

НОВЫЕ ЧЕЛНОЧНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПЛАЗМИД БАКТЕРИИ HELICOBACTER PYLORI

А.М. Белова, Д.В. Басманов, В.В. Бабенко, Т.В. Митько, Д.В. Клинов, В.Н. Лазарев

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Бактерия *H. pylori* является важным участником формирования таких патологических состояний как острый и хронический гастрит, язвенная болезнь желудка, MALT-лимфома [1, 2] и по всей вероятности целого ряда других, в настоящее время ещё недостаточно расшифрованных с патогенетической точки зрения, заболеваний. Этот патоген отличается широким набором различных факторов вирулентности, а также метаболической и транскрипционной изменчивостью, что позволяет бактерии быстро адаптироваться к воздействию агрессивной среды желудка, а также иммунному ответу "хозяина" [3]. Считается, что плазмидные ДНК могут вносить определенный вклад в гетерогенность и адаптивный ответ штаммов *H. pylori*. Известно, что около 50 % клинических изолятов *H. pylori* содержат плазмиды [4 – 8], однако их функции и роль в патогенезе до сих пор остаются не до конца изученными. Кроме того, для данной бактерии существует необходимость расширить набор генно-инженерных инструментов путем создания челночных векторов, которые будут эффективно реплицироваться и стабильно поддерживаться в клетках данной бактерии. Целью данного исследования было выделение природных плазмидных ДНК из клеток клинических изолятов бактерии *H. pylori* и их характеристика. Также на основе двух различных природных плазмид (см. Рисунок 1) были сконструированы челночные векторы pSv2 и pSv4.

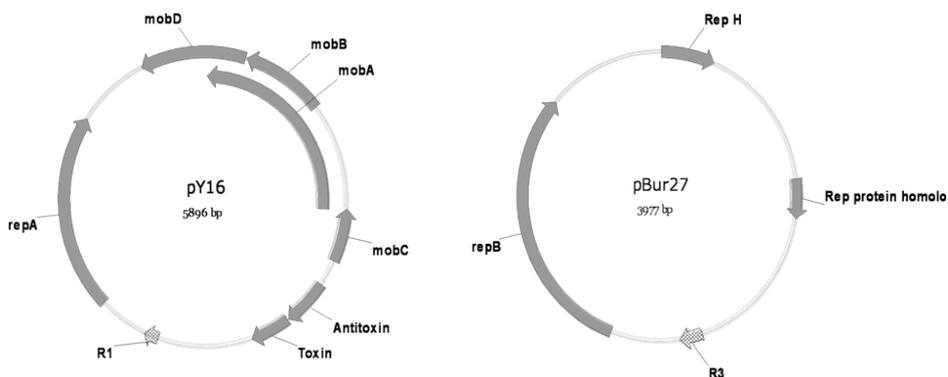


Рисунок 1. Генетические карты природных плазмид *H. pylori* pY16 и pBur27, использованных в качестве основы для создания pSv2 и pSv4. Гены семейства *rep* ответственны за репликацию плазмиды в клетках; гены семейства *mob* (*mobA/B/C/D*) участники процесса конъюгации; гены *Toxin/Antitoxin* относятся к генам системы токсин / антитоксин типа II, характерной для грамотрицательных бактерий; R1 / R3 – повторы типа 1 и типа 3, предположительная область начала репликации

Было показано, что векторы отличаются высокой стабильностью и могут быть успешно реализованы в клетках различных штаммов *H. pylori*. Кроме того в состав векторов был клонирован безпромоторный ген-репортер *gfp* (см. Рисунок 2). Промоторные области генов *vasA* и *ureA*, кодирующих хорошо охарактеризованные факторы вирулентности *H. pylori*, были слиты с геном *gfp* в составе челночных векторов.

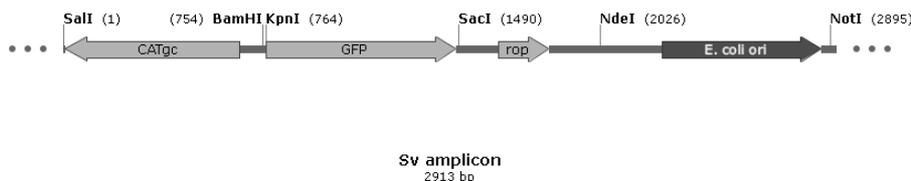


Рисунок 2. Генетическая карта ампликона, использованного для получения *H. pylori* / *E. coli* челночных векторов pSv2 и pSv4. *catGc* – ген устойчивости к хлорамфениколу в клетках *H. pylori* / *E. coli*; *gfp* – безпромоторный ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок GFP; *rop* – ген контроля копияности в клетках *E. coli*; *ori* – область начала репликации в клетках *E. coli*.

Таким образом, полученные нами векторы могли выступать в качестве репортерных систем в составе клеток *H. pylori*. Регистрация сигнала флуоресценции GFP от генетически модифицированных штаммов *H. pylori*, выявила чувствительность репортерных систем к воздействию на клетку осмотического стресса, кислотного стресса, повышенной концентрации Ni^{2+} или хелатирования железа (см. Рисунок 3).

