёжной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Рощино, 2018) и Школе-конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике» (Москва – Пушкино, 2018).

## Публикации

Результаты работы изложены в 3 статьях в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах Scopus и Web of Science. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

## Объём и структура диссертации

Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список литературы», «Приложения». Работа изложена на 153 страницах, содержит 5 таблиц, 29 рисунков и приложение. Список литературы включает 185 источников.

## Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Нетрусову А. И. за помощь в подготовке диссертации. Автор признателен другу и наставнику к.б.н. Юзбашеву Т. В. за переданный опыт. Автор благодарен д.б.н. Синеокому С. П. и Выборной Т. В. за помощь в материальном обеспечении исследования, а также Степановой А. А., Кудине М. Д., Ханфёрову А. Ю. и Хозову А. А. за помощь в выполнении работы. Автор признателен д.б.н. Завигельскому Г. Б., к.б.н. Крылову А. и Мартьянову С. В. за предоставление штаммов и генетических конструкций. Автор выражает глубокую благодарность Звонарёвой Е. С. за участие и поддержку.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Введение.** Во введении обосновывается актуальность темы исследования, а также формулируется цель и задачи исследования.

**Обзор литературы** включает описание истории изучения системы Red рекомбинации фага  $\lambda$  в контексте исследования механизмов гомологичной рекомбинации в клетке *Escherichia coli*. Рассматриваются свойства компонентов Red – белков Gam, Vet и E<sub>хо</sub>, а также возможные механизмы Red рекомбинации и роль этой системы в жизненном цикле фага  $\lambda$ . Последняя часть обзора посвящена описанию методов инженерии бактериального генома с использованием Red и их ограничениям.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Бактериальные штаммы

Все штаммы *E. coli*, использованные в работе, были сконструированы на основе MG1655 (Blattner et al., 1997) с помощью Red рекомбинации (Datsenko et al., 2000; Bubnov et al., 2022) и трансдукции фагом P1<sub>vir</sub> (Thomason et al., 2007).

## Среды и реагенты

Для культивирования *Escherichia coli* использовали среду LB. При необходимости в среду вносили ампициллин, хлорамфеникол, канамицин, гентамицин, стрептомицин, спектиномицин. Среду, селективную по отношению к клеткам, несущим маркеры *cl-hok* и *rpsL*, готовили путём добавления в LB хлорамфеникола и стрептомицина, соответственно. Мутантов, потерявших функциональный *sacB*, отбирали на среде SuLB (LB без NaCl с добавлением сахарозы до 60 г/л). Способность к утилизации сахаров тестировали на среде LB с добавлением 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида и соответствующего углевода. Прямую селекцию рекомбинантов, способных к утилизации углеводов проводили на минимальной среде M9.

### $\lambda$ Red-зависимая интегративная трансформация

Компетентные клетки растили в 10 мл LB с необходимыми антибиотиками до OD<sub>600</sub> 0,3–0,4, после чего индуцировали экспрессию генов Red добавлением L-рамнозы или IPTG в течение 20-25 минут. Затем клетки осаждали, дважды промывали деионизированной водой и ресуспендировали в объёме деионизированной воды, составляющем 1/100 от исходного объёма культуры. Интегративные кассеты получали с помощью ПЦР или в результате обработки плазмидной ДНК эндонуклеазами рестрикции. Фрагменты ДНК осаждали этанолом, очищали с помощью препаративного гель-электрофореза и определяли концентрацию, после чего аликвоты хранили при -20°C. Кассеты *cat-sacB*, *rpsL-cat* и *cl-hok* трансформировали в 50 мкл электрокомпетентных клеток, экспрессирующих гены Red. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл LB и инкубировали в течение 2,5 часов перед высевом на селективную среду. Структуру рекомбинантного локуса тестировали при помощи ПЦР с колоний. В ПЦР использовали две пары праймеров, продукт для каждой из которых покрывал область стыка между последовательностью хромосомы и интегрированного фрагмента.

### Интеграция посредством негативной селекции *cl-hok* и идентификация рекомбинантов

Клетки, несущие кассету *cl-hok* и экспрессирующие гены Red, трансформировали 0,4–1 мкг фрагмента ДНК, после чего ресуспендировали в LB и растили в течение 6-18 часов. Рекомбинантов отбирали на среде LB с хлорамфениколом. При необходимости, в среду дополнительно вносили компоненты, необходимые для развития фенотипов, опосредованных оперонами *scrKYABR* (сахароза и 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид), *viaABCDE* (IPTG) и *luxCDABE* (L-арабиноза). Рекомбинантов, которые приобрели оперон P<sub>H207</sub>-*trpE*<sup>S40F</sup>*DCBA*, отбирали на среде с хлорамфениколом и глюкозой. Во всех экспериментах по меньшей мере семь колоний, проявляющих искомый фенотип, рассеивали, выделяли отдельные клоны и тестировали их с помощью ПЦР на наличие мутации в целевом локусе.



## **Измерение скорости возникновения спонтанных мутаций, позволяющих клеткам выживать в условия негативной селекции**

Скорость мутирования маркеров измеряли с помощью флуктуационного анализа. Спонтанных мутантов, потерявших маркеры *cl-hok*, *rpsL* и *sacB* отбирали на средах, перечисленных в разделе «Среды и реагенты». Скорость возникновения спонтанных мутаций рассчитывали с использованием частот мутантов в параллельных культурах с помощью метода максимального правдоподобия Ма-Сандри-Саркара (Sarkar et al., 1992). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FluCalc (Radchenko et al., 2018).

### **Статистическая обработка результатов**

Для проверки равенства средних двух выборок использовали двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента с неравными дисперсиями. Для оценки точности измерения отношения двух величин использовали 95% доверительный интервал Клоппера-Пирсона для пропорции. Доверительные интервалы для значений скорости возникновения спонтанных мутаций определяли как описано в (Foster, 2006).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Создание вспомогательных конструкций для экспрессии генов Red**

Ключевой составляющей элемент технологии редактирования генома на основе Red-рекомбинации – генетические конструкции, служащие для экспрессии генов  $\gamma$ ,  $\beta$  и *exo* фага  $\lambda$  в бактериальной клетке. С этой целью используют конструкции двух типов – дефектный профаг  $\lambda$ , интегрированный в хромосому (Ellis et al., 2001), и автономные вспомогательные плазмиды (Datsenko et al., 2000; Murphy, 2016). В отличие от профага, плазмиды могут быть легко введены в клетки любого целевого штамма. Вместе с тем, возможность легко удалить их из клетки требует использования специальных мутантных ориджинов репликации, активность которых зависит от температуры культивирования. Их стабильная репликация возможна только при 30°C, в результате чего для поддержания плазмиды в клетках их нужно культивировать при перmissive температуре, при которой скорость роста культуры снижается в ~1,5 раза (Herendeen et al., 1979). По этой причине существенно увеличивается длительность всех манипуляций, особенно, если исходный штамм имел сниженную жизнеспособность и скорость роста. Поэтому первой задачей настоящей работы было конструирование плазмидного вектора, репликация которого находилась бы под контролем других внешних факторов.

Для конструирования вектора был выбран ColE1-подобный ориджин широко распространенного вектора pBR322. Известно, что наличие вблизи от точки начала репликации сильного конститутивного промотора, сонаправленного с ингибирующим репликацию транскриптом RNAI, снижает

число копий плазмиды в клетке и её стабильность (Stueber et al., 1982; Kwon et al., 1998). Для того, что проверить эту гипотезу, был использован экспрессионный вектор pQE30, несущий ориджин pBR322, гены устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу *bla* и *cat*, и сильный искусственный промотор  $P_{T5/lacO}$ , активность которого находится под контролем хромосомной копии гена *lacI*. Между промотором и ориджином располагаются два терминатора транскрипции –  $T(0)$  и  $T_{rrnB}$ . Для того, чтобы проверить, может ли активность промотора влиять на стабильность репликации, участок ДНК, содержащий оба терминатора и *cat*, был удален. В результате этого на полученной конструкции pQEΔT промотор  $P_{T5/lacO}$  был помещен на расстоянии ~300 п.н. от 3'-конца транскрипта RNAPII, инициирующего репликацию.

Исследование стабильности полученной конструкции в штамме XL1 Blue показало, что в присутствии 1 mM IPTG в среде после одного пассажа на твёрдой среде колонии содержали менее 20 несущих плазмиду клеток среди  $\sim 10^7$  общего количества, тогда как в результате пересева на среде без IPTG плазмиду теряли менее 5% клеток, составляющих колонию. Таким образом, стабильность pQEΔT можно легко контролировать, варьируя состав питательной среды.

