

РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
ГМО

Брилькова Е.В., Брильков А.В., Логинов Ю.Ю.

Институт биофизики ФИЦ СО РАН

Академгородок, 50, стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ

e-mail: evmorbril@mail.ru

Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

Сибирский государственный университет науки и технологий им. ак. М.Ф. Решетнева

пр. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660037, РФ

e-mail: loginov@sibsau.ru

Аннотация. Статья посвящена разработке биосенсоров - репортерных моделей исследования выживания и распространения генетически модифицированных микроорганизмов (ГМО) в лабораторных и природных экосистемах на примере трансгенных люминесцентных (Lux) и (GFP) бактерий *Escherichia coli*. Прогнозирование выживания и распространения (ГМО) в определенных экологических условиях невозможно без учета характеристик трансгенных бактерий, например, стабильности плазмид в клетках трансгенных микроорганизмов, «стоимости» поддержания клонированных в плазидах гетерологичных генов в селективных и неселективных условиях ("fitness cost"), вероятности передачи и эффективности экспрессии клонированных генов в других организмах. Особое внимание уделяется разработке математических моделей интродукции генно-инженерных штаммов в лабораторные и природные экосистемы различной степени сложности и замкнутости для прогнозирования сохранения и распространения ГМО в окружающей среде.

Ключевые слова: Биосенсоры, генетически модифицированные организмы (ГМО), интродукция в природные экосистемы, экспрессия клонированных генов, биолюминесценция, биобезопасность ГМО.

DEVELOPMENT OF BIOSENSORS BY USED OF TRANSGENIC LUMINESCENT
MICROORGANISMS FOR EVALUATING THE BIOLOGICAL AND ECOLOGICAL
SAFETY OF GMO

Brilkova E.V., Brilkov A.V., Loginov Yu.Yu.

Institute of biophysics FRC SB RAS

Akademgorodok, 50 building 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

e-mail: evmorbril@mail.ru

Siberian Federal University

Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

Reshetnev Siberian State University of Science and Technology

Krasnoyarskii rabochii pr., 31, Krasnoyarsk, 660037, Russia

e-mail: loginov@sibsau.ru

Abstract. The article is devoted to the development of biosensors - reporter models for the study of the survival and propagation of genetically modified microorganisms (GMOs) in laboratory and natural ecosystems using the example of transgenic luminescent (Lux) and (GFP) *Escherichia coli* bacteria. The prediction of survival and distribution (GMO) in certain environmental conditions is impossible without considering the characteristics of transgenic bacteria, for example, the stability of plasmids in cells of transgenic microorganisms, the "cost" of maintaining heterologous genes cloned in plasmids in selective and non-selective conditions ("fitness cost"), the transmission probability and the efficiency of expression of cloned genes in other organisms. Particular attention is paid to the development of mathematical models for the introduction of genetically engineered strains into laboratory and natural ecosystems of varying degrees of complexity and closure in order to predict the conservation and spread of GMOs in the environment.

Key words: Biosensors, genetically modified organisms (GMO), introduction in natural ecosystems, expression of cloned genes, bioluminescence, biosafety GMO.

Создание генетически модифицированных организмов (ГМО) с новыми свойствами и их широкое использование в микробиологическом и сельскохозяйственном производстве, при биоремедиации почв и др. поставило серьезные проблемы, связанные с возможностью распространения ГМО в природе. Предварительная оценка вероятности и опасности распространения ГМО в природных экосистемах с помощью экологического и системного моделирования должна проводиться еще до их широкого использования на практике. Очевидна необходимость проведения широкомасштабных исследований биологии и экологии трансгенных микроорганизмов, растений, животных, создание более безопасных трансгенных организмов, как того требуют нормы международно-правового и национального законодательства по регулированию обращения ГМО.

