

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 616.9:579

М.А. СУХОВА, Г.М. ВАХРАМЕЕВА, Т.Б. КРАВЧЕНКО*, А.Н. МОКРИЕВИЧ, В.М. ПАВЛОВ, И.А. ДЯТЛОВ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Московская область, 142279

e-mail: info@obolensk.org

Конструирование и изучение свойств вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего Fe-супероксиддисмутазу

В рамках исследований по конструированию усовершенствованной, менее реактогенной, живой туляремийной вакцины методом аллельного обмена с использованием суицидной векторной плазмиды pGM5 получены варианты штаммов на основе вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией железозависимой супероксиддисмутазы FeSOD. Это снижение произошло в результате замены природных кодонов в гене *sodB* на редко встречающиеся. Показано, что уменьшение количества FeSOD до 30% от уровня в исходном штамме не влияет на скорость размножения туляремийного микроба. Выявлена повышенная чувствительность мутантных штаммов к действию перекиси водорода и параквата по сравнению с вакцинным штаммом 15 НИИЭГ. Методом ПЦР-РВ во всех полученных штаммах установлен повышенный уровень мРНК гена *groEL*, кодирующей белокшаперон, в логарифмической фазе роста.

Ключевые слова: Fe-супероксиддисмутазы, туляремия, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, GroEL, *sodB*.

Francisella tularensis — граммотрицательная полиморфная коккобацилла, являющаяся возбудителем зооантропонозной природноочаговой инфекции туляремии, которая из-за практически 100 %-ной восприимчивости людей представляет серьезную опасность [1]. В течение нескольких десятков лет в нашей стране для профилактики заболевания используется живая туляремийная вакцина, созданная на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, которая несмотря на свою эффективность имеет относительно высокую реактогенность, что ограничи-

вает ее использование для детей и людей со сниженным иммунитетом [2].

Таким образом, сохраняется необходимость в разработке улучшенного профилактического средства против туляремии, вызывающего менее выраженные побочные эффекты при сохранении протективной активности. Оптимальным путем конструирования новых туляремийных вакцин считается целенаправленное создание аттенуированных штаммов [3].

Сухова Мария Александровна, Вахрамеева Галина Михайловна, Кравченко Татьяна Борисовна, Мокриевич Александр Николаевич, Павлов Виталий Михайлович, Дятлов Иван Алексеевич.

Список сокращений: ЗФР — забуференный физиологический раствор; КОЕ — колониеобразующая единица; ОП — оптическая плотность; ПААГ — полиакриламидный гель; п.н. — пар нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени; УЗД — ультразвуковой дезинтегратор; Amr — ампициллин; Cm — хлорамфеникол; dNTP — дезоксирибонуклеозидтрифосфат(ы); FeSOD — железозависимая SOD; SOD — супероксиддисмутазы; TEMED — N, N', N', N'-тетраметилэтилендиамин.

* Автор для переписки.

F. tularensis является паразитом, размножающимся в цитоплазме макрофагоподобных клеток. Патогенные бактерии, в частности *F. tularensis*, используют целый арсенал средств для защиты от губительного воздействия свободных радикалов, формирующихся как в процессе жизнедеятельности самого микроорганизма, так и во время окислительного взрыва при фагоцитозе бактерий клетками макроорганизма [4]. Продукты окислительного взрыва в макрофагах — реактивные кислородные радикалы, включающие супероксид-анион (O_2^-) и гидроксильный радикал (OH^-), — приводят к повреждению ДНК, РНК, белков и липидов, вызывая гибель возбудителя инфекции [5]. Для инактивации супероксид-аниона бактерии используют ферменты супероксиддисмутазы (SOD) [6], содержащие в качестве кофактора либо ионы железа (FeSOD) [7, 8], либо ионы меди/цинка (Cu/ZnSOD) и кодируемые генами *sodB* и *sodC*, соответственно [9, 10].

Железозависимая супероксиддисмутаза FeSOD (КФ 1.154.1.1) у большинства микроорганизмов является жизненно важным ферментом. В частности, делеция гена *sodB* в клетках *Legionella pneumophila* приводит к полной утрате жизнеспособности микроорганизма [11]. Попытка конструирования штамма *Rhodobacter capsulatus* без гена *sodB* путем аллельного замещения оказалась безуспешной, тем самым свидетельствуя, что этот фермент является жизненно необходимым для аэробных культур [12]. У *F. tularensis*, по данным анализа генома, имеется только одна копия гена *sodB*. Попытка инактивировать этот ген также приводила к утрате жизнеспособности, поэтому для изучения роли фермента FeSOD в жизнедеятельности *F. tularensis* был использован подход, который позволял снизить уровень синтезируемого фермента на этапе трансляции мРНК в результате замены стартового кодона ATG на GTG [13]. Аналогичные работы по замене стартового кодона у других микроорганизмов также приводили к снижению эффективности трансляции [14].