На основе pQEΔT была получена конструкция pDL17 для экспрессии генов Red (рис. 1). Помимо ингибируемого IPTG ориджина репликации она содержит оперон *γβex* под контролем терминатора  $T_{rrnB}$  и промотора  $P_{rhaB}$ , индуцируемого L-рамнозой, а также активаторы этого промотора – *rhaS* и *rhaR* (Egan et al., 1993).

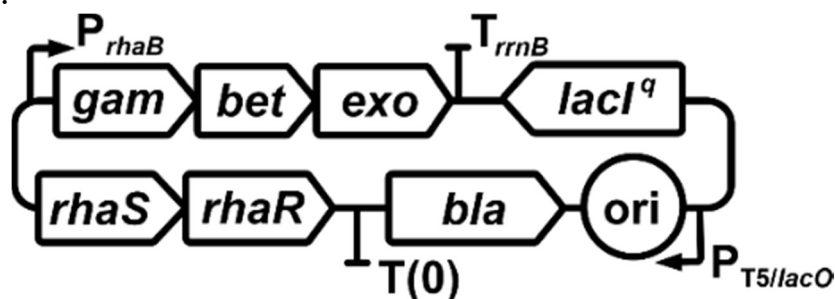


Рисунок 1. Схематическая карта pDL17.

Эффективность интеграции в хромосому клеток, несущих pDL17, была измерена путём интеграции гена устойчивости к хлорамфениколу *cat* в гены *galk*, *araB* и *lacZ*. Для сравнения использовали широко распространённую вспомогательную плазмиду pKD46 и штамм B1310, содержащий дефектный ( $\Delta$ *cro-bio*) профаг  $\lambda$ . Из результатов этого эксперимента следовало, что pDL17 и профаг обеспечивают приблизительно равную эффективность рекомбинации (рис. 2). При этом она была значительно выше по сравнению со значениями, полученными в экспериментах с MG1655[pKD46].

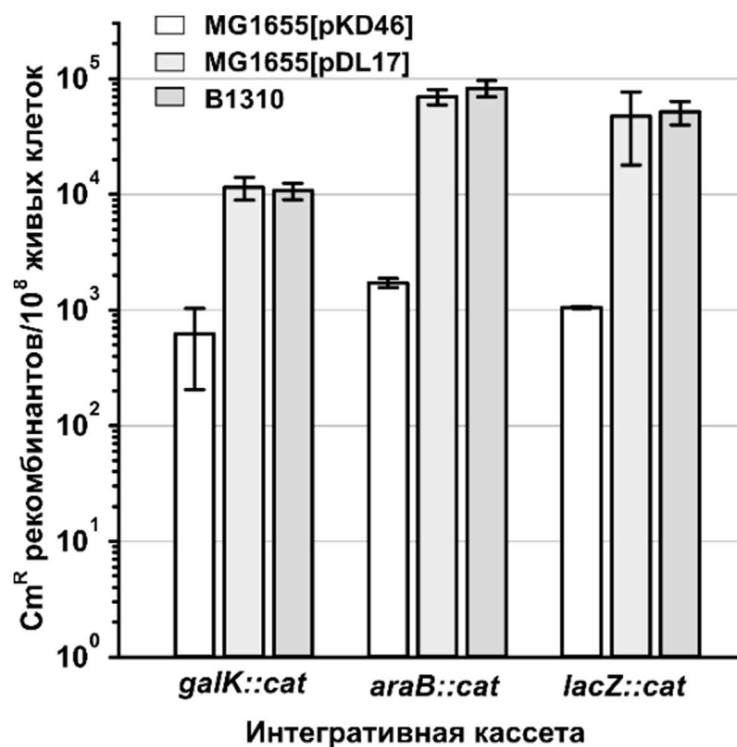


Рисунок 2. Сравнение эффективности рекомбинации в штаммах, несущих pDL17, pKD46 и дефектный профаг (B1310). Значения представляют собой среднее трех независимых экспериментов, планки погрешностей отражают стандартное отклонение.

В представленных экспериментах эффективность интеграции кассет *cat* в геном MG1655[pDL17] достигала значений, превышающих  $5 \times 10^4$  рекомбинантов на  $10^8$  выживших после электропорации клеток (0,05%). Увеличение доли по крайней мере до 1-3% сделало бы возможным неселективный отбор рекомбинантов, например, с помощью ПЦР с колоний. Потенциально, этого можно добиться увеличивая длину участков гомологии, фланкирующих кассету (Yu et al., 2000) и уменьшая её общую длину (Maresca et al., 2010). Для оптимизации процедуры интегративной трансформации был получен штамм B1415 (MG1655 *lacZ::cat*). При интеграции *cat* было удалено 42 п.н., соответствующие 14 кодонам. Клетки B1415[pDL17] трансформировали фрагментами ДНК, которые состояли из удаленных 42 п.н. и участков гомологии длиной от 50 до 1000 п.н. (рис. 3). В результате рекомбинации восстанавливается дикая последовательность *lacZ* и происходит делеция *cat* длиной 1011 п.н. Исследование зависимости доли Lac<sup>+</sup> рекомбинантов от длины гомологии и количества трансформируемой ДНК выявило, что оптимум эффективности интеграции достигается при значениях 350-500 п.н. и 750 нг. С использованием оптимизированных условий был проведен сходный эксперимент на примере гена *galK* в штамме B1411 (MG1655 *galK::cat*). Отличие заключалось в том, что длина делеции внутри гена составляла 410 п.н. В результате трансформации 1 мкг фрагмента ДНК, содержащего удалённую область и участки гомологии, доля рекомбинантов в трех независимых экспериментах варьировала от 2,2% до 4,5%.

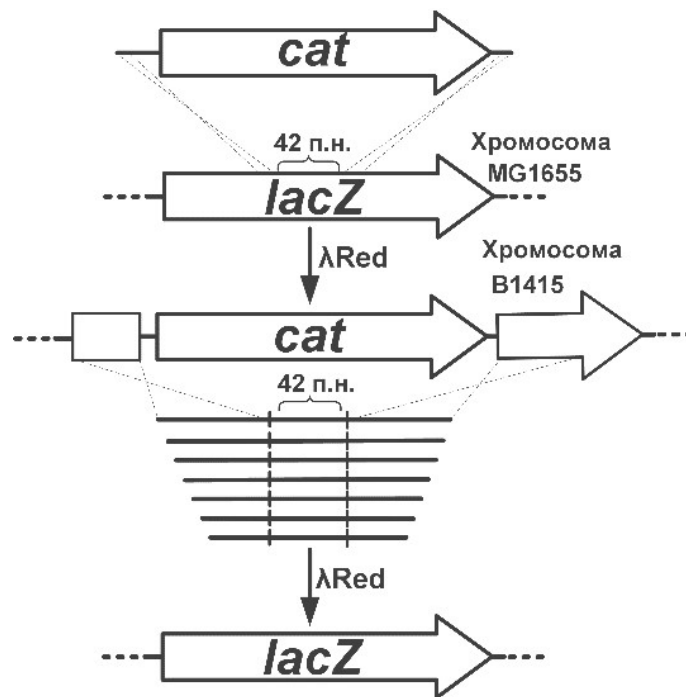


Рисунок 3. Схема эксперимента по оптимизации длины гомологии и общей длины интегративной кассеты.

Таким образом, в оптимальных условиях эффективность рекомбинации может достигать значений, достаточно высоких для проведения неселективного скрининга. При этом могут быть получены как делеции длиной, по крайней мере, 1,0 т.п.н., так и небольшие инсерции до 410 п.н. Этот метод может использоваться, как для интеграции промоторов и терминаторов транскрипции, так и для удаления селективных маркеров без применения систем сайт-специфической рекомбинации и маркеров негативной селекции.

### Негативная селекция *cl-hok* и интеграции протяжённых конструкций с её помощью

#### Стратегия негативной селекции

Ключевым элементом подхода, который позволил бы интегрировать протяженные фрагменты гетерологичной ДНК в геном *E. coli* в настоящей работе был выбран отбор рекомбинантов, потерявших маркер негативной селекции. Основой стратегии служил ген устойчивости к хлорамфениколу (*cat*) под контролем промотора  $P_L$  фага  $\lambda$ , который, в свою очередь, находится под контролем репрессора *CI*. Таким образом, эта транскрипционная единица придает клеткам устойчивость к хлорамфениколу ( $Cm^R$ ) до тех пор, пока отсутствует функциональный *cl*. В противном случае *CI* подавляет транскрипцию *cat*, и клетки остаются чувствительными. Чтобы ввести эту транскрипционную единицу в немодифицированные штаммы, на основе pDL17 была получена pRedCm, содержащая  $P_L$ -*cat* ниже оперона Red. Для подавления роста спонтанных *cl* мутантов ген *cl* был объединён со второй транскрипционной единицей, содержащей ген *hok* под контролем промотора

$P_R$ , который также, как и  $P_L$ , репрессируется  $Cl$ . Этот ген кодирует токсин, образующий поры в цитоплазматической мембране. Таким образом, клетки, потерявшие  $Cl$ , погибают в результате дерепрессии *hok*, тогда как клетки, экспрессирующие функциональный репрессор, сохраняют жизнеспособность (рис. 4).