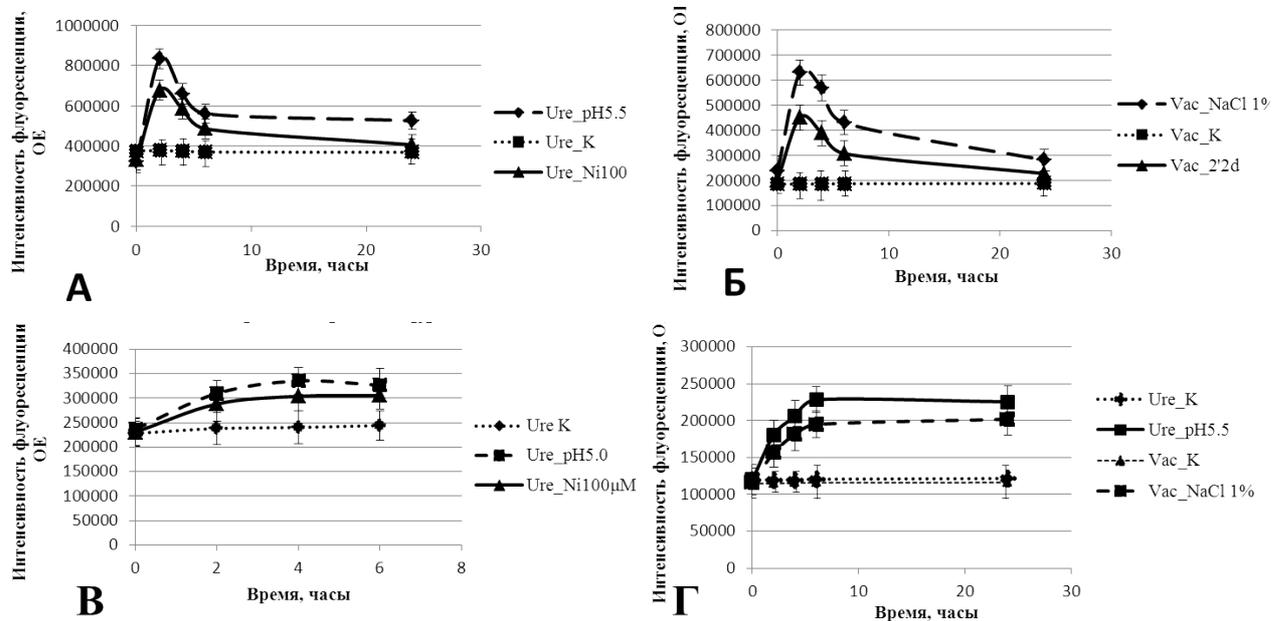


Рисунок 3. Сравнение чувствительности репортерных конструкций на основе плазмид pSv2, pSv4 и pHel в клетках штамма *H. pylori*. А. Модификация плазмидой pSv4-ure, клетки индуцировали кислотным pH и повышенными концентрациями Ni^{2+} . Б. Модификация плазмидой pSv4-vac, клетки индуцировали осмотическим стрессом и хелатированием железа. В. Модификация плазмидой pHel-ure, клетки индуцировали кислотным pH и повышенными концентрациями Ni^{2+} . Г. Модификации плазмидами pSv2-ure и pSv2-vac, клетки индуцировали кислотным pH (промотор ureA) и осмотическим стрессом (промотор vacA). В каждом эксперименте были собраны статистические данные для более чем 100 отдельных клеток. Каждый образец был продублирован. Эксперимент был повторен три раза

Кроме того, была проведена оценка эффективности полученных векторов по сравнению с широко используемым вектором pHel2. Полученные результаты подтверждают эффективность векторов pSv2 и pSv4 в качестве новых инструментов для различных генно-инженерных модификаций патогена *H. pylori*. Бактериальные клетки *H. pylori*, модифицированные такими конструкциями, планируется использовать для решения широкого спектра экспериментальных задач. В частности, для мониторинга регуляции критически значимых генов *H. pylori*, а также в качестве экспериментального объекта при исследованиях сорбции биомолекул на иммобилизованные на поверхности бактериальные клетки с помощью биосенсора на поверхностных оптических волнах в одномерном фотонном кристалле [9].

Исследования поддержаны Российский фондом фундаментальных исследований (грант № 18–32–00797).

ЛИТЕРАТУРА

1. Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.*; 1(8390) : 1311–5.
2. Ji-Hyun Seo, Hyun-Jeong Do, Chan-Hoo Park, Hyang-Ok Woo, Hee-Shang Youn, Gyung-Hyuck Ko1, Seung-Chul Baik, Woo-Kon Lee, Myung-Je Cho, Kwang-Ho Rhee and Jeong Hee Lee. 2013. *Helicobacter pylori* Infection and Duodenal Gastric Metaplasia in Healthy Young Adults. *Korean J. Gastroenterol.*; 61(4) : 191–195.

3. Alm R.A., Ling L.S., Moir D.T., et al. 1999. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*; 397:176–80.
4. Penfold, S.S., A.J. Lastovica, and B.G. Elisha. 1988. Demonstration of plasmids in *Campylobacter pylori*. *J. Infect. Dis.*; 157:850–851.
5. Heuermann, D., and R. Haas. 1995. Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene*; 165:17–24.
6. Kleanthous H., C.L. Clayton, and S. Tabaqchali. 1991. Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*; 5:2377–2389.
7. Minnis, J.A., T.E. Taylor, J.E. Knesek, W.L. Peterson, and S.A. McIntire. 1995. Characterization of a 3.5-kbp plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid*; 34:22–36.
8. De Ungria, M.C., T. Kolesnikow, P.T. Cox, and A. Lee. 1999. Molecular characterization and interstrain variability of pHPS1, a plasmid isolated from the Sydney strain (SS1) of *Helicobacter pylori*. *Plasmid*; 41:97–109.
9. Olga V. Morozova, Olga A. Levchenko, et.al. 2019. Surface modification with polyallylamines for adhesion of biopolymers and cells. *International Journal of Adhesion and Adhesives*; 92:125–132.