Как в Российской Федерации, так и за рубежом в ряде ведущих лабораторий разрабатываются оригинальные индикаторные биосенсоры на основе морских светящихся бактерий и их генов, клонированных в других микроорганизмах [1,2]. Трансгенные микроорганизмы, содержащие в своем составе клонированные гены биоломинесценции, используются для быстрого контроля распространения как самих генно-инженерных организмов в экосистемах, так и трансгенов и рекомбинантных плазмид с различной эффективностью экспрессии клонированных генов и для оценки опасности их распространения.

Отличительной особенностью настоящих исследований, позволивших существенно продвинуться в изучении возможности и опасности распространения трансгенных микроорганизмов в природе, является использование генов бактериальной биоломинесценции, клонированных в *Escherichia coli* и других микроорганизмах. Использование клонированных на плаزمиде генов биоломинесценции позволяет связать непосредственно давление естественного отбора против трансгенных микроорганизмов с эффективностью экспрессии клонированных генов, - то, что до сих пор не проведено для трансгенных микроорганизмов с другими клонированными генами, и по вполне понятной причине: эффективность экспрессии других клонированных генов не так легко контролировать, как в случае люминесцентных генов. Так, например, важнейшая проблема сохранения и распространения R-плазмид, определяющих антибиотикоустойчивость среди болезнетворных микроорганизмов, все еще до сих пор никак не рассматривается в плане её связи с эффективностью экспрессии плазмидных генов резистентности [3,4]. Каковы же пути выхода из ситуации при случайной или намеренной интродукции ГМО в природные экосистемы, намечаемые популяционным подходом?

Прежде всего, следует отметить, что тотальная стратегия решительного уничтожения патогенных микроорганизмов (использование максимальных концентраций антибиотиков в течение длительного времени) оправдывает себя далеко не всегда [3,5]. Примером может служить широкое распространение популяций микроорганизмов, резистентных к антибиотикам (можно отметить в этой связи распространившиеся в мае-июне 2011 г. и в августе 2016 г. в европейских странах и получившие широкий резонанс в обществе эпидемии, вызванные патогенными штаммами бактерий *Escherichia coli*, устойчивых ко многим известным антибиотикам). Несомненно, в случае интродукции ГМО в природные экосистемы ситуация вполне может выйти из под контроля, если не использовать пути, намечаемые популяционным подходом. Изменение условий существования микробных популяций, вызванное человеческой активностью, создание новых экологических ниш приводит в действие движущую форму естественного отбора. И хотя здесь человечество имеет длинный ряд поражений в эволюционной «войне» с патогенными микроорганизмами, по-прежнему, все еще существуют несбыточные надежды на получение антибиотиков и лекарственных средств, "абсолютно эффективных" против патогенных микроорганизмов.

В этом направлении очень важной проблемой являются трудности контроля эффективности экспрессии различных клонированных генов не только в трансгенных бактериях, но и в других ГМО, в особенности, многоклеточных. Определенные успехи здесь достигнуты в последнее время именно благодаря одновременному клонированию интересующих генов и генов бактериальной биоломинесценции. Так, сравнение показывает, что клонированные гены биоломинесценции перспективнее для создания биосенсоров и биорепортеров, поскольку позволяют оценивать экспрессию клонированных генов на значительно меньших уровнях [1,2,4].

Для экспериментальной и теоретической оценки возможности выживания и распространения трансгенных микроорганизмов (ГМО) в природных экосистемах нами разработан модельный подход, включающий в себя: 1) модельный организм - *Escherichia coli* Z 905, содержащих плазмиды (pPHL7) с клонированными в них генами люминесцентной системы морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi*, плазмиды (pGLO) с клонированными генами зеленого флуоресцентного белка (GFP) из медузы *Aequoria victoria*, и плазмиды резистентности к антибиотикам; 2) набор лабораторных водных микрэкосистем различного объема, состава и степени замкнутости; 3) математическое моделирование динамики трофических звеньев микрэкосистем, связанных в круговороте биогенов.