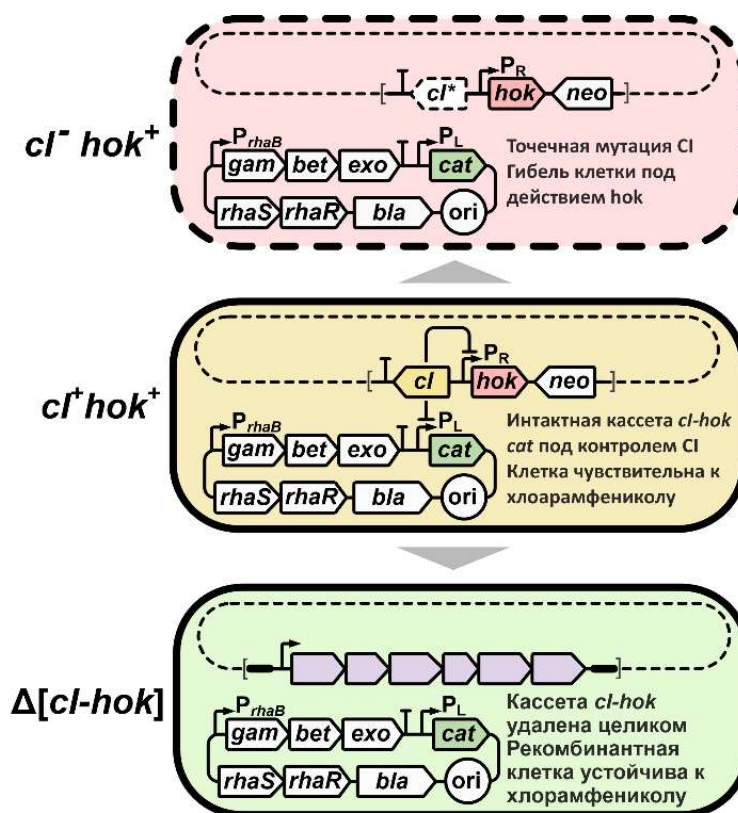


Рисунок 4. Схема стратегии негативной селекции *cl-hok*.

#### Оценка эффективности негативной селекции *cl-hok*

Чтобы оценить эффективность новой стратегии и устойчивость конструкций *cl-hok* к возникновению спонтанных мутантов, способных расти в присутствии хлорамфеникола, была измерена скорость возникновения таких мутаций. Для сравнения были использованы два наиболее широко используемых маркера - *sacB* (Murphy et al., 2000; Ellis et al., 2001) и *rpsL* (Bird et al., 2011). Интегративные кассеты, содержащие *cl-hok*, *sacB* или *rpsL*, были параллельно встроены в локусы *galETKM*, *lacZYA* и *araBAD* (рис. 5А), после чего были измерены скорости возникновения спонтанных мутаций, позволяющих клеткам выживать на среде с хлорамфениколом (*cl-hok*), сахарозой (*sacB*) и стрептомицином (*rpsL*). Сравнение *cl-hok* с *sacB* и *rpsL*, интегрированными в те же локусы, показало, что значения для маркера *cl-hok* были в 320–790 раз ниже по сравнению с соответствующими значениями *sacB* и в 220–570 раз ниже по сравнению с таковыми для *rpsL* (рис. 5Б).

Дополнительно, в локус *lac* была встроена кассета *cl-hok*<sup>L13ochre</sup>-*neo*, в которой *hok* инактивирован путём замены 13-ого кодона на стоп-кодон. Измерение показало, что инактивация *hok* приводит к 360-кратному

увеличению скорости возникновения спонтанных мутаций (рис. 5В). Этот результат свидетельствует о том, что, как и ожидалось, модуль  $P_R-hok$  подавляет рост большинства спонтанных мутантов, потерявших функциональный *cl*.

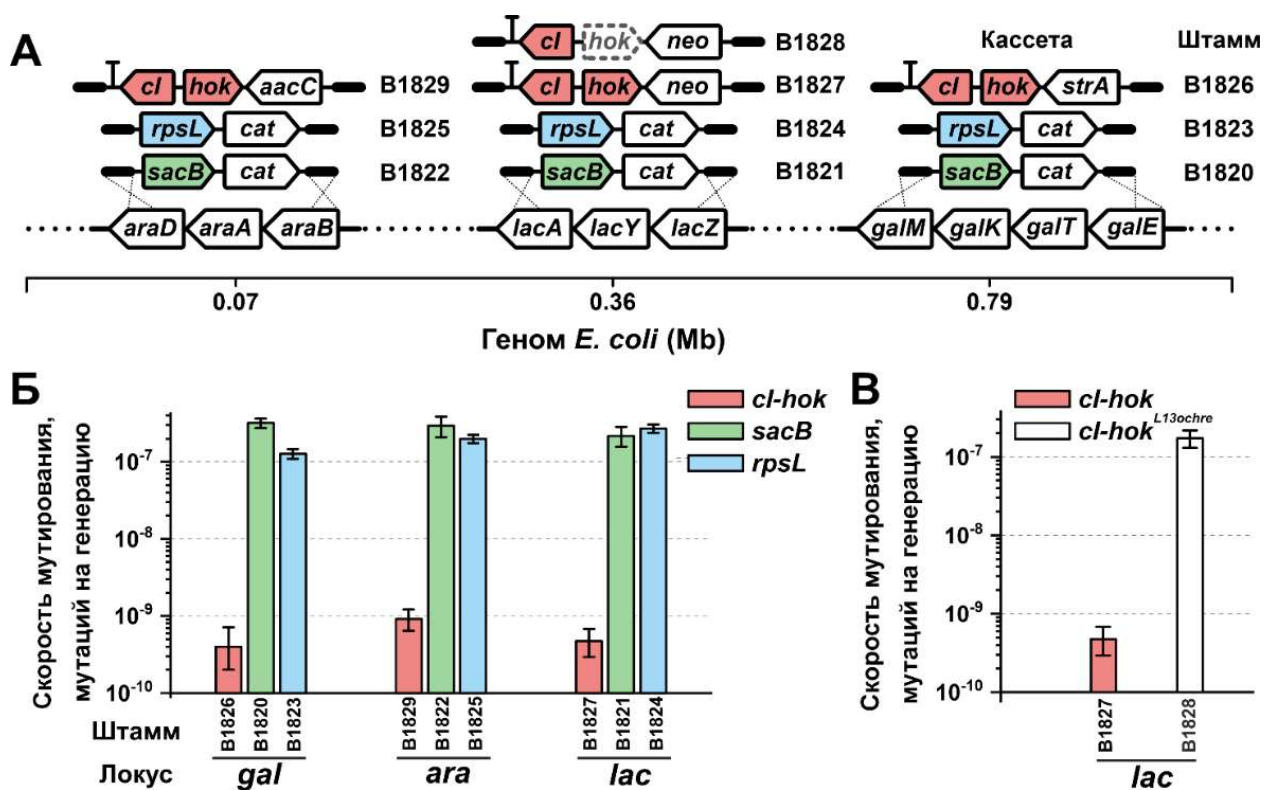


Рисунок 5. Оценка эффективности негативной селекции *cl-hok*. (А) Схема конструирования штаммов, использованных для измерения скорости возникновения спонтанных мутаций, придающих устойчивость в условиях негативной селекции. (Б) Скорость возникновения мутаций, придающих устойчивость в условиях негативной селекции, для маркеров *cl-hok*, *sacB* и *rpsL*. Планки погрешностей указывают 95% доверительные интервалы. (В) Сравнение скоростей мутирования кассет *cl-hok* и *cl-hok*<sup>L13ochre</sup> в локусе *lac*.

