

ВЛИЯНИЕ РАСПОЛОЖЕНИЯ И ОРИЕНТАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТОКСИН-АНТИТОКСИНОВОГО ЭЛЕМЕНТА *hok/sok* НА УРОВЕНЬ БИОСИНТЕЗА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БЕЛКОВ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

© 2023 Ю.А. Ходак, Р.Р. Шайфутдинов, Д.С. Хасанов,
Н.А. Орлова, И.И. Воробьев*

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии,
117312 Москва, Россия; электронная почта: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2023

После доработки 15.08.2023

Принята к публикации 15.08.2023

Генетический токсин-антитоксिन элемент *hok/sok* из плазмиды R1 *Escherichia coli* обеспечивает сегрегационную стабильность плазмид. Бактериальные клетки, потерявшие все копии плазмиды, кодирующей короткоживущий антитоксин, гибнут под действием долгоживущего токсина. Элемент *hok/sok* в составе векторных плазмид для бактериальной экспрессии может увеличивать продуктивное время биосинтеза рекомбинантных белков, замедляя накопление в популяции непродуцирующих клеток, лишенных целевой плазмиды. В настоящей работе были исследованы различные варианты расположения и ориентации элемента *hok/sok* в составе стандартной плазмиды pET28a с индуцибельным промотором T7lac и геном устойчивости к канамицину. Было обнаружено, что элемент *hok/sok* сохраняет функциональную активность вне зависимости от расположения на плазмиде и ориентации, бактериальные клетки сохраняли плазмиды с *hok/sok* после 4-х дней культивирования без антибиотика и теряли контрольную плазмиду без данного элемента. На примере трех целевых белков – аспаргиназы *E. coli* тип II, гормона роста человека и нуклеопротеина вируса SARS-CoV-2 было продемонстрировано, что для цитоплазматических целевых белков максимальная продуктивность бактерий сохраняется только при расположении элемента *hok/sok* на плазмиде выше промотора целевого гена. В случае периплазматической локализации белка продуктивность бактерий уменьшается для всех вариантов расположения *hok/sok* при культивировании с антибиотиком, а при периодическом культивировании бактерий без антибиотика продуктивность лучше сохраняется также при расположении элемента *hok/sok* выше промотора целевого гена. Данный вариант векторной плазмиды pENU позволяет увеличить биосинтез нерасстворимого в цитоплазме бактерий гормона роста человека более, чем в 2 раза при культивировании бактерий без антибиотика, а также поддерживать биосинтез аспарагиназы при периодическом культивировании без антибиотика в течение 4-х дней на уровне не менее 10 мг/литр. Разработанный сегрегационно стабилизированный плазмидный вектор может быть использован для получения в клетках *E. coli* различных рекомбинантных белков без применения антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетерологичная экспрессия рекомбинантных белков, системы токсин-антитоксин, аспарагиназа, нуклеопротеин, соматотропин.

DOI: 10.31857/S0320972523090129, EDN: WUOWEN

ВВЕДЕНИЕ

Обеспечение сегрегационной устойчивости плазмид в бактериальных системах экспрессии генов остается актуальной задачей биофармацевтики. Удаление всех копий плазмиды, кодирующей ген гетерологичного белка,

обеспечивает бактериальной клетке значительное преимущество в скорости деления. Вследствие этого даже при времени индукции промотора целевого гена 4–8 ч популяция бактерий-продуцентов обычно замещается непродуцирующими клетками, что приводит к ограничению общей продуктивности системы [1].

Принятые сокращения: ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; ОРС – открытая рамка считывания; ТА – токсин-антитоксин; АСН – L-аспарагиназа; HGH – гормон роста человека; NP – нуклеопротеин варианта «Ухань» коронавируса SARS-CoV-2.

* Адресат для корреспонденции.

Базовую защиту бактериальных клеток от потери плазмиды обеспечивает ген устойчивости к действию антибиотика, однако для плотных бактериальных культур концентрация селективного антибиотика в ростовой среде постепенно падает под действием инактивирующих его ферментов и становится слишком низкой [1]. Возможен второй уровень защиты бактериальных клеток от потери целевых плазмид — это введение в них природных или модифицированных пар генов токсин-антитоксин (ТА), обеспечивающих немедленную смерть бактериальной клетки, потерявшей все активные копии гена антитоксина.

Генетические элементы ТА присутствуют в большом числе копий в геномах прокариот [2], плаزمидах [3] и бактериофагах [4]; для некоторых свободноживущих бактерий описывают более 40 таких генетических элементов [2]. Данные системы классифицируют на основании способа нейтрализации токсина антитоксином. Традиционно их разделяли на 6 типов, однако в последние годы было выделено еще 2 новых типа, таким образом, их общее число достигло 8 [5]. Наиболее изученным и распространенным является тип I, состоящий из гена стабильного токсичного белка и малостабильной антисмысловой РНК, блокирующей трансляцию мРНК токсина [2]. Исследуемый в настоящей работе локус *hok/sok* (host killing/suppressor of killing) относится к первому типу систем ТА, механизм его действия будет подробно описан ниже.

Тип II систем ТА представляет собой пару генов, кодирующих стабильный белковый токсин и нестабильный белковый антитоксин. Типичный пример системы ТА типа II — локус *ccd*, содержащий ген токсичного для бактериальной клетки ингибитора ДНК-гиразы CcdB и ген малостабильного ингибитора CcdA, подверженного быстрому распаду под действием протеазы Lon [6]. При потере всех копий плазмиды, кодирующей локус *ccd*, концентрация белка CcdA быстро уменьшается и свободный белок CcdB блокирует активность ДНК-гиразы *E. coli* в достаточной мере для прекращения клеточного деления и индукции SOS-ответа [7].

Остальные типы систем ТА распространены значительно реже и характеризуются другими способами взаимодействия токсина и антитоксина. Системы типа III основаны на прямом взаимодействии антитоксической РНК с белковой молекулой токсина [8]; системы типа IV — на блокировании функции токсина без прямого белок-белкового взаимодействия, например, путем катализа антитоксином об-

ратной химической реакции для пары *DarT/DarG* [9]; системы типа V — на селективном разрушении мРНК токсического белка белковым антитоксином, как в паре *GhoT/GhoS* [10]. В типе VI систем ТА, разновидности систем типа II, белковый антитоксин SocB является протеолитическим адаптером, обеспечивающим быстрый протеолиз токсина SocA клеточной протеазой ClpXP [11]. Недавно был выделен новый VII-тип систем, включающий антитоксина, ферментативно модифицирующие токсины. В отличие от систем типа II, в данном случае модификации вносятся в процессе кратковременного, а не постоянного взаимодействия между токсином и антитоксином [12]. В последнем описанном VIII-типе систем в качестве токсина выступают малые РНК, блокирующиеся антисмысловыми РНК, которые кодируются в том же локусе и выступают в качестве антитоксина [13].

Первые системы ТА были открыты при изучении природных плазмид *E. coli* и, по исходным предположениям исследователей, их биологической функцией было обеспечение сегрегационной стабильности таких плазмид. В дальнейшем было обнаружено, что системы ТА вовлечены в обеспечение персистенции бактерий [14], ответа на факторы стресса и защиту от бактериофагов [15]. Несмотря на крайне высокое разнообразие генетических оперонов систем ТА, их известные токсины атакуют очень небольшой набор биохимических процессов бактериальной клетки — трансляцию мРНК, репликацию хромосомной ДНК, рост клеточной стенки и поддержание мембранного потенциала.

Рассматриваемый в настоящей работе генетический локус *hok/sok* относится к системам ТА типа I. Он был впервые обнаружен в плазмиде R1 *E. coli* [16], исходно обозначен как ParB и описан как оперон двух цистронов *hok* и *sok*. Матричная РНК гена *hok* кодирует токсичный полипептид размером 52 аминокислоты, который нарушает поляризацию внутренней мембраны бактерий за счет формирования пор, что приводит к стазису и/или гибели бактериальных клеток [17]. Ген *sok* обладает сильным промотором и кодирует антисмысловую РНК, связывающуюся с участком мРНК *hok* и обеспечивающую быструю деградацию мРНК *hok* под действием РНКазы III. Несмотря на кажущуюся очевидность механизма действия генов токсина и антитоксина в паре *hok/sok*, их фактическое взаимодействие является достаточно сложным и многоступенчатым процессом, подробно описанным в обзорной работе Gerdes [18].