Для исследования распространения трансгенных микроорганизмов в природе на клеточном уровне нами разработана стохастическая модель, основанная на анализе распределений клеток в популяции с различным числом копий плазмид. Математическая модель распределения клеток в популяции с различным числом копий плазмид в хемостате построена с использованием уравнения непрерывности, а в более общем случае - на уравнении Фоккера-Планка. Из общей математической модели при определенных предположениях можно получить весь набор моделей, аналогичных, описывающих сегрегационную, структурную или кинетическую нестабильность плазмид трансгенных микроорганизмов, возможность их передачи другим организмам с учетом различного уровня экспрессии клонированных генов. Получены решения модели для наиболее важных случаев сегрегационно нестабильных плазмид трансгенных бактерий в селективных и неселективных условиях. На экосистемном уровне с использованием программного обеспечения для системного моделирования STELLA™ (High Performance Systems Inc., USA) разработана системная модель интродукции трансгенных микроорганизмов в лабораторные и природные экосистемы различной степени сложности и замкнутости для прогнозирования сохранения и распространения генетически модифицированных микроорганизмов (ГМО) в окружающей среде. Разработанные в настоящей работе математические модели популяционной динамики трансгенных микроорганизмов после интродукции в модельные водные экосистемы различной степени сложности и замкнутости в сочетании с экспериментами могут быть взяты за основу для прогнозирования сохранения и опасности распространения генетически модифицированных организмов в различных природных экосистемах.

Оценка стоимости клонированных генов для трансгенных бактерий проведена в настоящей работе с учетом

зависимости продолжительности клеточного цикла бактерий от времени накопления белка, инициирующего репликацию хромосомы - DnaA. Для этого была разработана вероятностная модель синтеза этого белка с учетом конкуренции за рибосомы мРНК, детерминирующих синтез DnaA, с остальными мРНК (в том числе и плазмидными). Время накопления инициирующего количества DnaA (а, следовательно, и время генерации клеток) зависит от количества плазмидных мРНК, которое в свою очередь определяется размером и числом копий плазмид, а также эффективностью экспрессии клонированных генов. Эти важнейшие характеристики трансгенных бактерий, содержащих клонированные гены биолюминесценции, необходимы для использования их как биосенсоров распространения ГМО в окружающей среде.

В экспериментах по интродукции трансгенных бактерий *E.coli* Z 905 (ApR, Lux+) в лабораторные водные микрэкосистемы показано, что популяция трансгенных бактерий вполне конкурентоспособна с гетеротрофными микроорганизмами в водных лабораторных микрэкосистемах, что приводит к ее успешному включению в цепи питания микрэкосистем, как гетеротрофного звена. При различных уровнях абиотических факторов, например, при интенсивном цветении микроводорослей или его отсутствии, клетки трансгенных бактерий (ГМО), устойчиво сохраняются в составе микрофлоры микрэкосистемы в течение всего эксперимента. Среди результатов наших экспериментов по оценке риска неконтролируемого развития ГМО в природе можно отметить две относительно новые находки.

Первая связана с неожиданно высокой вероятностью переноса нового генетического материала через таксономические барьеры. Так, в наших экспериментах в водных микрэкосистемах отмечался перенос рекомбинантной плазмиды pPHL7 (клонированы *lux*-гены из морских светящихся бактерий) от донорного штамма *Escherichia coli* Z905 другим микроорганизмам, обитающим в модельных экосистемах. Причем экспрессия люминесценции у представителей водной микрофлоры сильно варьировала от уровня рекомбинантного штамма-донора до очень слабого проявления признака.