### Подавление активности эндонуклеазы *EcoKI* облегчает интеграцию конструкций, синтезированных с помощью ПЦР

Возможность интеграции гетерологичных конструкций в геном с использованием негативной селекции *cl-hok* и Red-рекомбинации тестировали с помощью фрагментов ДНК, содержащих опероны *scrKYABR* и *luxCDABE*. Оба фрагмента были синтезированы в ПЦР и фланкированы участками гомологии длиной 80 п.н. к локусам *gal* (*scrKYABR*) или *ara* (*luxCDABE*). Обе конструкции удалось интегрировать путём отбора устойчивых к хлорамфениколу рекомбинантов, потерявших кассету *cl-hok*. Однако частота рекомбинантов, утилизирующих сахарозу, составляла не более 1–3%, в то время как в нескольких экспериментах с кассетой *ara::luxCDABE* были получены значения более 60%. Анализ последовательности кассет показал,

что *scrKYABR* содержит три сайта узнавания эндонуклеазы *EcoKI*, тогда как *luxCDABE* их не содержит. Таким образом, расхождение результатов для каскет *gal::scrKYABR* и *ara::luxCDABE* могло быть вызвано деградацией фрагмента *gal::scrKYABR*, так как составляющая его ДНК не метилирована. Для подавления активности *EcoKI in trans* были протестированы несколько антирестрикционных функций, в частности, *Ral* фага  $\lambda$ , *ArdA* плазмиды ColPb-P9 и *Ocr* фага T7 (рис. 6А). Эффективность полученных конструкций и *pRedCm* в качестве контроля была измерена в штамме MG1655 путём его трансформации чувствительным к действию *EcoKI* фрагментом *gal::scrKYABR*. В результате электропорации клеток, экспрессирующих только *Red*, были получены лишь несколько рекомбинантов (рис. 6Б), тогда как *ArdA* и *Ocr* приводили к увеличению частоты *Scr*<sup>+</sup> рекомбинантов на 2-3 порядка. Сравнение эффективности высева неметилированного фага  $\lambda$ .0 и метилированного  $\lambda$  на газоне клеток *hdsS*-мутанта TG1 и дикого штамма MG1655, экспрессирующего *Ral*, *ArdA* или *Ocr*, показало, что коэкспрессия *Ocr* и *Red* приводит к полному подавлению активности *EcoKI*.

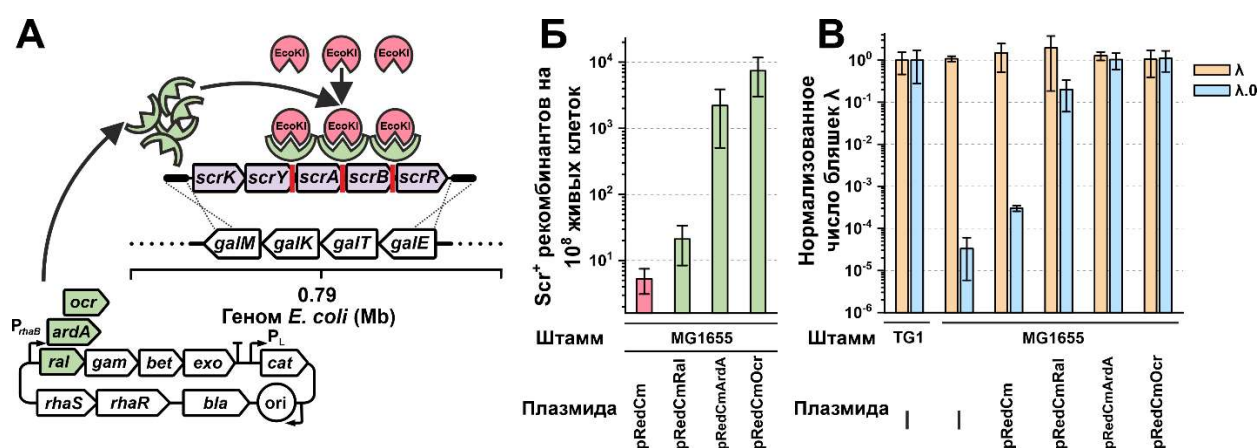


Рисунок 6. Увеличение эффективности интеграции в результате подавления активности эндонуклеазы *EcoKI*. (А) Схема эксперимента по оценке способности антирестрикционных функций повышать эффективность рекомбинации. (Б) Эффективность замены оперона *galETKM* каскетой *scrKYABR*. Показанные значения являются средними трех биологических повторностей; планки погрешностей обозначают SD. (В) Влияние антирестрикционных функций на эффективность высева фага  $\lambda$  и неметилированного фага  $\lambda$ .0. Показанные значения нормированы на эффективность высева на газон TG1. Показаны средние значения для трех биологических повторностей; планки погрешностей обозначают SD.

#### Анализ спонтанных мутаций, позволяющих выживать в условиях негативной селекции *cl-hok*

Дизайн стратегии негативной селекции *cl-hok* подразумевает, что клетка, несущая каскету *cl-hok* и модуль *P<sub>L</sub>-cat*, не способна приобрести устойчивость к хлорамфениколу в результате одиночной замены. Тем не

менее, штаммы B1826[pRedCm], B1827[pRedCm] и B1829[pRedCm] с небольшой частотой выщепляют  $Sm^R$  мутантов (рис. 5). Анализ структуры локусов, куда была интегрирована кассета *cl-hok*, а также pRedCm, присутствующей в мутантных клетках показал, что существует два доминантных класса спонтанных мутаций, позволяющих выживать в условиях негативной селекции (рис. 7). Первый класс – делеция, охватывающая либо часть кассеты *cl-hok*, либо всю кассету вместе с прилегающими областями хромосомы. Второй класс мутаций представляет собой тандемную дупликацию *cat* на pRedCm, в результате которой возникает вторая копия, не поддающаяся CI-репрессии.