Вкратце, большая часть мРНК *hok* образуется в форме трансляционно неактивного продукта увеличенной длины, который может быть описан как продукт гена *tok*, перекрывающего ген *hok*. В данной мРНК с размером ~400 п.о. 5'- и 3'-концевые области образуют дуплекс, блокирующий ее связывание с рибосомами и с антисмысловой РНК *Sok*. Стабильная и неактивная форма мРНК (400 п.о.) медленно превращается в активную форму размером 360 п.о. в результате удаления 3'-фрагмента под действием РНКазы II. Активная мРНК *hok* становится доступной для связывания антисмысловой РНК *Sok*, сайт связывания которой расположен вблизи первого кодона AUG [8]. Возникающий гетеродуплекс РНК быстро гидролизует РНКазой III [19, 20]. Если в клетке нет достаточных количеств РНК *Sok*, то стартует трансляция мРНК *hok*, вырабатывается белок Нок, который формирует мембранные поры, что приводит к переходу клеток в персистирующее состояние, а при дальнейшем росте концентрации Нок возникает состояние стазиса и клеточной смерти.

Предположительно, уровень антисмысловой РНК *Sok* в клетке определяется не только активностью копий ее гена, но и механизмом отрицательной обратной связи, включающим мембрано-ассоциированную РНКазу E, активность которой снижается при деполяризации мембраны [18], таким образом, антитоксическое действие *Sok* сохраняется даже при недостаточном уровне транскрипции гена, однако при потере всех копий гена *sok* данный механизм уже не может действовать.

В геноме базового лабораторного штамма K12 *E. coli* выявляется до 5 локусов типа *hok/sok* [21], при этом 4 из них, по мнению группы Gerdes, инактивированы мутациями вблизи открытой рамки считывания (ОРС) *hok* [22], а единственный активный локус *hokB/sokB*, по-видимому, участвует в регуляции входа и выхода клеток в состояние персистенции за счет процессинга белка НокВ протеазами периплазмы [23]. Также локус *hokB/sokB* определяет, наряду с другими локусами ТА, повышение устойчивости бактериальных клеток к стрессовым условиям [24] путем увеличения продолжительности лаг-фазы и последующего увеличения скорости роста на экспоненциальной фазе.

Увеличение сегрегационной стабильности искусственных, т.е. обычных лабораторных плазмид при включении в их состав локуса *hok/sok* было продемонстрировано во множестве работ. В частности, в работе Pecota et al. [25] наблюдали 9-кратное замедление процесса по-

тери клетками *E. coli* плазмид в неселективных условиях. В случае плазмиды с индуцибельным промотором T7 и селективным маркером устойчивости к действию тетрациклина было заявлено сохранение у 100% клеток устойчивости к антибиотику после 20 ч индукции целевого гена, при этих условиях контрольную плазмиду сохраняли только 17% клеток [26], уровень биосинтеза целевого белка — пролактина человека, был увеличен в 2,3 раза, хотя и оставался достаточно низким.

В случае токсичной для бактериальных клеток фосфолипазы D из *Streptomyces antibioticus* введение элемента *hok/sok* в состав плазмид с промотором T7lac и геном устойчивости к ампициллину привело к исчезновению клеток, терявших плазмиду при ведении культуры до индукции и позволило удвоить общий уровень биосинтеза ферментативно активной фосфолипазы, однако быстрое исчезновение клеток с плазмидой после начала индукции было зафиксировано как для контрольных плазмид, так и для плазмид с локусом *hok/sok* и другими локусами ТА [27].

Генетический элемент *hok/sok* увеличивает устойчивость плазмид не только в *E. coli*, но и в иных видах бактерий, в частности, в *Salmonella enterica* (серовар Typhi) [28] и *Vibrio cholerae* [29]. В случае сальмонеллы при 24-часовой культивировании в селективной среде плазмиды с локусом *hok/sok* сохранялась у 48% клеток, контрольная плазмиды — у 13% клеток. При культивировании холерного вибриона с плазмидами, содержащими локус *hok/sok*, в течение 4-х дней все клетки сохраняли способность экспрессировать ген люциферазы, кодируемый плазмидами, однако в данном исследовании не использовались контрольные плазмиды, не содержащие локуса *hok/sok*.

Несмотря на то что локус *hok/sok* изучен значительно лучше, чем другие локусы ТА, и применялся для стабилизации плазмид различных типов, в литературе отсутствуют данные о его фактическом влиянии на свойства широко распространенных в биофармацевтике экспрессионных плазмид с индуцибельным сильным промотором T7lac и селекционным маркером устойчивости к канамицину. Мы предположили, что инсерция генетического локуса *hok/sok* в плазмиды данного типа может в достаточной мере увеличить их сегрегационную устойчивость в процессе индукции промотора целевого гена и, как следствие, значимо увеличить продуктивное время индукции, т.е. общую продуктивность бактериальной системы экспрессии гетерологичных белков.

Последовательности праймерных олигонуклеотидов

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Сайт рестрикции
AS-HOS-F5	ACACGTGGATCCAACAAACTCCGGGAGGCAGCGTGATGCGG	<i>PspCI</i>
AS-HOS-R5	TCACGTGCATGCACAACATCAGCAAGGAGAAAGGGGCTACCGG	<i>PspCI</i>
AD-Asp-NcoF	ACCATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCACTT	<i>NcoI</i>
AD-Asp-HindR	TAAGCTTCTATTAGTACTGATTGAAGATCTGCTGG	<i>HindIII</i>
M13-dir	GTTGTAAACGACGGCCAGTG	
T7prom	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение векторных плазмид pEHU, pEND, pEHR. Участок *hok/sok* природной плазмиды R1 *E. coli* (GenBank X05813), фланкированный сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции *PspCI*, *BamHI* и *SphI* синтезировали в «Synbio Technologies» (Китай) и клонировали в плазмиду pUC57. Плазмиду pUC57-HS секвенировали со стандартных праймеров M13, после чего элемент клонировали в плазмиду pET28a (+) («Novagen», США) двумя разными способами. Для получения вектора pEHU, где элемент *hok/sok* расположен до целевого гена, реципиентную плазмиду pET28a расщепляли эндонуклеазами BglII и SphI и лигировали с элементом *hok/sok*, расщепленным *BamHI* и *SphI*. Для получения векторов pEND и pEHR, где элемент *hok/sok* расположен после целевого гена, реципиентную плазмиду pET28a расщепляли эндонуклеазой PstI и лигировали с элементом *hok/sok*, расщепленным эндонуклеазой *PspCI*. Методом ПЦР определяли ориентацию вставки с использованием праймеров T7prom и AS-HOS-F5 или AS-HOS-R5 (таблица). Плазмида pEND содержала вставку в прямой ориентации, плазмида pEHR – в обратной ориентации.

Получение экспрессионных плазмид. ОПС природного гена L-аспарагиназы (ASN) *E. coli* получали методом ПЦР с адапторных праймеров AD-Asp-NcoF и AD-Asp-HindR (таблица), содержащих сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции для последующего клонирования, используя геномную ДНК *E. coli* штамма BL21[DE3] («Novagen») в качестве матрицы и набор и Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия). Продукт ПЦР выделяли из 1%-ного агарозного геля, клонировали в Т-вектор pAL2-T

(«Евроген»), секвенировали со стандартных праймеров T7prom и M13rev (таблица).

ОПС нуклеопротеина (NP) варианта «Ухань» коронавируса SARS-CoV-2 и экспрессионные конструкции на ее основе получали, как описано в статье Kolesov et al. [30].

