

## ВОЗМОЖНОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ *Erwinia carotovora*, ЕЕ БАКТЕРИОФАГОВ И ПЛАЗМИД



Ф. И. ТОВКАЧ

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев  
E-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

Впервые рассмотрена перспектива создания биотехнологической системы для синтеза микробных продуктов на основе *Erwinia carotovora*, ее бактериофагов и плазмид. Эта система основывается на трех основных фундаментальных принципах: экспрессии генов в составе многокопийного профагового элемента рСА25, его аналогов, усиливающих воздействие профаговых генов на систему секреции типа II и транслокацию продуктов за пределы клетки после их сверхсинтеза.

Предполагается, что указанная биотехнологическая система будет экономичной, экологически безопасной и безвредной для здоровья человека, а также позволит получать практически чистые белковые продукты.

**Ключевые слова:** *Erwinia carotovora*, автономные генетические элементы, бактериофаги, плазмиды, биотехнологическая система.

Микробные системы клонирования и экспрессии генов широко используются в современной биотехнологии для получения разнообразных белковых продуктов, в том числе и медицинских препаратов. Они созданы в основном с применением единообразной стратегии, первично разработанной для кишечной палочки *Escherichia coli*. Превалирование этой бактерии в современных микробных биотехнологиях очевидно. Наряду со значительными преимуществами «экспансия» *E. coli* приносит и серьезные недостатки, на которые иногда не обращают должного внимания при получении очередных выгодных грантов.

Во-первых, широко распространенные лабораторные штаммы *E. coli* происходят от клинических изолятов. «Остатки» их антигенов гомологичны таковым родственных патогенных бактерий из семейства *Enterobacteriaceae*. Часто именно эти «неучтенные» примеси приводят к нежелательным последствиям, в частности вызывают пирогенные реакции у детей при применении лекарств рекомбинантного происхождения.

Во-вторых, производство, созданное на основе массового применения штаммов эшерихий, может быть объектом биотеррорис-

тической атаки. Достаточно будет лизогенизировать кишечную палочку одним единственным токсинконвертирующим фагом, чтобы превратить соответствующие предприятия в опаснейший источник эпидемии [1].

Решение этих и других экологических проблем весьма актуально и в первую очередь может состоять в полной замене *E. coli* объектами, не имеющими отношения к патогенным для человека и животных бактериям. Однако этот путь представляется очень длительным и трудноосуществимым. Современная генетическая инженерия базируется на основательно развитой молекулярной генетике *E. coli* и ее автономных генетических элементов (AGE) — бактериофагов, плазмид и транспозонов. Консервативность этой системы велика, поскольку в нее вложен огромный научный потенциал сотен лучших лабораторий мира.

Тем не менее, на наш взгляд, отмеченная консервативность может быть постепенно преодолена. В своих исследованиях мы используем фитопатогенную бактерию *Erwinia carotovora*, родственную *E. coli*. Многовековой хозяйственный опыт, а также многолетние наблюдения показывают, что пектинолитические эрвинии не имеют какого-либо отношения к патогенным процессам

у человека и животных, хотя и вызывают болезнь мягкой гнили у разнообразных растений. Ощутимое родство *E. carotovora* и *E. coli* (около 20% гомологичности в нуклеотидных последовательностях геномов) свидетельствует о совместимости многих физиологических и биохимических процессов обеих бактерий, а также о возможности реального взаимодействия между ними на уровне автономных генетических элементов. Это создает предпосылки для стабильного наследования и преодоления трансдукционных и трансформационных межродовых барьеров векторными конструкциями, образованными на основе *AGE* каждой бактерии, или химерными ДНК-структурами.

По сравнению с биотехнологической системой *E. coli* аналога на основе *E. carotovora* и ее *AGE*, а также с участием гибридных векторов обладают ощутимым преимуществом. Пектинолитические эрвинии, в отличие от *E. coli*, имеют развитую систему транслокации белковых продуктов в периплазму и внеклеточное пространство. Избыточный синтез белка выступает как сигнальный фактор, активирующий систему секреции типа II. Последняя принимает участие в перенесении синтезированного продукта за пределы клетки. Периплазматические и внеклеточные белки могут быть получены без разрушения клеток [2].

Таким образом, использование биотехнологической системы для экспрессии чужеродных генов в *E. carotovora* и получение соответствующих продуктов позволяет решать проблемы медицинской и экологической безопасности, поскольку у данной бактерии отсутствуют какие-либо детерминанты патогенности. Значительная степень чистоты конечных продуктов достигается за счет их секреции в периплазматическое или внеклеточное пространство.