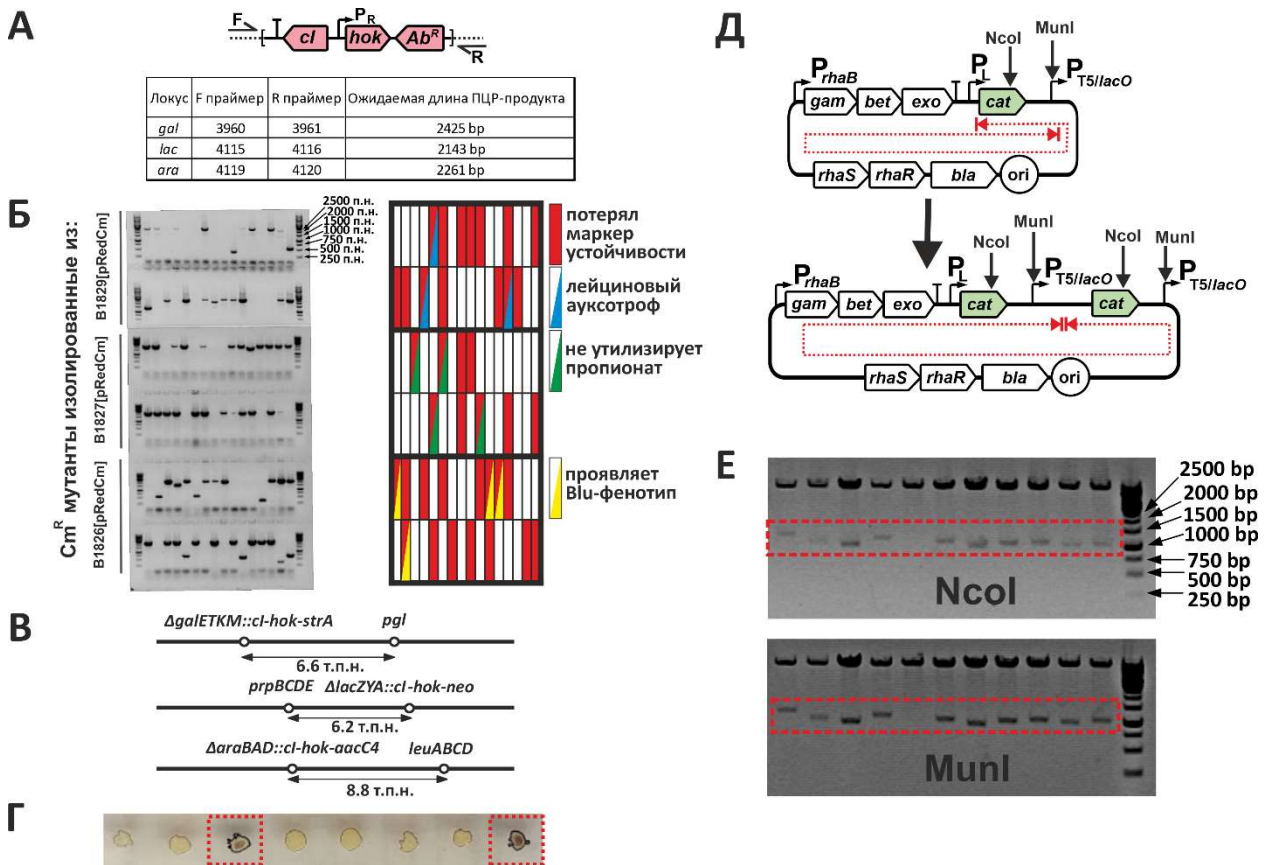


Рисунок 7. Анализ спонтанных мутантов, выживающих в условиях негативной селекции *cl-hok*. (А) Схема эксперимента по изучению структуры геномных локусов с интегрированной кассетой *cl-hok* с помощью ПЦР. Пунктирная линия обозначает бактериальную хромосому, а сплошная линия соответствует кассете *cl-hok*;  $Ab^R$  – гены *neo*, *strA* или *aacC4*; F и R – прямой и обратный праймеры. Пары праймеров, использованные для анализа каждого геномного локуса, и ожидаемая длина (для интактной кассеты *cl-hok*) продуктов ПЦР указаны в таблице под схемой. (Б) Анализ спонтанных  $Sm^R$  мутантов с помощью локус-специфической ПЦР (левая панель) и фенотипического исследования (правая панель). (В) Карта сцепления локусов, прилегающих к точке интеграции кассеты *cl-hok*. (Г) Vlu-фенотип (3-е и 8-е пятна), обусловленный мутацией *pgl*. (Д) Схема перестройки pRedCm, которая приводит к дупликации *cat*. Красная пунктирная линия указывает на



возможный сценарий перестройки. (E) Электрофореграмма мутантных плазмид, обработанных эндонуклеазами *MunI* и *NcoI*. Второй фрагмент длиной около 1 т.п.н. (отмечен красной рамкой) свидетельствует о дупликации соответствующих сайтов узнавания.

Интересно, что мутантные плазмиды напоминают продукт неправильного замыкания линейной мультимерной формы плазмиды, которая, как известно, образуется при репликации плазмид с ориджином *ColE1* в клетках, экспрессирующих гены *Red* (Silberstein et al., 1990; Mythili et al., 1993). Это говорит о том, что высокая копияность *pRedCm* является основным недостатком, так как частота возникновения мутантных молекул пропорциональна числу копий плазмиды, поскольку каждая из копий может быть подвергнута мутации. Чтобы уменьшить как количество копий, так и уровень базальной экспрессии *Red*, весь вспомогательный модуль *ocr-γβexo-<sub>P<sub>L</sub>-cat</sub>* был помещён под контроль IPTG-индуцируемого промотора *P<sub>A1lacO-1</sub>* и перенесён в хромосому. Сравнение полученного штамма со штаммами, несущими *pRedCm*, показало снижение скорости возникновения спонтанных мутаций приблизительно в четыре раза. Более того, практически все мутанты содержали делеции кассеты *cI-hok*. Такие делеции являются неотъемлемым свойством генетического аппарата *E. coli*. Поэтому частотой их возникновения навряд ли можно легко манипулировать без обширной модификации механизмов репликации и рекомбинации (Uematsu et al., 1999; Mashimo et al., 2004). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что хромосомный вспомогательный модуль позволяет достичь предельно возможной эффективности негативной селекции.

#### *Интеграция гетерологичных конструкций в бактериальную хромосому при помощи негативной селекции cI-hok*

Главной целью разработки новой стратегии негативной селекции было её использование в качестве инструмента для интеграции в геном конструкций, не содержащих селективного маркера. Для того, чтобы проверить возможность таких генетических манипуляций, в работе были использованы интегративные кассеты, несущие в своём составе опероны *scrKYABR*, *vioABCDE* и *luxCDABE*. Перечисленные кассеты интегрировали в локусы *gal*, *lac*, *tan* и *ara*, каждый из которых был предварительно маркирован кассетой *cI-hok* (рис. 8А и Б).

С использованием обеих вспомогательных конструкций, *pRedCmOsc* и хромосомного модуля *ocr-γβexo-<sub>P<sub>L</sub>-cat</sub>*, были получены значения эффективности интеграции (доля рекомбинантов, обладающих желаемым фенотипом, среди всех *Cm<sup>R</sup>* колоний) от 60 до 100% (рис. 8В).

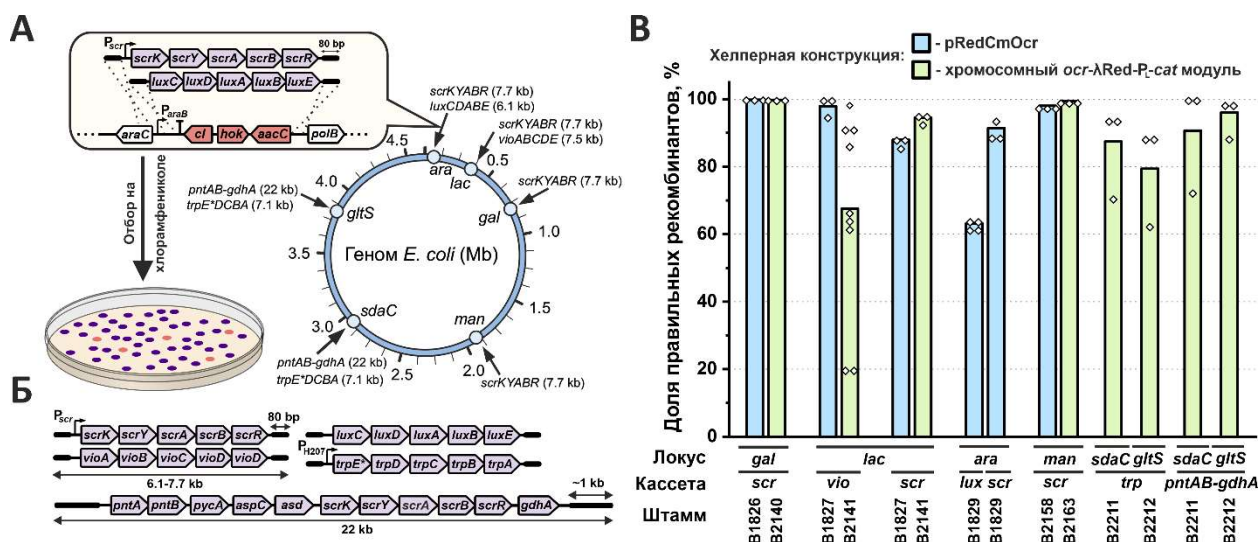


Рисунок 8. Интеграция немаркированных конструкций посредством негативной селекции *cl-hok*. (А) Схема экспериментов по оценке эффективности интеграции. Целевые геномные локусы обозначены незакрашенными кружками вдоль хромосомы. Значение в скобках рядом с названием кассеты обозначает ее длину. (Б) Схема кассет, используемых для оценки эффективности интеграции. (В) Эффективность интеграции кассет. Столбцы обозначают среднюю эффективность интеграции, а незакрашенные ромбы указывают точные значения для каждой биологической повторности.

### Негативная селекция *cl-hok* в сочетании с $\lambda$ Red-рекомбинацией – удобный инструмент для задач метаболической инженерии

Возможность использовать разработанную стратегию в задачах метаболической инженерии была продемонстрирована в экспериментах по созданию штаммов, продуцирующих L-триптофан и L-треонин. Так, для создания продуцента L-триптофана в локусы *gltS* и *sdaC* был параллельно интегрирован оперон  $P_{H207}$ -*trpE*<sup>S40F</sup>*DCBA* (рис. 8А и 8Б). Эта конструкция кодирует структурные гены пути биосинтеза L-триптофана (рис. 9А) с несколькими дополнительными мутациями по отношению к последовательности дикого типа. В частности, нативный промотор и аттенюатор *trpL* были заменены сильным конститутивным промотором  $P_{H207}$ , а также была введена аминокислотная замена S40F в последовательность TrpE, в результате чего антранилатсинтаза становится нечувствительной к ретроингибированию L-триптофаном (Caligiuri et al., 1991). В экспериментах по интеграции этой конструкции в геном штаммов B2211 и B2212 от 63 до 94%  $Stm^R$  колоний несли кассету  $P_{H207}$ -*trpE*<sup>S40F</sup>*DCBA* в целевом локусе (рис. 8В). Полученные рекомбинанты накапливали 1,4–1,5 г/л L-триптофана за 24 ч культивирования в пробирках (рис. 9Б).