Целью настоящего исследования являлась модификация гена *sodB* вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ путем замены в структурной части гена *sodB* методом аллельного обмена природных кодонов на редко используемые кодоны: стартовый кодон — на GTG (метионин) и последующих кодонов — на TTG (лейцин) или CCC (пролин). Указанные модификации были направлены на снижение экспрессии данного гена на уровне трансляции, которое определяет уменьшение реактогенности живой туляремийной вакцины, и изучение микробиологических и биохимических свойств полученных вариантов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы и условия культивирования. В работе использовали бактериальные штаммы *E. coli* DH5 α (Invitrogen, США) и *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ГКПМ-Оболенск, номер штамма В-4792).

Штаммы *E. coli* культивировали на плотной и жидкой питательной среде Лурия—Бертани (Sigma, США) при 37° с добавлением при необходимости антибиотиков хлорамфеникола (Cm) до концентрации 5 мкг/мл среды или ампициллина (Amp) до концентрации 100 мкг/мл среды.

Штаммы *F. tularensis* выращивали при температуре 37° на плотной питательной среде FT-агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия) и жидкой питательной среде FTB следующего состава, %: ферментативный гидролизат казеина — 2 (Amresco, США); дрожжевой экстракт — 1 (HiMedia, Индия); KH_2PO_4 — 1,2 («Химмед», Россия); глюкоза — 1; цистеин — 0,001; $FeCl_2$ — 0,001; («Химмед»), pH 7,2 [15]. При необходимости в среды добавляли полимиксин В (Sigma, Дания) до концентрации 100 мкг/мл среды или Cm (Sigma) до концентрации 5 мкг/мл среды и сахарозу (HiMedia) до 5 %.

Плазмидные ДНК. Ампликоны с модифицированными фрагментами гена *sodB* *F. tularensis* клонировали в плазмидном векторе pUC19 (Fermentas, Литва). Суицидный вектор pGM5, содержащий гены устойчивости к антибиотикам ампициллину (*bla*) и хлорамфениколу (*cat*), а также ген *sacB*, способный реплицироваться в клетках *E. coli*, но не в *F. tularensis*, использовали для создания рекомбинантных плазмид, необходимых для аллельного обмена природного гена *sodB* на модифицированные варианты туляремийного микроба [16].

Праймеры для создания модифицированных вариантов гена *sodB* *F. tularensis*. Перечень праймеров, использованных в работе, приведен в табл. 1.

Праймеры были синтезированы биотехнологической компанией «Синтол» (Москва).

Праймеры для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Перечень праймеров, использованных для количественной оценки мРНК *groEL*, представлен в табл. 2.

Проведение ПЦР. Ампликоны получали в амплификаторе Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) в пробирках объемом 200 мкл, содержащих 25 мкл реакционной смеси следующего состава: матрица ДНК — 1 нг; праймеры — по 10 пмоль; dNTP — в концентрации 0,2 мМ; Taq-полимераза (Fermentas, Литва) — 0,5 мкл

Последовательности праймеров, использованных для получения модифицированных вариантов гена *sodB*

Название	Последовательность 5'—3'	Назначение
PstF-sodB	GACCTG CAGT GAAATTTGAATTACCCAAA ACTAC	Аmplификация модифицированного фрагмента гена <i>sodB</i>
PstF1-sodB	GACCTG CAGT GAAATTTGAATTG CC AAA ACTAC	Аmplификация модифицированного фрагмента гена <i>sodB</i>
PstF2-sodB	GACCTG CAGT GAAATTTGAATTAC CC AAA ACTAC	Аmplификация модифицированного фрагмента гена <i>sodB</i>
PstR-sodB	ATGCTG CAGT ACTCC CTT AAATTCGTG	Аmplификация промоторной области гена <i>sodB</i>
SalF-sodB	TATG T CGACTTATCCATTTGGTATTGAGG	Аmplификация промоторной области гена <i>sodB</i> и контроль вставки
SalR-sodB	TATG T CGACAACCTAATCAGCGAATTGC	Аmplификация модифицированного фрагмента гена <i>sodB</i> и контроль вставки

Примечание. Подчеркнуты замененные кодоны, жирным шрифтом выделены сайты рестрикции.

(2,5 ед/мкл); 10-кратный *Taq*-полимеразный буфер — 2,5 мкл. Режим ПЦР был следующий: смесь инкубировали при 94° в течение 5 мин, затем проводили 25 циклов амплификации по программе денатурация — 94° (30 с), отжиг — 54° (30 с) и элонгация — 74° (30 с). Для получения ампликонов с фрагментами гена *sodB* и контрольными праймерами элонгация длилась 70 с; после завершения элонгации смесь инкубировали 4 мин при 74°.