Оптимизированную для экспрессии в *E. coli* последовательность ОПС гормона роста человека (HGH) с метионином [–1] и двумя стоп-кодонами синтезировали в ООО «Клонинг Фасилити» (Россия), клонировали в pAL2-T, секвенировали со стандартных праймеров к вектору.

Экспрессионные векторы pET28a, pEHU, pEND, pEHR рестрицировали по сайтам *NcoI* и *HindIII* и лигировали с фрагментами, содержащими ОПС целевых белков, вырезанными по сайтам *NcoI* и *HindIII* в случае аспарагиназы, или *PciI* и *HindIII* – в случае нуклеопротеина и гормона роста человека.

Полученные плазмиды pET28-ASN, pEHU-ASN, pEND-ASN, pEHR-ASN; pET28-NP, pEHU-NP, pEND-NP, pEHR-NP; pET28-HGH, pEHU-HGH, pEND-HGH, pEHR-HGH секвенировали с праймеров T7prom и T7t и использовали для трансформации клеток BL21[DE3] («Евроген»); трансфицированные клетки далее были использованы в опытах по биосинтезу целевых белков.

Плазмидную ДНК выделяли набором Plasmid Miniprep («Евроген»), очистку рестриционных фрагментов и продуктов ПЦР из агарозного геля проводили набором Cleanup Standard («Евроген»). Использовали эндонуклеазы рестрикции производства ООО «СибЭнзайм» (Россия) и Т4-ДНК-лигазу («Евроген»).

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН.

Культивирование штаммов-продуцентов и получение образцов для ДСН-ПААГ. Выращивание бактерий вели в среде либо 2x Yeast extract and Trypton (2x YT) состава (из расчета на литр): казеиновый пептон — 16 г, дрожжевой экстракт — 10 г, NaCl — 5 г, pH среды — $7,0 \pm 0,2$; либо в среде Terrific broth (ТВ) состава (из расчета на литр): триптон — 12 г, дрожжевой экстракт — 24 г, гидрофосфат калия — 12,54 г, дигидрофосфат калия — 2,31 г, pH среды — $7,0 \pm 0,2$.

Посевную культуру получали в среде 2x YT, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 1% глюкозы, в течение 14–18 ч при 37 °C и 160 об./мин, если не указано иное. Инокулировали полученным посевным материалом в соотношении 1 : 1000 250 мл сред 2x YT или Terrific broth, дополненных 30 мкг/мл канамицина и 0,1% глюкозы, растили культуру на качалке в течение 3,5 ч при 37 °C, добавляли в качестве индуктора ИПТГ до конечной концентрации 0,2–1 мМ и растили в течение 3–30 ч при температуре 30–37 °C.

Культивирование штаммов с плазмидами, кодирующими ASN, HGH и NP, для электрофоретического анализа проводили следующим образом: стартовую культуру получали в среде 2x YT, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 1% глюкозы, в течение 14–18 ч при 37 °C. Инокулировали полученным посевным материалом в соотношении 1 : 50 5 мл среды 2x YT, содержащей 0,1% глюкозы с 30 мкг/мл канамицина; растили культуру на качалке в течение 1 ч при 37 °C, затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и растили в течение 18 ч при температуре 30 °C (NP) и 37 °C (HGH и ASN). Осадок биомассы отделяли центрифугированием (30 с 12 200 g), ресуспендировали в буфере (1/5 объема исходной аликвоты) для образцов (25 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 50 мМ ДТТ, 1% ДСН, 5% глицерина и 0,05% бромфенолового синего), прогревали 5 мин при 95 °C. Проводили электрофоретический анализ (12%-ный ДСН-ПААГ) белковых фракций, гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси синий («Диа-М», Россия), сканировали при помощи планшетного сканера в просвечивающем режиме Epson Perfection V700 Photo («Epson», Япония). Получаемое изображение геля с глубиной цвета 16 бит/канал анализировали с помощью программы TotalLab («Nonlinear Dynamics», Великобритания).

Анализировали распределение целевого белка по фракциям растворимых и нерастворимых белков. Для этого отделяли осадок биомассы центрифугированием, бактерии ресуспендировали в растворе для лизиса (1/10 объема исходной аликвоты), содержащем

50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 10 мкг/мл лизоцима и 0,1% (v/v) Triton X-100, и инкубировали 30 мин на льду. Разрушали геномную ДНК клеток ультразвуковым диспергатором («Misonix», США) пульсами по 10 с до исчезновения повышенной вязкости суспензии. Отделяли осадки центрифугированием (10 мин при 12 200 g). Фракцию нерастворимых белков (телец включения) повторно ресуспендировали в растворе (1/10 объема исходной аликвоты), содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4) и 500 мМ NaCl, и отделяли супернатант центрифугированием (10 мин при 12 200 g). Проводили ДСН-ПААГ-анализ белковых фракций (12%-ный ДСН-ПААГ), гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси синий («Fermentas», Литва), сканировали при помощи планшетного сканера в просвечивающем режиме. Получаемое изображение геля с глубиной цвета 16 бит/канал анализировали с помощью программы TotalLab, в качестве калибратора интенсивности окраски полос использовали бычий сывороточный альбумин («Диа-М»), по 0,25–2 мкг на дорожку.

Определение доли бактериальных клеток, способных к колониеобразованию в присутствии канамицина. Готовили посевную культуру штаммов, как указано выше. Вели выращивание культур без канамицина — переносили 1 мл посевной культуры в стерильную микропробирку, и отделяли среду с остатками антибиотика центрифугированием, ресуспендировали осадок клеток в 1 мл 2x YT. Инокулировали полученной суспензией в соотношении 1 : 100 5 мл 2x YT, содержащей 0,1% глюкозы, но без канамицина, растили культуру 2 ч, после чего добавляли ИПТГ до 0,2–2 мМ и продолжали культивирование в течение 8–24 ч. Отбирали аликвоты тестируемых культур, при помощи стерильной среды 2x YT делали последовательные 100-кратные разведения. Из разведений культур с кратностью 10 тыс и 1 млн высевали по 250 мкл бактериальных суспензий на чашки Петри с агаризованной средой 2x YT, содержащей 1% глюкозы, с добавлением и без добавления 30 мкг/мл канамицина. Инкубировали при 37 °C 14–18 ч и подсчитывали число колоний.

Измерение ферментативной активности аспарагиназы. Отделяли бактерии от культуральной среды и проводили их лизис с Triton X-100 и лизоцимом, как указано выше. Для измерения активности использовали аликвоты суспензии лизированных бактерий, типичное разведение — 100 раз. Исследуемые образцы (≤ 100 мкл), содержащие не более 0,3 МЕ аспарагиназы, смешивали с 20 мкл раствора Tris-HCl (pH 8,5) до конечной концентрации

по Tris — 50 мМ, добавляли 17 мкл 100 мМ L-аспарагина и инкубировали ровно 10 мин при +37 °С. Аналогично готовили раствор отрицательного контрольного образца, в который вместо лизата добавляли 100 мкл буферного раствора для лизиса, не содержащего аспарагиназной активности, также проводили его инкубацию (10 мин при +37 °С). Активность аспарагиназы в лизате клеток, отобранных до внесения индуктора, составляла менее 1% от типичной активности аспарагиназы в индуцированных клетках.

Реакцию гидролиза останавливали добавлением 100 мкл 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты в воде. При появлении видимого осадка его отделяли центрифугированием (10 мин, 14 100 g). Супернатант полностью переносили в новую пробирку.