К настоящему времени у *E. carotovora*, в основном усилиями нашей лаборатории, изучены следующие автономные генетические элементы: умеренные и вирулентные бактериофаги [3–6], плазмиды [7, 8] и детерминанты бактериоцинов (каротоворицинов) двух типов [9, 10].

Для природных популяций фитопатогенных эрвиний свойственно фагоносительство: каждая из них представляет собой оригинальную псевдолизогенную систему. В такой системе в состоянии лизиса или лизогении переход «псевдопрофага» можно активировать гетерологичным бактериофагом или каротоворицином. Этой особенностью, или фаг-фаговой индукцией, мы

воспользовались для обнаружения умеренных бактериофагов *E. carotovora* [11].

Сейчас наиболее интенсивно исследуется один из этих фагов, ZF40, имеющий широкий круг хозяев среди штаммов *E. carotovora*. Вирионы фага ZF40 состоят из изометрического капсида диаметром 58 нм и сократимого отростка длиной 86 нм (рис. 1). На основе структурно-морфологической организации частиц этот фаг отнесен к семейству *Myoviridae* и морфотипу A1. Размер фагового генома составляет 45,8 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.). Вирионная ДНК фага ZF40 представлена циклически пермутированными молекулами, возможно содержащими односторонние выступы. Популяция молекул, в свою очередь, содержит как случайно пермутированную ДНК, так и ДНК с дискретными перестановками нуклеотидных последовательностей. Только определенное их соотношение в популяционном наборе вирионной ДНК приводит к правильной лизогенизации чувствительной бактерии фагом ZF40 [12]. Недавно было установлено, что лизогения с участием указанного бактериофага формируется за счет экспрессии четырех генов — *k*, *l*, *m* и *n* с-области генома. Лизогенные бактерии, несущие профаг ZF40 дикого типа, приобретают необычный тип супериммунитета, который характеризуется устойчивостью не только к гомоиммунным фагам, но и к инфицированию вирулентными мутантами [5].

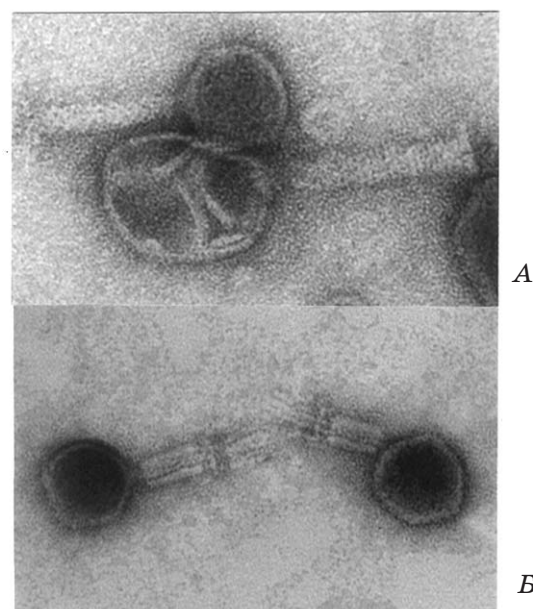


Рис. 1. Электронограммы частиц умеренного бактериофага ZF40 *E. carotovora*: А — нативная фаговая частица совместно с фагом T4D *E. coli* В, длина хвостового отростка которого составляет 113 нм; В — две частицы фага ZF40 с сокращенными хвостовыми отростками

С научно-практической точки зрения просматриваются несколько основных направлений применения фага ZF40 в молекулярной биотехнологии. Наряду с вирулентным фагом FE44 он может быть использован в качестве инструмента для тестирования внутриклеточных систем рестрикции — модификации у *E. carotovora* [6, 13] и, в итоге, для создания штаммов, способных воспринимать и поддерживать гетерологичные гибридные векторные конструкции.

С другой стороны, углубленные исследования молекулярно-генетической организации фага ZF40 позволят в перспективе использовать его регуляторные элементы в создании плазмидных и фаговых векторов различного предназначения.

И наконец, восстановление секреции ключевого фермента «патогенности» пектатрансэлиминазы у R-диссоцианта *E. carotovora* при их лизогенизации [14] можно рассматривать не только как важное научное положение, но и как полезную особенность фага ZF40. Исследование структурной и регуляторной сторон указанной лизогенной конверсии, по нашему мнению, может привести к реализации двух возможностей. Во-первых, экспрессия гена в составе векторной плазмиды, усиливающего секрецию типа II, может выступать в качестве селективного маркера, и, во-вторых, продукт этой экспрессии позволит включать (запускать) и контролировать секрецию рекомбинантного белка во внеклеточное пространство.