Вторая обнаруженная нами в экспериментах особенность заключается в замечательной способности у трансгенных бактерий всеми путями сохранять мобильные генетические элементы в клетках, пусть даже и в не активном функциональном состоянии. Несомненно, что она связана с существованием гибкой регуляции метаболической нагрузки (metabolic burden) на поддержание генетически модифицированных структур (в нашем случае это клонированные на плаزمиде гены биолюминесценции светящихся бактерий) в клетках ГМО. Смысл такой регуляции очевиден: это подстройка регуляции метаболизма клеток на выживание в различных естественных условиях. Удивляет другое: природные микроорганизмы, получив новые гены, как будто не желают с ними расставаться даже тогда, когда эти гены им не очень то и нужны. Остается предполагать, что в клетках трансгенных микроорганизмов, по-видимому, существуют механизмы, сберегающие чужеродные, но уже встроенные в геном мобильные генетические системы (в наших экспериментах - в составе плазмид) [6, 7]. Этот вывод не соответствует основным представлениям эволюционной биологии и экологии, но проблема существует и требует тщательного изучения.

Так, например, в наших экспериментах с трансгенными бактериями темновые варианты (содержащие в клетках клонированные гены биолюминесценции, но не светящиеся) наблюдались неоднократно при длительном культивировании (у природных светящихся бактерий их еще иногда называют К-вариантами). Раньше обнаруженные колебания численности нейтральных мутантов авторы объясняли "периодическим отбором" мутантов. В настоящей работе показано, что появления темновых вариантов у природных и трансгенных светящихся бактерий по феноменологии очень близки, но не являются разновидностью периодического отбора. Определение кинетических характеристик и затрат на поддержание (maintenance coefficient) различных темновых вариантов, проведенное в настоящем исследовании, показало, что в данном случае имеет место физиологическая адаптация светящихся бактерий, которая не наследуется, а, главное, темновые варианты – далеко не нейтральные спутники исходного светящегося вида природных и трансгенных бактерий. Таким образом, физиологическая адаптация светящихся бактерий к условиям роста в природных условиях, выражающаяся на клеточном уровне в "выключении" свечения (немутационном), позволяет популяции снизить энергетические затраты и благодаря этому выигрывать в конкуренции даже с темновыми вариантами, имеющими наследуемый генетический блок в люминесцентной системе, т.е. у мутантов.

В целом, разработанный в настоящей работе методический подход с использованием люминесцентных трансгенных бактерий как биосенсоров позволяет получить более полное представление о любом трансгенном микроорганизме, предполагаемом для интродукции в природные экосистемы. Мы полагаем, что именно такой многоуровневый подход (трансгенный организм - популяция - экосистема) и его исследование с проверкой в модельных экосистемах, близких по ключевым факторам к природным экосистемам будущего местообитания ГМО, дает возможность оценить возможные последствия интродукции ГМО в окружающую среду.

Список литературы / References:

1. *Bioluminescent Microbial Biosensors. Design, Construction, and Implementation*. Eds. Gerald Thouand & Robert S. Marks – CRC Press Taylor & Francis Group: Pan Stanford Publishing, 2016, 225 p.
2. Gogarten M.B. [et al.] *Horizontal Gene Transfer: Genomes In Flux*. Humana Press, 2009, 551 p.
3. Lukacisinova M., Bollenbach T. Toward a quantitative understanding of antibiotic resistance evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, vol. 46, pp. 90-97.

4. Mwinyikione Mwinyihija. An overview of selected *lux*-marked biosensors and its application as a tool to ecotoxicological analysis. In: *Biosensors: Properties, Materials and Applications*. Editors: R. Comeaux, P. Novotny. Nova Science Publishers, Inc., 2009, pp. 1-24.

5. Levin B.R., Baquero F., Johnsen P.J. A model-guided analysis and perspective on the evolution and epidemiology of antibiotic resistance and its future. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, vol. 19, pp. 83-89.

6. Craig MacLean R., San Millan A. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Current Biology*, 2015, pp. 764-767.

7. Yano H., Wegrzyn K., Loftie-Eaton W., Johnson J., Deckert G.E., Rogers L.M., Konieczny I., Top E.M. Evolved plasmid-host interactions reduce plasmid interference cost. *Mol. Microbiol.*, 2016, vol. 101, pp. 743-756.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИРОДНЫХ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ

Сафронюк С.Л., Кацев А.М.