В пробирку калибратора вносили 137 мкл раствора 0,5 мМ сульфата аммония (1 мМ ионов аммония), затем вносили 100 мкл раствора ТХУ. Во все пробирки вносили по 650 мкл разведенного реактива Несслера, полученного смешиванием 550 мкл очищенной воды («Milli-Q», Германия) и 100 мкл готового реактива Несслера («Уральский завод химической продукции», Россия). Растворы перемешивали на вортексе и выдерживали ~10 мин при комнатной температуре. Измеряли поглощение при длине волны 480 нм при помощи спектрофотометра, рассчитывали концентрацию ионов аммония по поглощению калибровочного образца (0,5 мМ сульфата аммония).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку производили в программе Microsoft Excel при помощи модуля Data Analysis. Первичные данные и статистические расчеты приведены в Приложениях 1–6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вследствие того, что в плаزمиде типа рЕТ действуют не менее трех достаточно сильных промоторов — T7lac, lac, KanR, мы предположили, что уровни транскрипции смысловой и антисмысловой РНК *Hok* (*Mok*) и *Sok* могут быть существенно изменены из-за активности близлежащих сильных промоторов. Для проверки влияния позиционного и ориентационного эффектов для генетического локуса *hok/sok* были получены 3 плазмиды — рЕНУ, рЕНД и рЕНР (рис. 1, а). В случае плазмиды рЕНУ локус *hok/sok* был помещен upstream от сильного индуцибельного промотора T7lac и ориентирован таким образом, чтобы продолжение транскрипции гена *hok* за его терминатор

транскрипции не создавало антисмысловую мРНК для целевого гена. В случае плазмид рЕНД и рЕНР локус *hok/sok* располагался downstream от промотора T7lac, после терминатора транскрипции целевого гена, т.е. уровни мРНК генов, кодирующих *Hok* и *Sok*, могли изменяться при неполной терминеции транскрипции как целевого гена с индуцибельным промотором, так и гена устойчивости к действию канамицина (*KanR*) с конститутивным промотором. Плазмиды рЕНД и рЕНР различались ориентацией локуса *hok/sok* — в плазмиде рЕНД неполная терминеция транскрипции целевого гена могла приводить к возрастанию уровня антитоксической РНК *Sok*, а неполная терминеция транскрипции гена *KanR* — к возрастанию уровня мРНК *hok*. В случае плазмиды рЕНР влияние неполной терминеции было обратным — промотор целевого гена мог увеличивать уровень мРНК токсина.

Таким образом, в плазмиде рЕНУ уровни транскрипции *hok* и *sok* не должны были изменяться при индукции промотора основного гена; в плазмиде рЕНД возможно возрастание уровня транскрипции *sok* при индукции целевого гена, а в плазмиде рЕНР — возрастание уровня транскрипции *hok*, что потенциально может приводить к токсическому поражению клеток при индукции целевого гена.

Для сравнения фактической сегрегационной стабильности полученных плазмид и влияния их структуры на уровень экспрессии генов целевых белков в них клонировали ОРС трех типичных рекомбинантных белков — природную ОРС аспарагиназы *E. coli* типа II, как нетоксичного для *E. coli* растворимого белка с периплазматической локализацией; кодон-оптимизированную ОРС гормона роста человека, как малотоксичного для *E. coli* нерастворимого в цитоплазме белка; а также кодон-оптимизированную ОРС нуклеопротеина коронавируса SARS-CoV-2, как пример умеренно токсичного для клеток преимущественно растворимого в цитоплазме белка. Электрофореграммы, демонстрирующие распределение указанных белков по фракциям, приведены на рис. 1, б.

Для плазмид с ОРС аспарагиназы была проверена сегрегационная стабильность при периодическом культивировании в жидкой среде без антибиотика и без индуктора экспрессии целевого гена. Для всех вариантов расположения *hok/sok* (конструкции рЕНД-ASN, рЕНР-ASN и рЕНУ-ASN) плазмиды сохранялись в течение как минимум 8 дней, а доля клеток, сохранивших контрольную плазмиду рЕТ28a-ASN, составила менее 10% через 1 день культивирования, т.е. приблизительно через 20 ге-