Автор этой статьи установил ранее, что резидентные (эндогенные) плазмиды встречаются в 30% штаммов *E. carotovora* [7]. В первую очередь они отличаются размерами и копийностью. Все внехромосомные ДНК можно отнести к разряду криптогенных, так как не известна ни одна функция, которую бы они кодировали. Тем не менее, как показали последующие исследования, некоторые из этих плазмидных ДНК можно использовать как исходный материал для конструирования векторных молекул.

Интерес представляет то, что значительная часть плазмидсодержащих штаммов *E. carotovora* взаимодействует с гетерологичным колифагом P1. При этом репродукция фага не происходит, но он адсорбируется на клетках и запускает механизм их уничтожения, сущность которого пока не известна. В результате около 0,01% клеток становятся трансдуктантами, несущими аутентичный плазмидный профаг P1 или линейную хромосому этого фага [9]. Использование фага P1 в качестве источника транспозона

оказалось удачным в случае криптогенной многокопийной плазмиды pCA25 *E. carotovora* 48A, размер которой составляет около 10 т.п.н. [8]. Установлено, что инкорпорация транспозона Tn9, несущего ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), возможна в трех случаях: при первичном инфицировании клеток фагом P1::Tn9, повторном фаговом заражении P1-трансдуктантов и совместной персистенции мишенивой плазмиды с соответствующим профагом. Мы разработали метод отбора клонов, несущих плазмиды pCA25::Tn9 (рис. 2), который основан на увеличенной, по сравнению с трансдуцированными бактериями, выживаемости этих клонов при высоких концентрациях хлорамфеникола — около 100 мкг/мл.

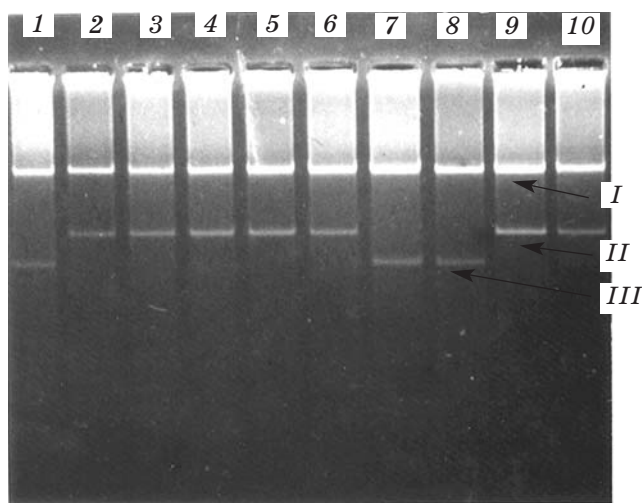


Рис. 2. Плазмидные профили клонов *E. carotovora* 48A, несущих плазмиды pCA25 (2–6, 9, 10) и pCA25::Tn9 (7, 8). Стрелками указаны положения хромосомной ДНК (I), исходной плазмиды (II) размером 9,8 т.п.н. и ее вариантов с внедренным транспозоном Tn9 (III). Размер плазмиды pCA25::Tn9 одинаков и составляет 13,6 т.п.н.

Рестрикционный анализ вариантов плазмид pCA25::Tn9, а также их делеционных производных подтвердил тот факт, что аутентичную плазмиду pCA25 можно рассматривать как профаговый элемент *E. carotovora*, осуществляющий строгий контроль собственной репликации и распределения по дочерним клеткам. Это позволяет рассчитывать на стабильное поддержание и наследование рекомбинантных плазмид, создаваемых на его основе. К дополнительным преимуществам генетического элемента pCA25 можно отнести наличие в его составе небольшого числа гексануклеотидных сайтов рестрикции, «маркерного» сайта *EcoRI* в гене *CAT* и двух сайтов для эндонуклеазы *PstI*, привнесенных при транспозиции Tn9. Важно, что один из



*PstI*-сайтов удаляется при делетировании правого повтора Tn9 и части гена *CAT*. Недавно были изучены условия трансформации клеток *E. carotovora* небольшими экзогенными плазмидами. Установлено также, что плазмидная ДНК pCA25::Tn9 способна эффективно трансформировать реципиентные клетки *E. coli* и *E. carotovora* и может стабильно поддерживаться в обеих бактериях, экспрессируя все свои функции. При этом сверхэкспрессия гена хлорамфениколацетилтрансферазы, как и  $\beta$ -лактамазы в составе Tn3, приводит к сигналингу и запуску транслокации этих белков во внеклеточную среду.