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

бульв. Ленина, 5/7, г. Симферополь, 295051, РФ

e-mail: pharmalab01@mail.ru

Аннотация. В работе изучали биологическую активность лекарственных веществ с использованием биолоуминесцентных аналитических технологий (БАТ) на основе природных и генно-инженерных светящихся бактерий. По результатам тестирования природных бактерий на чувствительность к антибиотикам был выбран наиболее перспективный тест-штамм *Photobacterium leiognathi* Sh1. Показана применимость БАТ для анализа антибактериальных препаратов на примере гентамицина сульфата ($ЭК_{50}$ и $ЭК_{100}$ для которые составили 0,2 мг/мл и 0,4 мг/мл соответственно), тетрациклина гидрохлорида ($ЭК_{50} = 0,027$ мг/мл и $ЭК_{100} = 0,1$ мг/мл) и бензилпенициллина натриевой соли ($ЭК_{50}$ и $ЭК_{100}$ равные 0,8 мг/мл и больше чем 1 мг/мл, соответственно). Определено, что наиболее выраженной специфической (антибактериальной) активностью обладает тетрациклина гидрохлорид, производное полифункционального гидронафтаценового соединения.

Проведен биолоуминесцентный анализ лекарственных веществ других фармакологических групп, который выявил наличие веществ-ингибиторов свечения бактерий, а также группу препаратов, не влияющих на бактериальную люминесценцию. Сравнение структуры этих соединений и их биологической активности выявило наиболее вероятные фармакофоры (фенотиазин, триметиламин, триэтиламин, 1-пропиламин и др.), ответственные за их неспецифическую антибактериальную активность.

Показана применимость биотеста на хроническое действие с использованием морских светящихся бактерий, а также рекомбинантных биорепортерных штаммов на основе *Escherichia coli* (LUX) для более детального анализа биологической активности лекарственных веществ.

Ключевые слова: биотестирование, биологическая активность, лекарственные препараты, светящиеся бактерии, *Photobacterium leiognathi* Sh1.

NEW APPROACHES TO STUDY BIOLOGICAL ACTIVITY OF DRUGS WITH THE USE OF NATURAL AND RECOMBINANT BIOLUMINESCENT TEST-BACTERIA

Safronyuk S.L., Katsev A.M.

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU

Lenin Avenue, 5/7, Simferopol, 295051

e-mail: pharmalab01@mail.ru

Abstract. The biological activity of drugs was studied using bioluminescent analytical technologies (BAT), based on natural and genetically engineered luminescent bacteria. The most promising test-strain *Photobacterium leiognathi* Sh1 was revealed by means of the estimation of three bacteria species on the sensitivity to antibiotics. The applicability of BAT for the analysis of antibacterial drugs was shown on the base of gentamicin sulfate (EC_{50} and EC_{100} for which they were 0.2 mg / ml and 0.4 mg / ml, respectively), tetracycline hydrochloride ($EC_{50} = 0.027$ mg / ml and $EC_{100} = 0.1$ mg / ml) and benzylpenicillin sodium salt (EC_{50} and EC_{100} equal to 0.8 mg / ml and more than 1 mg / ml, respectively). Specifically, tetracycline hydrochloride, the derivative of the polyfunctional hydronaphthacene compound, was shown to have the most pronounced specific (antibacterial) activity.

Bioluminescent analysis of medicinal substances of other pharmacological groups showed both the presence of substances-inhibitors of bacterial luminescence and a group of drugs that do not affect bacterial luminescence. A comparison of the compounds' structure and their biological activity, defined the most probable pharmacophores (phenothiazine, trimethylamine, triethylamine, 1-propylamine, etc.) responsible for their nonspecific antibacterial activity.

The applicability of BAT on the base of marine luminescent bacteria for chronic biological effect study as well as on the recombinant bioreporter strains, based on *Escherichia coli* (LUX), were shown for further detailed analysis of the biological activity of drugs.

Key words: biotesting, biological activity, drugs, luminescent bacteria, *Photobacterium leiognathi* Sh1.