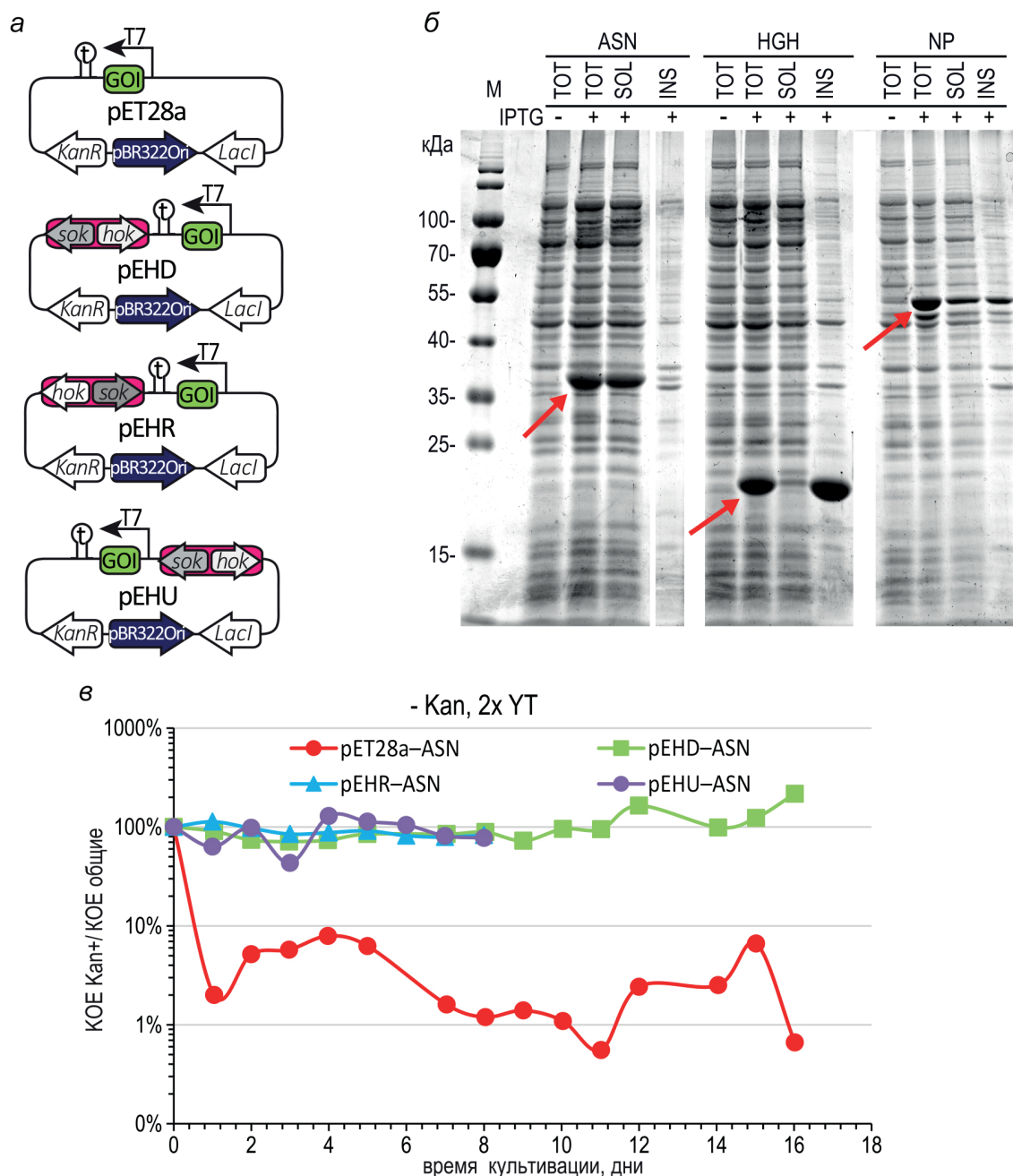


Рис. 1. Схемы вариантов сегрегационно-стабилизированных векторных плазмид, электрофореграммы белковых фракций штаммов-продуцентов, динамика элиминации плазмид. *а* – Схема экспрессионных векторных плазмид, обозначения: T7 – промотор целевого гена; GOI – область OPC целевого белка; t – терминатор транскрипции целевого гена; *KanR* – ген устойчивости к канамицину NPT II/Neo; pBR322Ori – вариант области начала репликации плазмид ColE1; *LacI* – ген белка-репрессора LacI; *hok* и *sok* – гены локуса *hok/sok*. Стрелками обозначены направления транскрипции генов. *б* – Электрофореграмма тотального белка (TOT), фракций растворимых (SOL) и нерастворимых (INS) белков клеток штаммов BL21[DE3]/pET28a-ASN, BL21[DE3]/pET28a-HGH, BL21[DE3]/pET28a-NP при индукции 1 мМ ИПТГ 3 ч, +30 °С. Обозначения: М – маркер молекулярных масс. Молекулярные массы полос маркера указаны в кДа. Положения целевых белков указаны стрелками. *в* – Динамика элиминации плазмид при периодическом культивировании штаммов в среде 2x YT без канамицина, без ИПТГ, +37 °С; кратность пересева – 1000×; пересев 1 раз в 24 ч; в дни 6 и 13 пересев для штаммов BL21[DE3]/pET28a-ASN и BL21[DE3]/pEHD-ASN проводился, но измерение числа КОЕ не проводилось. Не менее 25 колоний для чашек без канамицина. Для всех дней, кроме дня 0, по критерию Пирсона (хи-квадрат) доля канамицин-устойчивых КОЕ для плазмиды pET28a-ASN достоверно отличается от долей канамицин-устойчивых КОЕ для остальных плазмид; $P < 0,001$

нераций клеток (рис. 1, *в*). При индукции экспрессии гена аспарагиназы в присутствии антибиотика канамицина при помощи 1 мМ ИПТГ

скорость накопления целевого белка была сходной для всех вариантов плазмиды (рис 2, *а*), таким образом, в этих условиях генетический

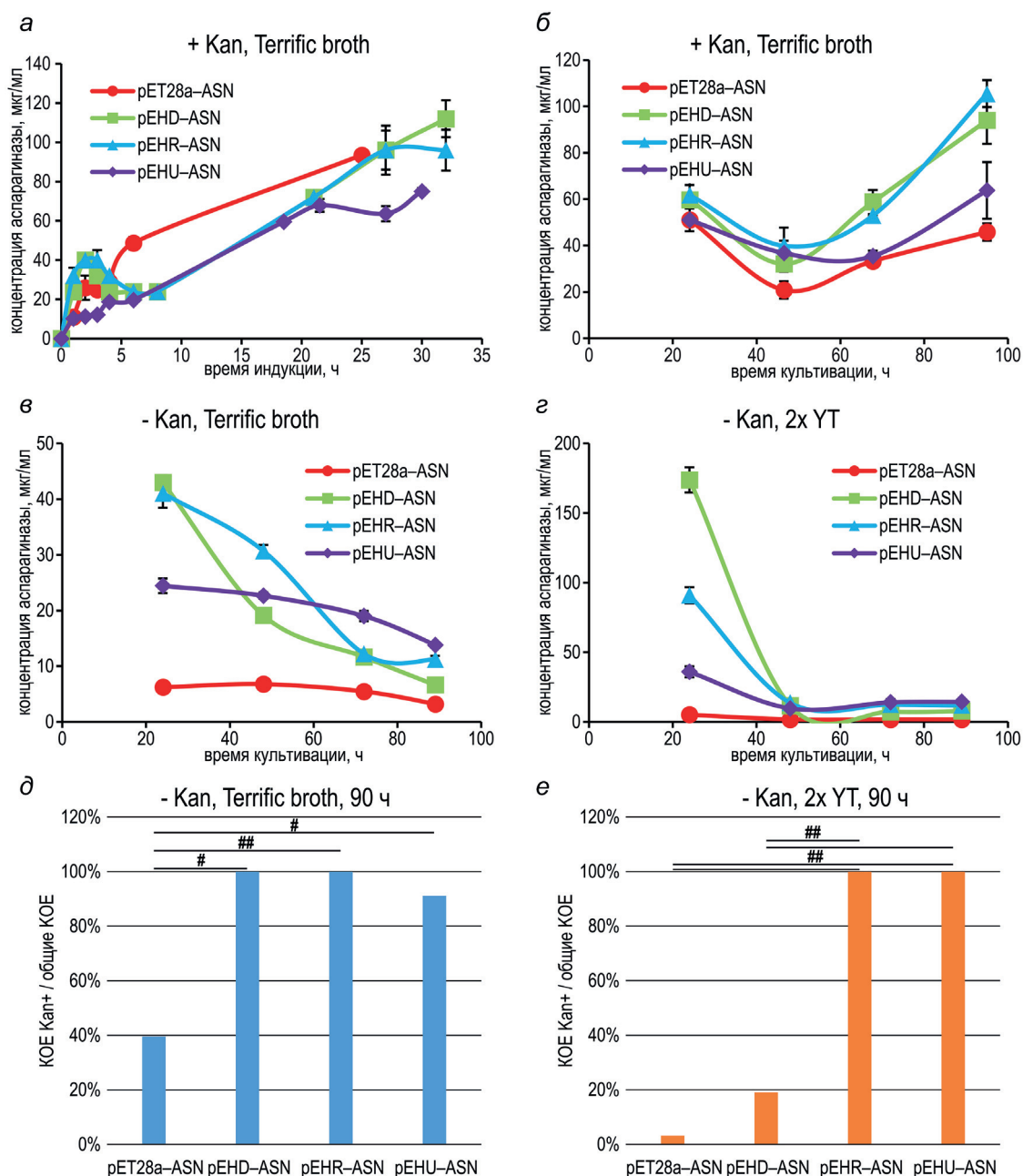


Рис. 2. Динамика накопления аспарагиназы и элиминации плазмид при культивировании штаммов в различных условиях. Концентрацию аспарагиназы измеряли, как ее ферментативную активность в лизате клеток, условия культивирования обозначены над соответствующими панелями. *а* – Культивирование без пересевов. *б–г* – Пересевы с кратностью 1×1000 каждые 24 ч. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n = 2$, биологические повторы. *д* и *е* – Определение КОЕ для культур, соответствующих точкам 90 ч на панелях *в* и *г*. В случае, когда для одного и того же образца количество колоний на чашках с антибиотиком превышало таковое на чашках без антибиотика, за 100% принимали отношение числа колоний на чашках с антибиотиком к числу колоний на чашках без антибиотика. Не менее 65 колоний на чашках без канамицина. Статистически значимые различия в долях канамицин-устойчивых колоний по критерию Пирсона (хи-квадрат) обозначены горизонтальными чертами – # $P < 0,05$; ## $P < 0,001$

элемент *hok/sok* не влиял существенным образом на продуктивность клеток. Поскольку промышленное культивирование продуцентов рекомбинантных белков часто ведется в ферментерах в течение нескольких суток с подпиткой, мы оценили изменение продуктивности клеток при периодическом культивировании в при-

сутствии 1 мМ ИПТГ и канамицина (рис. 2, *б*). Было обнаружено, что концентрация аспарагиназы падает на втором цикле пересева, однако затем возрастает на следующих двух пассажах, этот эффект был более выражен для плазмид pEHD-ASN и pEHR-ASN, содержащих *hok/sok*-элемент downstream от целевого гена.

При периодическом культивировании бактерий без канамицина, но с 1 мМ ИПТГ, в буферизованной среде Terrific broth наблюдали практически полное прекращение накопления аспарагиназы в случае контрольной плазмиды pET28a–ASN и постепенное падение уровня аспарагиназы для остальных плазмид, наименее выраженное для плазмиды pENU–ASN (рис. 2, в). Такой режим культивирования соответствует текущей практике выращивания продуцентов без антибиотиков. Прекращение накопления аспарагиназы в случае плазмиды pET28a–ASN могло быть объяснено ее потерей у большей части клеток (рис. 2, д), в то же время все 3 варианта плазмид с элементом *hok/sok* полностью сохранялись в клетках после 4-х дней культивирования, а продукция целевого белка многократно падала. Данный эффект – прекращение накопления целевого белка при сохранении плазмид в клетках – был еще сильнее выражен при культивировании в среде 2х YT, не обладающей буферной емкостью (рис. 2, г и е). Уже после второго пассажа уровень продукции аспарагиназы многократно падал для всех вариантов плазмид, а после 4-х пассажей наблюдали практически полную потерю контрольной плазмиды pET28a–ASN клетками, сохранение плазмиды pEND–ASN – у 20% клеток и полное сохранение плазмид pENR–ASN и pENU–ASN – у всех клеток. Таким образом, при продолжительном культивировании бактерий с 1 мМ ИПТГ без канамицина элемент *hok/sok* обеспечивает сохранение плазмид клетками, но не обеспечивает сохранение экспрессии гена аспарагиназы. Прекращение синтеза клетками ферментативно активной аспарагиназы могло быть вызвано мутациями в плазмидах или генетическими изменениями в самих бактериальных клетках.