Таким образом, перспектива создания и использования биотехнологической системы с участием *E. carotovora* и ее плазмидофаговых компонентов может основываться на трех фундаментальных принципах: экспрессии генов в составе многокопийного профагового элемента pCA25 и его аналогов; усиливающим воздействии профаговых генов на систему секреции типа II; транслокации белковых продуктов за пределы клетки после их сверхсинтеза. Эта система будет экономически выгодной, экологически безопасной и безвредной для здоровья человека, а также позволит получать практически чистые белковые продукты без разрушения бактериальных клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Крылов В. Н. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий // Генетика. — 2003. — Т. 39, №5. — С. 595–620.
2. Товкач Ф. И., Романюк Л. В., Муквич М. С., Горб Т. Е. Нетрадиционные способы получения антилейкемической L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: Матер. междунар. конфер. — Минск, 2004. — С. 219–220.
3. Товкач Ф. И. Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 2002. — Т. 71, №1. — С. 75–81.
4. Кушкина А. И., Товкач Ф. И. Индикаторная система для изучения лизогенного развития умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. — 2005. — Т. 67, №3. — С. 50–60.
5. Кушкина А. И., Товкач Ф. И. Функциональная организация профага и лизогения у *Erwinia carotovora* с участием умеренного бактериофага ZF40 // Микробиол. журн. — 2006. — Т. 68, №3. — С. 21–32.
6. Товкач Ф. И., Черватюк Н. В. Экспериментальная фаговая система для изучения рестрикции-модификации *Erwinia carotovora* // Там же. — 2006. — Т. 68, №6. — С. 27–35.
7. Товкач Ф. И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 2001. — Т. 70, №6. — С. 804–810.
8. Сергеева Ж. Ю., Бузова Л. М., Товкач Ф. И. Внесение транспозона Tn9 в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Микробиол. журн. — 2006. — Т. 68, №4. — С. 34–39.
9. Товкач Ф. И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 2002. — Т. 71, №3. — С. 359–367.
10. Товкач Ф. И., Балко А. Б., Муквич Н. С. Особенности лизогенной индукции бактериоцинов у тиминовых мутантов *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. — 2006. — Т. 68, №3. — С. 33–46.
11. Товкач Ф. И. Изучение фагоустойчивости *Erwinia carotovora* с помощью умеренного бактериофага ZF40 // Микробиология. — 2002. — Т. 71, №1. — С. 82–88.
12. Панцина А. И., Товкач Ф. И. Внутригенная гетерогенность умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. — 2006. — Т. 68, №6. — С. 35–43.
13. Черватюк Н. В., Товкач Ф. И. Влияние экзогенной плазмиды R68.45 на продуктивное и лизогенное развитие умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Там же. — 2006. — Т. 68, №6. — С. 48–57.
14. Кушкина А. И., Романюк Л. В., Горб Т. Е., Товкач Ф. И. Влияние профага ZF40 на секрецию пектатлиазы у *Erwinia carotovora* // Доповіді НАНУ. — 2006. — № 6. — С. 154–159.

**МОЖЛИВОСТІ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ  
СИСТЕМИ НА ОСНОВІ  
*Erwinia carotovora*,  
ЇЇ БАКТЕРІОФАГІВ І ПЛАЗМІД**

*Ф. І. Товкач*

*Інститут мікробіології та вірусології  
НАН України, Київ  
E-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com*

Уперше розглянуто перспективу створення біотехнологічної системи для синтезу мікробних продуктів на основі *Erwinia carotovora*, її бактеріофагів і плазмід. Ця система ґрунтується на трьох фундаментальних принципах: експресії генів у складі багатокопійного профагового елемента pCA25, його аналогів, підсилювальної дії профагових генів на систему секреції типу II і транслокації продуктів за межі клітини після їх надсинтезу.

Передбачається, що зазначена система буде економічно вигідною, екологічно безпечною і нешкідливою для здоров'я людини, а також дасть змогу одержувати практично чисті білкові продукти.

**Ключові слова:** *Erwinia carotovora*, автономні генетичні елементи, бактеріофаги, плазмід, біотехнологічна система.

**ABILITIES OF BIOTECHNOLOGICAL  
SYSTEM BASED ON  
*Erwinia carotovora*,  
ITS BACTERIOPHAGES AND PLASMIDS**

*F. I. Tovkach*

*Institute of Microbiology and Virology of  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv  
E-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com*

For the first time the perspective of biotechnological system for synthesis of microbial products based on *Erwinia carotovora*, its bacteriophages and plasmids is observed. This system is based on three fundamental principals: gene expression included in multicopy prophage element pCA25 and its analogies, the influence of prophage's genes on type II secretion system and products translocation outside the cell after their supersynthesis.

It is supposed that this system would be economical, ecologically safed and harmless for human's health and also will permitt to acquire practicaly pure protein products.

**Key words:** *Erwinia carotovora*, autonomous genetic elements, bacteriophages, plasmides, biotechnological system.