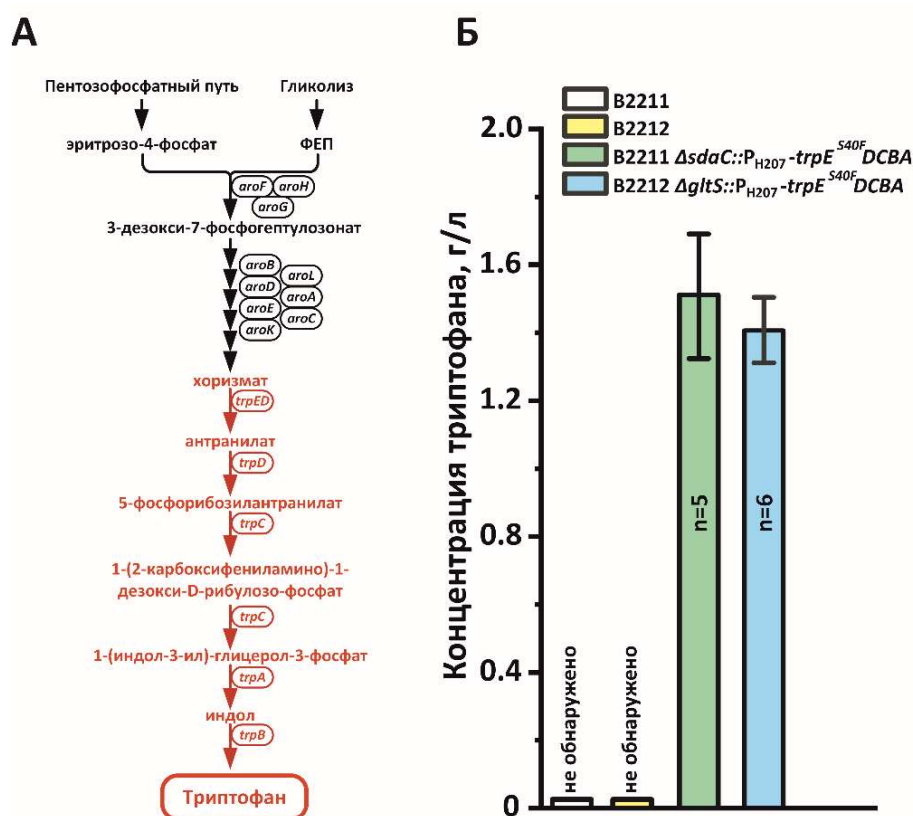


Рисунок 9. Конструирование продуцента L-триптофана. (А) Метаболическая карта пути биосинтеза L-триптофана. Красные линии и текст обозначают реакции и ферменты, затронутые интеграцией конструкции  $P_{H207-trpE^{S40F}}DCBA$  в хромосому штаммов B2211 и B2212. (Б) Накопление L-триптофана культурой штаммов B2211  $\Delta sdaC::P_{H207-trpE^{S40F}}DCBA$  и B2212  $\Delta gltS::P_{H207-trpE^{S40F}}DCBA$ . Показанные значения являются средними для указанного количества биологических повторов; планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

Чтобы увеличить способность штамма к накоплению L-треонина, был сконструирован модуль *pntAB-gdhA* длиной 22 т.п.н. (рис. 8Б), содержащий шесть генов, контролирующие реакции биосинтеза L-треонина (*asd*, *aspC*), ассимиляции  $NH_4^+$  (*gdhA*), реакции карбоксилирования пирувата (*pucA*) и регенерации НАДФН (*pntAB*) (рис. 10А). Кроме того, этот модуль содержал оперон *scrKYABR*, контролирующий утилизацию сахарозы и служащий фенотипическим маркером. Конструкцию *pntAB-gdhA* интегрировали в локусы *gltS* и *sdaC*. Анализ  $Sm^R$  колоний показал, что 72–100% были правильными рекомбинантами вне зависимости локуса интеграции (рис. 8В). Мутация  $\Delta sdaC::pntAB-gdhA$  была затем перенесена в штамм-продуцент L-треонина B2122. Полученные рекомбинанты накапливали на ~50% больше L-треонина по сравнению с предком (рис. 10Б).

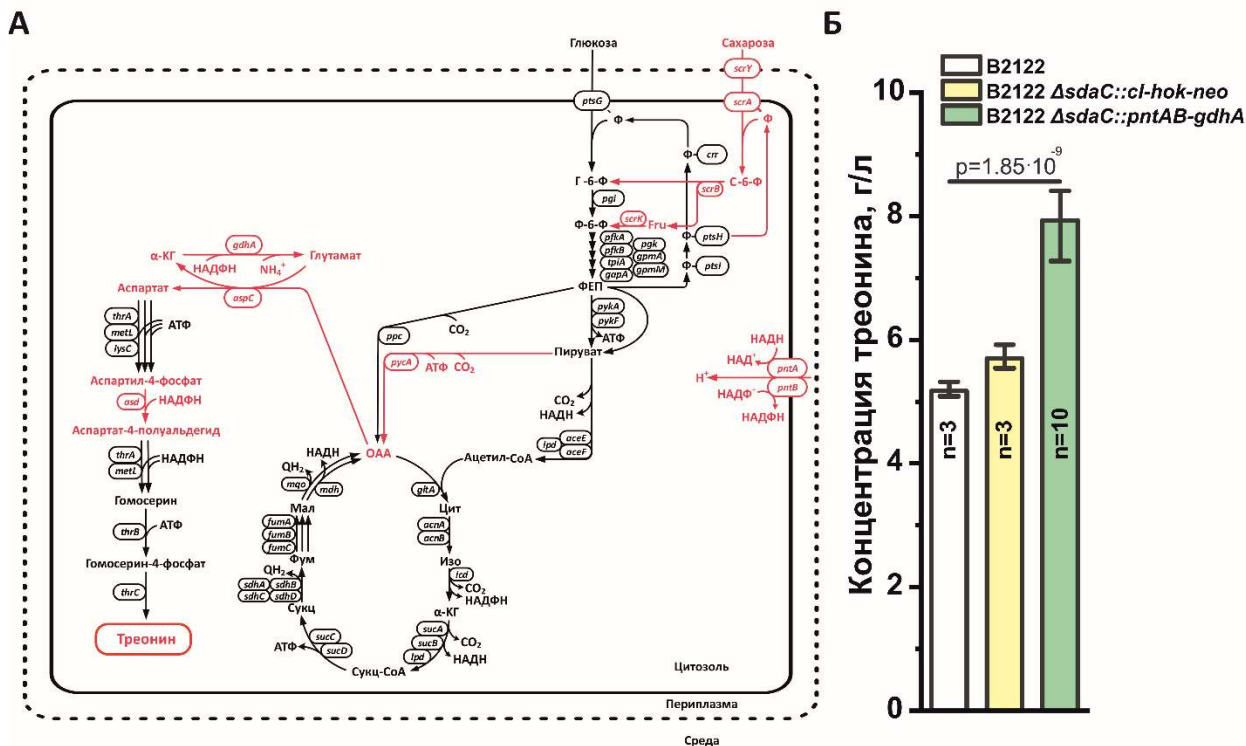


Рисунок 10. Конструирование продуцента L-треонина. (А) Метаболическая карта пути биосинтеза L-треонина. Красные линии и текст обозначают реакции и ферменты, затронутые интеграцией кластера генов *pntAB-gdhA* в хромосому штамма B2122. (Б) Накопление L-треонина культурой B2122  $\Delta sdaC::cl-hok-neo$ , B2122  $\Delta sdaC::pntAB-gdhA$  и родительским штаммом. Показанные значения являются средними для указанного количества биологических повторов; планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению. Значения сравнивали *t*-тестом Стьюдента с неравными дисперсиями; показано двустороннее *p*-значение.

### Перенос немаркированных геномных локусов между штаммами с помощью негативной селекции *cl-hok*

Помимо интеграции синтетических фрагментов ДНК в геном, эффективная стратегия негативной селекции может служить для переноса немаркированных участков хромосомы между штаммами. Для этого целевой locus реципиента должен быть предварительно маркирован маркером негативной селекции, после чего в клетки полученного штамма вводят геномную ДНК донора с помощью общей неспецифической трансдукции фагом P1, либо электропорации фрагментированной геномной ДНК (Khetrapal et al., 2015). В результате рекомбинации между экзогенной ДНК и хромосомой реципиента целевой locus будет заменён locusом донора, а маркер будет удалён. Благодаря этому правильные рекомбинанты получают способность расти в селективных условиях.

Возможность применения негативной селекции *cl-hok* для этих задач была исследована на примере оперонов *galETKM*, *lacZYA*, *araBAD* и *manXYZ*, каждый из которых был инактивирован кассетой *cl-hok* (рис. 11А). Клетки

полученных штаммов заражали фагом P1vir, полученным в результате инфекции дикого штамма MG1655, либо трансформировали геномной ДНК этого же штамма, после чего высевали на селективную индикаторную среду с хлорамфениколом и подсчитывали долю колоний, которые приобрели способность утилизировать D-галактозу, лактозу, L-арабинозу или маннозу. С использованием обоих методов доля правильных рекомбинантов в большинстве экспериментов достигала 80-100% (рис. 11Б).