Для двух случайно отобранных колоний клеток с плазмидой pEND–ASN, выращенных на агаризованной среде с канамицином из бактериальной культуры, полученной после 4-х дней культивирования в среде 2х YT без канамицина с 1 мМ ИПТГ, провели выращивание в жидкой среде с канамицином, выделили плазмиды и трансформировали ими повторно клетки BL21[DE3]. Для трех случайно отобранных колоний провели индукцию экспрессии целевого гена 1 мМ ИПТГ в среде с канамицином, и во всех случаях наблюдали уровень накопления аспарагиназы, аналогичный исходному штамму с плазмидой pEND–ASN (данные не приводятся).

Таким образом, прекращение накопления клетками ферментативно активной аспарагиназы при периодическом культивировании

вызывалось не мутациями в плазмидах, а изменениями в бактериальных клетках. Сегрегационная стабилизация плазмид, в случае аспарагиназы, существенно увеличила время накопления целевого белка, однако не позволила получить штаммы-продуценты, постоянно накапливающие целевой белок при культивировании без канамицина вследствие возникновения изменений в бактериях-хозяевах.

Влияние расположения и ориентации элемента *hok/sok* на уровень биосинтеза целевых белков было также изучено для локализованных в цитоплазме бактерий белков HGH и NP, накапливающихся только в нерастворимой форме (HGH) или в частично растворимой форме (NP). При выращивании культур в среде 2х YT с канамицином и 1 мМ ИПТГ уровень биосинтеза NP и HGH снижался в 2–4 раза для всех вариантов плазмид с элементом *hok/sok* (рис. 3, а и б). При культивировании штаммов без канамицина при индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ для NP общая продуктивность оставалась максимальной для контрольной плазмиды pET28a–NP (рис. 3, в), а в случае HGH общая продуктивность была значительно выше для плазмиды pENU–HGH, чем для контрольной плазмиды и других вариантов расположения элемента *hok/sok* (рис. 3, г). Все варианты плазмид с *hok/sok* сохранялись после 18 ч индукции, контрольная плазида сохранялась только у 33% клеток для HGH и менее 1% – для NP (рис. 3, д и е).

Таким образом, для трех различных сверхэкспрессируемых белков мы обнаружили, что токсин-антитоксिनный генетический элемент *hok/sok* поддерживает сегрегационную стабильность плазмид при любом положении относительно промотора целевого гена, однако увеличивает продуктивность бактерий только при определенном положении в плазмиде – downstream от целевого гена в случае аспарагиназы и upstream – в случае гормона роста человека.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то что эффекты позиции элемента *hok/sok* и его ориентации в лабораторных плазмидах непосредственно не исследовались ранее, возможность влияния окружающих генов на функционирование цистронов *hok/sok* уже отмечалась. В частности, Gerdes et al. [31] было сделано предположение о том, что элемент *hok/sok* в составе плазмиды с индуцибельным промотором может быть окружен двумя терминаторами транскрипции и, таким образом, изолирован от влияния близкорасположенных генов.

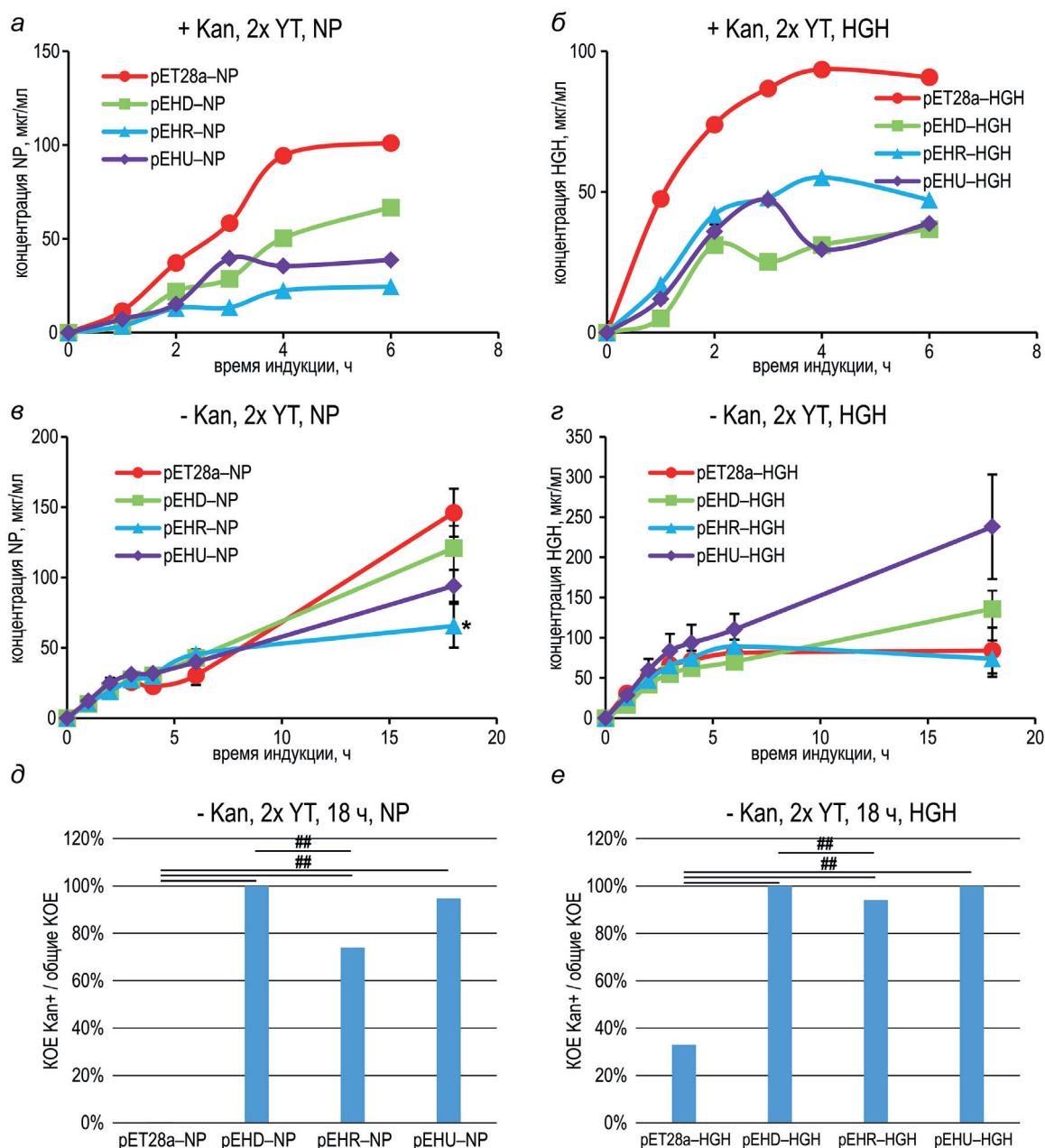


Рис. 3. Динамика накопления нуклеопротеина и гормона роста при культивировании штаммов в присутствии и при отсутствии канамицина. Концентрацию целевых белков измеряли денситометрией электрофореграмм, условия культивирования обозначены над соответствующими панелями. *а, б* – Приведены данные одного репрезентативного эксперимента из трех. На панелях *в* и *г* планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n = 2$, независимые биологические повторы. Для времени индукции 18 ч различия определяли с помощью однопараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки; * $p < 0.05$. *д, е* – Определение числа КОЕ для культур, соответствующих точкам 18 ч для панелей *в* и *г*, не менее 16 колоний на каждой анализируемой чашке. В случае, когда для одного и того же образца количество колоний на чашках с антибиотиком превышало таковое на чашках без антибиотика, за 100% принимали отношение числа колоний на чашках с антибиотиком к числу колоний на чашках без антибиотика. Статистически значимые различия в долях канамицин-устойчивых колоний по критерию Пирсона (хи-квадрат) обозначены горизонтальными чертами; ## $P < 0,001$. Первичные данные приведены в Приложении 7

В ходе настоящего исследования было установлено, что элемент *hok/sok* сохраняет свою способность предотвращать сегрегацию плазмиды при расположении как *upstream*, так и *downstream* от гена целевого белка. Одновременно с этим мы обнаружили, что сама

по себе полная сегрегационная устойчивость плазмид с генами целевых белков недостаточна для поддержания высокого уровня биосинтеза соответствующих полипептидов при продолжительном культивировании без антибиотиков.

При культивировании бактерий в присутствии канамицина для плазмид с элементом *hok/sok* уровень биосинтеза периплазматического белка аспарагиназы не изменялся значимым образом, а уровни биосинтеза цитоплазматических целевых белков падали примерно вдвое по сравнению с контрольными плазмидами.

Количество аспарагиназы в основном повышается во временном диапазоне 6–35 ч. Возможно, волнообразное изменение количества аспарагиназы в течение первых 6 ч с прохождением через максимум в районе 2–3 ч может быть связано с адаптацией клеток к делению в присутствии в периплазме больших количеств аспарагиназы.

При культивировании бактерий без канамицина для всех тестовых белков наблюдали сильное падение продуктивности в случае контрольных плазмид и сохранение продуктивности для некоторых плазмид с элементом *hok/sok*. По-видимому, оптимальное положение и ориентация элемента *hok/sok* в плазмидах на основе рЕТ28 не универсальны, а должны быть подобраны под целевой белок, поскольку для трех исследованных в настоящей работе белков были выявлены разные варианты оптимальных плазмид: рЕНД и рЕНР — для аспарагиназы, рЕНД — для NP и рЕНУ — для нерастворимого HGH. Мы предполагаем, что уровень экспрессии мРНК токсина Нок оказывается максимален для плазмиды рЕНР при индукции целевого гена, минимален для рЕНД и не изменяется от базального уровня для плазмиды рЕНУ, вследствие чего при индукции экспрессии гена, кодирующего HGH, наибольшая продуктивность фиксируется для плазмиды рЕНУ, а в случае NP и ASN — для плазмиды рЕНД. Токсичность целевых белков для клетки может быть установлена как доля бактерий, сохраняющих контрольные плазмиды после индукции в среде без антибиотика. В случае HGH 33% клеток сохраняли плазмиду рЕТ28а–HGH, а плазмиды рЕТ28а–ASN и рЕТ28а–NP сохранялись у 2% и 0,3% клеток соответственно. Исходя из полученных данных можно заключить, что изначальные представления относительно токсичности указанных белков оказались неточными. Поскольку при длительном культивировании (18 ч индукции) плазмиды без *hok/sok* почти не сохраняются в случае NP и аспарагиназы, данные белки можно признать относительно токсичными. В случае HGH плазида без *hok/sok* сохраняется у 33% клеток, поэтому был сделан вывод о том, что этот белок менее токсичен для клеток.

Сходные выводы были сделаны при конструировании сегрегационно стабилизирован-

ных плазмид с элементом *hok/sok* [32] — вместо перемещения генетического элемента *hok/sok* в разные позиции экспрессионных конструкций авторы получили один вариант плазмиды рРНВ01, аналогичный рЕНР, констатировали токсичность такой плазмиды для бактерий вследствие избыточного уровня синтеза Нок и провели изоляцию элемента *hok/sok* от целевого оперона *phaCAB* при помощи дополнительного р-независимого терминатора транскрипции. При конструировании плазмиды, кодирующей ген *metL* под контролем промотора P_{tac}, также были рассмотрены 2 варианта размещения элемента *hok/sok* — до терминатора транскрипции целевого гена и после терминатора, ориентация элемента в обоих случаях аналогична рЕНР [33]. Только вариант плазмиды с перемещением элемента *hok/sok* за терминатор транскрипции целевого гена обеспечивал сохранение нормальной при выращивании штамма-продуцента L-гомосерина в ферментере без добавления антибиотиков. Следует также отметить, что другие варианты токсин-антитоксиновых элементов, например, использованный в работе Liao et al. [32] *alp7*, не демонстрируют необходимой сегрегационной стабилизации плазмид с промотором T7 целевого гена. По-видимому, элемент *hok/sok* на настоящий момент остается единственным вариантом обеспечения необходимой сегрегационной стабилизации плазмид семейства рЕТ для их промышленного культивирования без антибиотиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обычно промышленное получение рекомбинантных белков для медицинского применения в *E. coli* предполагает использование сильных индуцибельных промоторов целевого гена и относительно небольшое время индукции. Для таких систем экспрессии генов 2-кратное повышение общего уровня биосинтеза целевого белка, достигаемое за счет введения в состав плазмиды небольших генетических локусов, представляет значительный практический интерес. Для случая хорошо изученной токсин-антитоксиновой системы *hok/sok* нами было обнаружено, что варьирование положения и ориентации *hok/sok* относительно целевого гена позволяет подобрать вариант сегрегационно стабилизированной плазмиды, сохраняющий продуктивность бактерий при их культивировании без антибиотиков в течение продолжительного времени индукции.

Разработанные нами плазмидные векторы рЕНД, рЕНД и рЕНУ могут быть использованы для получения в клетках *E. coli* различных рекомбинантных белков без применения антибиотиков.

Вклад авторов. И.И. Воробьев — концепция и руководство работой; Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак, Р.Р. Шайфутдинов, Д.С. Хасанов — проведение экспериментов; И.И. Воробьев, Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак — обсуждение результатов исследования; И.И. Воробьев, Н.А. Орлова — написание текста; Ю.А. Ходак — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН.

Благодарности. Л.А. Усакину, В.О. Шендер (ИБХ РАН); А.А. Пискаревой (МГУ имени Ломоносова).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Collins, T., Azevedo-Silva, J., da Costa, A., Branca, F., Machado, R., and Casal, M. (2013) Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimisation, *Microb. Cell Fact.*, **12**, 21, doi: 10.1186/1475-2859-12-21.
- Pandey, D. P., and Gerdes, K. (2005) Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 966–976, doi: 10.1093/nar/gki201.
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B., and Molin, S. (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3116–3120, doi: 10.1073/pnas.83.10.3116.
- Lehnher, H., Maguin, E., Jafri, S., and Yarmolinsky, M. B. (1993) Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained, *J. Mol. Biol.*, **233**, 414–428, doi: 10.1006/jmbi.1993.1521.
- Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., and Rathore, J. S. (2021) Bacterial toxin–antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence, *Curr. Res. Microb. Sci.*, **2**, 100047, doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100047.
- Van Melder, L., Thi, M. H., Lecchi, P., Gottesman, S., Couturier, M., and Maurizi, M. R. (1996) ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions, *J. Biol. Chem.*, **271**, 27730–27738, doi: 10.1074/jbc.271.44.27730.
- Michel, B. (2005) After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us, *PLoS Biol.*, **3**, e255, doi: 10.1371/journal.pbio.0030255.
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S., and Salmond, G. P. (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 894–899, doi: 10.1073/pnas.0808832106.
- Jankevicius, G., Ariza, A., Ahel, M., and Ahel, I. (2016) The toxin–antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA, *Mol. Cell*, **64**, 1109–1116, doi: 10.1016/j.molcel.2016.11.014.
- Wang, X., Lord, D. M., Hong, S. H., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., and Wood, T. K. (2013) Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS, *Environ. Microbiol.*, **15**, 1734–1744, doi: 10.1111/1462-2920.12063.
- Aakre, C. D., Phung, T. N., Huang, D., and Laub, M. T. (2013) A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the beta sliding clamp, *Mol. Cell*, **52**, 617–628, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.014.
- Wang, X., Yao, J., Sun, Y. C., and Wood, T. K. (2021) Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins, *Trends Microbiol.*, **29**, 388–393, doi: 10.1016/j.tim.2020.12.001.
- Choi, J. S., Kim, W., Suk, S., Park, H., Bak, G., Yoon, J., and Lee, Y. (2018) The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*, *RNA Biol.*, **15**, 1319–1335, doi: 10.1080/15476286.2018.1532252.
- Gerdes, K., and Maisonneuve, E. (2012) Bacterial persistence and toxin–antitoxin loci, *Annu. Rev. Microbiol.*, **66**, 103–123, doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150159.
- Yamaguchi, Y., and Inouye, M. (2011) Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin–antitoxin systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 779–790, doi: 10.1038/nrmicro2651.
- Gerdes, K., Larsen, J. E., and Molin, S. (1985) Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci, *J. Bacteriol.*, **161**, 292–298, doi: 10.1128/JB.161.1.292-298.1985.
- Pecota, D. C., Osapay, G., Selsted, M. E., and Wood, T. K. (2003) Antimicrobial properties of the *Escherichia*