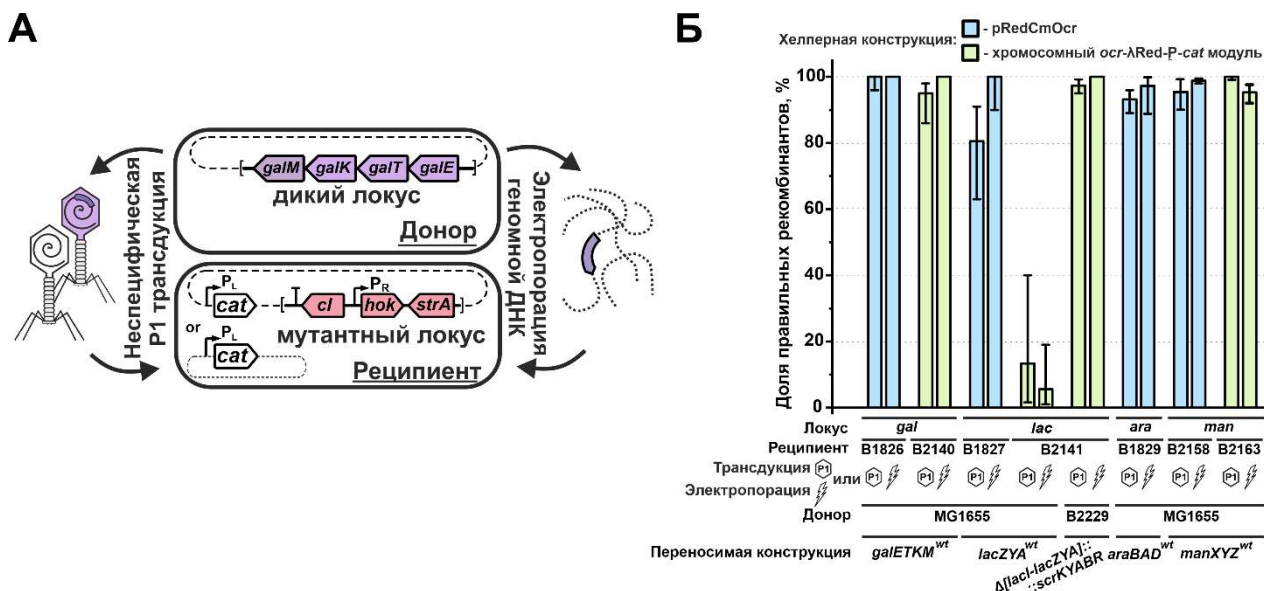


Рисунок 11. Перенос немаркированных геномных локусов при помощи негативной селекции *cl-hok*. (А) Схема экспериментов по переносу хромосомных локусов (в данном случае оперона *galETKM*) между штаммами. (Б) Эффективность переноса локусов *gal*, *lac*, *ara* и *man*. Показанные значения представляют собой результат одной биологической повторности, планки погрешностей указывают 95% доверительный интервал Клоппера-Пирсона для пропорции.

### Адаптация негативной селекции *cl-hok* и $\lambda$ Red-рекомбинации к немодельным энтеробактериям

На последнем этапе настоящей работы была продемонстрирована возможность применения негативной селекции *cl-hok* для модификации генома бактерий, отличных от *E. coli*. В качестве объектов были выбраны *Salmonella typhimurium* LT2 (McClelland et al., 2001), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (Wan et al., 2020) и *Pantoea ananatis* SC17(0) (Katashkina et al., 2009; Hara et al., 2012). Опероны *galETKM* (*galTKM* в случае *Pantoea*) и *manXYZ* во всех трех объектах были заменены на кассету *cl-hok-neo*. Затем удаленные опероны восстановили путём электропорации мутантных клеток амплифицированными фрагментами длиной 3,5–4,5 т.п.н., фланкированными областями гомологии длиной 80 п.н. Во всех экспериментах доля рекомбинантов составляла от 50 до 100% (рис. 12), что свидетельствовало о полной функциональности негативной селекции *cl-hok* в выбранных объектах.

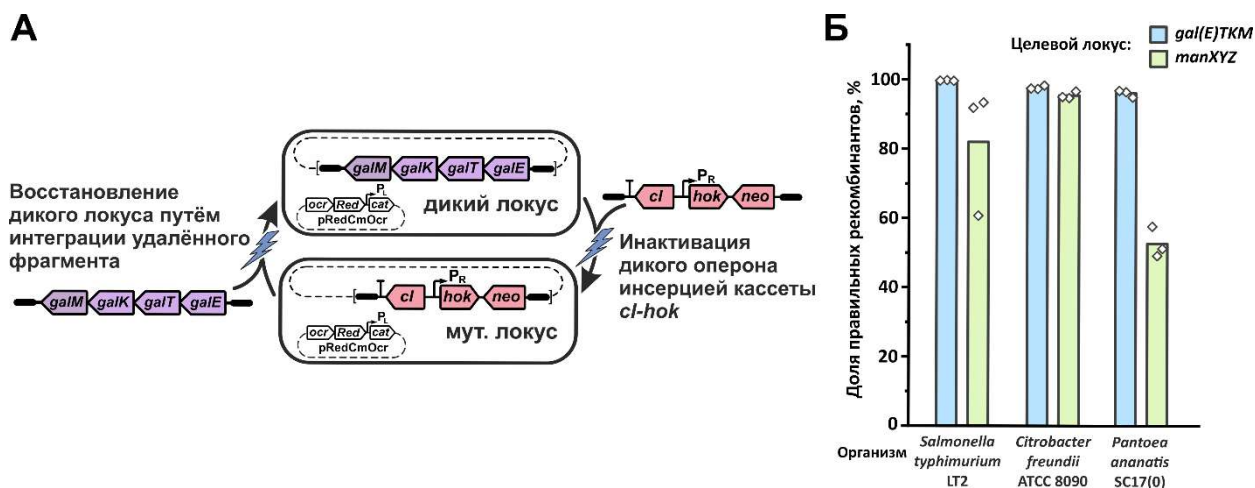


Рисунок 12. Негативная селекция *cl-hok* и Ocr-опосредованная Red рекомбинация в клетках *Salmonella*, *Pantoea* и *Citrobacter*. (А) Схема экспериментов, по оценке эффективности интеграции. Сначала в оперон *galETKM* (*galTKM* в случае *Pantoea*) или *manXYZ* делетировали кассетой *cl-hok-neo*. Затем на место кассеты *cl-hok-neo* интегрировали ПЦР-продукт, несущий оперон дикого типа. (Б) Эффективность интеграции кассет в локусы *gal* и *man* геномов *Salmonella*, *Citrobacter* и *Pantoea*. Долю правильных рекомбинантов рассчитывали путем деления титра рекомбинантов на общее количество  $\text{Cm}^R$  колоний. Столбцы указывают среднюю эффективность интеграции, а незакрашенные ромбы указывают точные значения, полученные для каждого повтора.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология генетической инженерии с использованием Red-рекомбинации бактериофага  $\lambda$  появилась в 1998 году (Zhang et al., 1998; Muyrers, 1999) и, благодаря своей гибкости и простоте, революционизировала методы направленного получения мутаций в бактериальном геноме. Эта процедура обычно состоит из двух этапов – инсерции интегративной кассеты в хромосому с отбором рекомбинантов по устойчивости к антибиотику и последующего удаления этой кассеты при помощи маркера негативной селекции. Второй этап обычно рассматривают лишь как способ «бесшрамового» получения мутаций, тогда как его можно потенциально использовать для интеграции целевых конструкций путём отбора рекомбинантов, потерявших маркер.

Для такой задачи требуется маркер негативной селекции, обладающий исключительной устойчивостью к инактивации в результате спонтанных мутаций. В настоящей работе описано создание такого маркера на основе комбинации репрессора  $\text{CI}$  фага  $\lambda$  и гена устойчивости к хлорамфениколу в составе модуля  $\text{P}_L\text{-cat}$ . Благодаря транскрипционной единице  $\text{P}_R\text{-hok}$  в составе единой интегративной кассеты *cl-hok*, подавляющее большинство спонтанных *cl*-мутантов погибают в результате дерепрессии токсина *Hok*. Таким образом,

по сравнению с кассетой без функционального *hok* скорость возникновения мутантов, способных выжить в условиях негативной селекции, снижается более, чем на два порядка. Экспериментальное сравнение показало, что маркер *cl-hok* демонстрирует практически на три порядка большую эффективность, чем широко используемые *sacB* и *rpsL*. Более того, анализ спонтанных устойчивых к хлорамфениколу мутантов в экспериментах со штаммами, несущими вспомогательный модуль *ocr-γβexo-P<sub>L</sub>-cat* в составе хромосомы, показал, что в подавляющем большинстве случаев они возникают вследствие спонтанных делеций, затрагивающих маркер *cl-hok* и прилегающие области хромосомы. Известно, что такие делеции появляются вне зависимости от активности RecA и не требуют наличия специфических детерминант в последовательности ДНК, таких как прямые повторы (Uematsu et al., 1999; Mashimo et al., 2003). Таким образом, скоростью их возникновения навряд ли можно легко манипулировать. Учитывая эти аргументы, можно сделать вывод, что негативная селекция *cl-hok* достигает предельно возможной эффективности.

В настоящей работе было показано, что негативная селекция *cl-hok* обладает достаточной эффективностью для интеграции фрагментов ДНК, не содержащих маркеров устойчивости к антибиотикам, путем отбора рекомбинантов, потерявших маркер. Вместе с тем, эксперименты показали, что система рестрикции-модификации EcoKI накладывает существенное ограничение на использование этого подхода, если интегративная кассета была синтезирована с помощью ПЦР и неметилирована. Это ограничение было снято в результате коэкспрессии оперона *γβexo* и антирестрикционной функции *ocr* бактериофага T7, что сделало возможным простое и удобное клонирование протяжённых ПЦР-продуктов, включающих в себя целые опероны, в произвольные локусы хромосомы бактерий, несущих дикий аллель *hsdR*. При этом, в большинстве экспериментов доля правильных рекомбинантов находилась в диапазоне от 50 до 100%.

В случае применения негативной селекции для интеграции в геном каждый модифицируемый локус имеет вариант, маркированный кассетой *cl-hok*, содержащей ген устойчивости к антибиотику. Это свойство позволяет с лёгкостью комбинировать мутации между собой в одном штамме. Действительно, в настоящей работе была показана возможность переноса немаркированных локусов с помощью P1 трансдукции и отбора рекомбинантов, потерявших кассету *cl-hok*. Та же манипуляция может быть выполнена с использованием трансформации клеток реципиента фрагментированной геномной ДНК донора. Этот способ может быть предпочтителен при работе с микроорганизмами, для которых неизвестны трансдуцирующие фаги. Более того, этот способ предоставляет еще одну ценное преимущество. Длиной фрагментов геномной ДНК донора легко можно манипулировать *in vitro* с помощью обработки редкощеплящими эндонуклеазами рестрикции. Это позволяет легко разделять близко

сцепленные мутации, которые не могут быть разделены в ходе P1 трансдукции.

Разработанная стратегия с минорными изменениями оказалась применима к другим представителям порядка *Enterobacteriales*. В частности, эксперименты с *Salmonella*, *Pantoea* и *Citrobacter* показали, что эффективность интеграции ПЦР-продуктов с использованием негативной селекции *cI-hok* и Red-рекомбинации в сочетании с экспрессией Ocr достигает тех же значений, что были получены для *E. coli*. Такая универсальность может быть связана с несколькими особенностями этого подхода. Во-первых, известно, что репрессор CI в сочетании с промоторами P<sub>R</sub> и P<sub>L</sub> функционален даже в филогенетически отдалённых от *E. coli* бактериях, таких как *Bacillus subtilis* (Itaya, 1999; Itaya et al., 2000). Во-вторых, токсичность Hok навряд ли может быть снята антитоксинами Sok, принадлежащими к гомологичным парам *hok/sok*, потенциально присутствующими в геномах других бактерий, так как механизм действия антисмысловой РНК Sok заключается в связывании с 5'-нетранслируемой областью транскрипта *hok* и подавлении его трансляции (Thisted et al., 1992). Следовательно, если *hok* помещен под контроль гетерологичного промотора, Sok не скажется на его экспрессии. Наконец, из литературы известно, что Ocr подавляет активность широкого спектра эндонуклеаз рестрикции I и III типов (Krüger et al., 1982; Krüger et al., 1983; Bandyopadhyay et al., 1985; Roberts et al., 2012). Это свойство может быть критически важным для работы с микроорганизмами, обладающими неизвестным паттерном рестрикции и модификации. Таким образом, перечисленные особенности в сочетании с полученными результатами свидетельствуют о том, что разработанная стратегия может быть универсальным методом геномной инженерии различных микроорганизмов, принадлежащих к порядку *Enterobacteriales* и, потенциально, может быть адаптирована к ещё более филогенетически отдалённым таксонам.

В заключение, в настоящей работе описано создание новой стратегии геномной инженерии микроорганизмов, объединяющая в себе эффективную негативную селекцию и Red-рекомбинацию, дополненную антирестрикционной функцией T7ocr, которые вместе позволяют интегрировать протяженные линейные фрагменты ДНК напрямую в бактериальную хромосому и использовать последнюю в качестве вектора общего назначения. Этот подход обладает рядом значительных преимуществ по сравнению с существующими методами и расширяет репертуар инструментов для исследований в области синтетической биологии и метаболической инженерии.



## ВЫВОДЫ

1. Для интеграции протяжённых немаркированных фрагментов ДНК в хромосому *Escherichia coli* была создана стратегия негативной селекции на основе двухпромоторной системы P<sub>L</sub>/P<sub>R</sub>, её репрессора CI, гена устойчивости к хлорамфениколу *cat* и токсина Нок. Анализ спонтанных мутантов, выживающих в селективных условиях, свидетельствует о том, что эффективность этой стратегии достигает предельно высоких значений.
2. Было показано, что основным фактором, ограничивающим эффективность интеграции протяжённых неметилованных фрагментов ДНК в геном *Escherichia coli*, является эндонуклеаза EcoKI. Вместе с тем, частота рекомбинации может быть увеличена более чем на три порядка благодаря коэкспрессии генов Red и антирестрикторной функции Ocr бактериофага T7.
3. Коэкспрессия генов Red и T7ocr позволяет встраивать немаркированные фрагменты ДНК длиной 6-8 т.п.н. в произвольные локусы хромосомы с отбором рекомбинантов, в геноме которых маркер *cl-hok* был заменён целевой конструкцией. При этом фрагменты могут быть синтезированы с помощью ПЦР с любой матрицы без необходимости конструировать интегративные кассеты на автономных векторах.
4. Негативная селекция *cl-hok* позволяет переносить немаркированные локусы хромосомы из одного штамма в другой с помощью P1-трансдукции или трансформации клеток реципиента фрагментированной геномной ДНК донора.
5. Технология интеграции в геном с помощью негативной селекции *cl-hok* и Ocr-опосредованной Red-рекомбинации полностью функциональна в нескольких представителях порядка *Enterobacteriales*: *Salmonella typhimurium* LT2, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 и *Pantoea ananatis* SC17(0) и, потенциально, может быть адаптирована для работы с микроорганизмами, принадлежащими к более отдалённым в филогенетическом отношении таксонам.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ по ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ  
в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных  
WoS, SCOPUS и RSCI, рекомендованных для защиты в  
диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:**

1. **Bubnov D. M.**, Yuzbashev T. V., Khozov A. A., Melkina O. E., Vybornaya T. V., Stan G. B., Sineoky S. P. Robust counterselection and advanced  $\lambda$ Red recombineering enable markerless chromosomal integration of large heterologous constructs // *Nucleic Acids Research*. 2022. V. 50. – № 15. P. 8947–8960. DOI: doi.org/10.1093/nar/gkac649 (**WOS IF 14,9; SJR IF 8,23; Q1) (0,88/0,74)**) (Здесь и далее в скобках приведён объем публикаций в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **Bubnov D. M.**, Yuzbashev T. V., Vybornaya T. V., Netrusov A. I., Sineoky S. P. Excision of selectable markers from *Escherichia coli* genome without counterselection using an optimized  $\lambda$ Red recombineering procedure // *Journal of microbiological methods*. 2019. V. 158. P. 86–92. DOI: doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.022 (**WOS IF 2,2; SJR IF 0,47; Q3) (0,44/0,40)**).
3. **Bubnov D. M.**, Yuzbashev T. V., Vybornaya T. V., Netrusov A. I., Sineoky S. P. Development of new versatile plasmid-based systems for  $\lambda$ Red-mediated *Escherichia coli* genome engineering // *Journal of microbiological methods*. 2018. V. 151. P. 48–56. DOI: doi.org/10.1016/j.mimet.2018.06.001 (**WOS IF 2,2; SJR IF 0,47; Q3) (0,56/0,47)**).