- coli* R1 plasmid host killing peptide, *J. Biotechnol.*, **100**, 1-12, doi: 10.1016/s0168-1656(02)00240-7.
18. Gerdes, K. (2016) Hypothesis: type I toxin-antitoxin genes enter the persistence field—a feedback mechanism explaining membrane homeostasis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **371**, 20160189, doi: 10.1098/rstb.2016.0189.
 19. Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013) Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application, *Mob. Genet. Elements*, **3**, e26219, doi: 10.4161/mge.26219.
 20. Van Melder, L. (2010) Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 781-785, doi: 10.1016/j.mib.2010.10.006.
 21. Pedersen, K., and Gerdes, K. (1999) Multiple *hok* genes on the chromosome of *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **32**, 1090-1102, doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01431.x.
 22. Pedersen, K., Christensen, S. K., and Gerdes, K. (2002) Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins, *Mol. Microbiol.*, **45**, 501-510, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03027.x.
 23. Wilmaerts, D., Dewachter, L., De Loose, P. J., Bollen, C., Verstraeten, N., and Michiels, J. (2019) *HokB* monomerization and membrane repolarization control persister awakening, *Mol. Cell*, **75**, 1031-1042.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.015.
 24. Chukwudi, C. U., and Good, L. (2015) The role of the *hok/sok* locus in bacterial response to stressful growth conditions, *Microb. Pathog.*, **79**, 70-79, doi: 10.1016/j.micpath.2015.01.009.
 25. Pecota, D. C., Kim, C. S., Wu, K., Gerdes, K., and Wood, T. K. (1997) Combining the *hok/sok*, *parDE*, and *pnd* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1917-1924, doi: 10.1128/AEM.63.5.1917-1924.1997.
 26. De Moerloose, L., Struman, I., Renard, A., and Martial, J. A. (1992) Stabilization of T7-promoter-based *pARHS* expression vectors using the *parB* locus, *Gene*, **119**, 91-93, doi: 10.1016/0378-1119(92)90070-6.
 27. Mishima, N., Mizumoto, K., Iwasaki, Y., Nakano, H., and Yamane, T. (1997) Insertion of stabilizing loci in vectors of T7 RNA polymerase-mediated *Escherichia coli* expression systems: a case study on the plasmids involving foreign phospholipase D gene, *Biotechnol. Prog.*, **13**, 864-868, doi: 10.1021/bp970084o.
 28. Galen, J. E., Nair, J., Wang, J. Y., Wasserman, S. S., Tanner, M. K., Sztein, M. B., and Levine, M. M. (1999) Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-htrA, *Infect. Immun.*, **67**, 6424-6433, doi: 10.1128/IAI.67.12.6424-6433.1999.
 29. Morin, C. E., and Kaper, J. B. (2009) Use of stabilized luciferase-expressing plasmids to examine *in vivo*-induced promoters in the *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **57**, 69-79, doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00580.x.
 30. Kolesov, D. E., Sinegubova, M. V., Safenkova, I. V., Vorobiev, I. I., and Orlova, N. A. (2022) Antigenic properties of the SARS-CoV-2 nucleoprotein are altered by the RNA admixture, *PeerJ*, **10**, e12751, doi: 10.7717/peerj.12751.
 31. Gerdes, K., Jacobsen, J. S., and Franch, T. (1997). Plasmid Stabilization by Post-Segregational Killing, in *Genetic Engineering* (Setlow, J. K., ed), Vol. 19, Springer, Boston, MA, doi: 10.1007/978-1-4615-5925-2_3.
 32. Liao, Y. C., Saengsawang, B., Chen, J. W., Zhuo, X. Z., and Li, S. Y. (2022) Construction of an antibiotic-free vector and its application in the metabolic engineering of *Escherichia coli* for polyhydroxybutyrate production, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 837944, doi: 10.3389/fbioe.2022.837944.
 33. Sun, B. Y., Wang, F. Q., Zhao, J., Tao, X. Y., Liu, M., and Wei, D. Z. (2023) Engineering *Escherichia coli* for L-homoserine production, *J. Basic Microbiol.*, **63**, 168-178, doi: 10.1002/jobm.202200488.

LOCATION AND ORIENTATION OF THE GENETIC TOXIN-ANTITOXIN ELEMENT *hok/sok* IN THE PLASMID AFFECTS THE EXPRESSION LEVEL OF PHARMACEUTICALLY SIGNIFICANT PROTEINS

Yu. A. Khodak, R. R. Shaifutdinov, D. S. Khasanov, N. A. Orlova, and I. I. Vorobiev*

*Institute of Bioengineering, FRC Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
117312 Moscow, Russia; e-mail: ptichman@gmail.com*

The genetic toxin-antitoxin element *hok/sok* from the natural *Escherichia coli* R1 plasmid ensures the segregation stability of the plasmids. Bacterial cells that have lost all copies of the plasmid encoding the short-lived antitoxin die under the action of the long-lived toxin. The *hok/sok* element in vector plasmids for bacterial expression can increase the productive time of biosynthesis of recombinant proteins, slowing

down the accumulation of non-producing cells lacking the target plasmid in the population. In this work, we studied various variants of the position and orientation of the *hok/sok* element in the standard plasmid pET28a with the inducible T7lac promoter and the kanamycin resistance gene. It was found that the *hok/sok* element retained functional activity regardless of location on the plasmid and orientation, bacterial cells retained *hok/sok* plasmids after four days of cultivation without antibiotics and lost the control plasmid without this element. Using the example of three target proteins – *E. coli* type II asparaginase, human growth hormone, and the SARS-CoV-2 virus nucleoprotein, it was demonstrated that for cytoplasmic target proteins, the maximum productivity of bacteria is maintained only when the *hok/sok* element is located on the plasmid upstream of the target gene promoter. In the case of periplasmic localization of the protein, the productivity of bacteria decreases for all variants of the *hok/sok* location during cultivation with an antibiotic, and in the case of periodic cultivation of bacteria without an antibiotic, productivity is also better preserved when the *hok/sok* element is located upstream of the target gene promoter. This variant of the pEHU vector plasmid makes it possible to more than double the biosynthesis of human growth hormone, which is insoluble in the cytoplasm of bacteria, when bacteria are cultivated without antibiotics, and also to maintain asparaginase biosynthesis during periodic cultivation without antibiotics for four days at a level of at least 10 mg/liter. The developed segregation-stabilized plasmid vector can be used to obtain various recombinant proteins in *E. coli* cells without the use of antibiotics.

Keywords: heterologous expression of recombinant proteins, toxin-antitoxin systems, asparaginase, nucleoprotein, somatotropin