ПЦР-РВ проводили в амплификаторе CFX96 (Bio Rad Laboratories, Inc, США) в стрипах с лунками объемом 200 мкл. Состав реакционной смеси был следующий (объем пробы 25 мкл): ДНК — 1

нг; праймеры — по 10 пмоль; 2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I («Синтол») — 10 мкл; 25 mM MgCl₂ — 2,5 мкл. Смесь инкубировали при 94° в течение 5 мин, затем проводили 35 циклов амплификации по следующей программе: денатурация — 94° (30 с); отжиг — 59° (30 с) и элонгация — 74° (30 с). После завершения элонгации смесь инкубировали 4 мин при 74°. Данные ПЦР в реальном времени обрабатывали с помощью пакета программ Microsoft Office Excel для количественной оценки концентрации исследуемого фрагмента ДНК.

Последовательности праймеров для определения мРНК

Название	Последовательность 5'—3'	Назначение
GroELF	TTACATCATGCCAGGCATACCGC	Количественное определение мРНК <i>groEL</i>
GroELR	CGGTGAGTCTTCTGTAGTTGTTAACCAAGT	Количественное определение мРНК <i>groEL</i>
530F	GTGCCAGCAGCCGCGG	Количественное определение 16SpPHK
907R	CCGTCAATTCATTTGAGT	Количественное определение 16SpPHK
SodBF	TGTTTGGAGTTAAACAATTCCAGTAA	Количественное определение мРНК <i>sodB</i>
SodBR	TAGTTGAGGGTACAGAGCACGATG	Количественное определение мРНК <i>sodB</i>

Электрофорез ДНК. Ампликоны разделяли путем электрофореза в 0,7 %-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (0,04 М трис-ацетат (Sigma, Германия), 0,002 М ЭДТА (Sigma, Германия), pH 8,0) с последующим окрашиванием бромистым этидием (Roth, Германия) (30 мкг/мл) и детекцией с использованием UV-облучателя при длине волны 365 нм (Cole Parmer, США). Фотодокументирование гелей проводили на приборе Vilber Lourmat (Франция).

Генно-инженерные методы. Выделение плазмидных ДНК и трансформацию клеток *E. coli* проводили методами, описанными ранее [17]. ДНК из клеток *F. tularensis* выделяли по методу [18]. Клетки *F. tularensis* трансформировали плазмидной ДНК методом электропорации [19].

Рестрикцию ДНК проводили с использованием эндонуклеаз *PstI*, *SalI*, *SmaI* и *NheI*, лигирование — T4-лигазой (Fermentas), согласно инструкциям производителя. Фрагменты ДНК из агарозного геля выделяли с помощью набора Illustra™ (GE Healthcare, Великобритания), согласно инструкции производителя. Секвенирование ДНК осуществлялось фирмой «Синтол».

Конструирование модифицированных генов *sodB* *F. tularensis* для аллельного обмена. Принципиальная схема получения генов *sodB* с измененными кодонами приведена на рис. 1.

Исходя из данных о нуклеотидной последовательности генома *F. tularensis subsp. holarctica* LVS (GenBank, AM233362) были рассчитаны праймеры для изменения последовательностей кодонов в гене *sodB* (FTL_RS09165). Ампликон PsodB, содержащий промоторную область гена

sodB, был получен с помощью пары праймеров SalF-sodB/PstR-sodB. Ампликоны, содержащие изменения (1) в стартовом кодоне (ампликон sodB), (2) в стартовом кодоне и триплете, кодирующем лейцин (ампликон sodB1), и (3) в стартовом кодоне и триплете, кодирующем пролин (ампликон sodB2), были получены с помощью пар праймеров: PstF-sodB/ SalR-sodB, PstF1-sodB/SalR-sodB, PstF2-sodB/SalR-sodB, SalF-sodB/PstR-sodB, соответственно. Все ампликоны содержали краевые сайты рестрикции для *SalI* и *PstI*. В ПЦР в качестве матрицы использовали хромосомную ДНК штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Полученные ампликоны очищали и встраивали в сайт *SmaI* вектора pUC19 (рис. 2, А). Линейаризованный вектор предварительно дефосфорилировали фосфатазой CIAP (Fermentas).

В результате «кальциевой» трансформации клеток *E. coli* рекомбинантными плазмидами было получено 4 варианта клонов: *E. coli* DH5α (pUC19/PsodB), *E. coli* DH5α(pUC19/sodB), *E. coli* DH5α(pUC19/sodB1) и *E. coli* DH5α(pUC19/sodB2). Наличие замены в кодонах гена *sodB* подтверждали секвенированием клонированных фрагментов ДНК.

Для синтеза модифицированных генов *sodB* области гена вырезали из рекомбинантных плазмид эндонуклеазами *PstI* и *SalI*. Фрагмент ДНК из плазмиды pUC19/PsodB с промоторной областью гена *sodB* объединяли с каждым из трех вариантов структурной части гена *sodB* (фрагменты из плазмид pUC19/sodB, pUC19/sodB1 и pUC19/sodB2) по *PstI*-сайту, после чего встраивали в *SalI*-сайт плазмиды pGM5 (для встраивания фрагментов

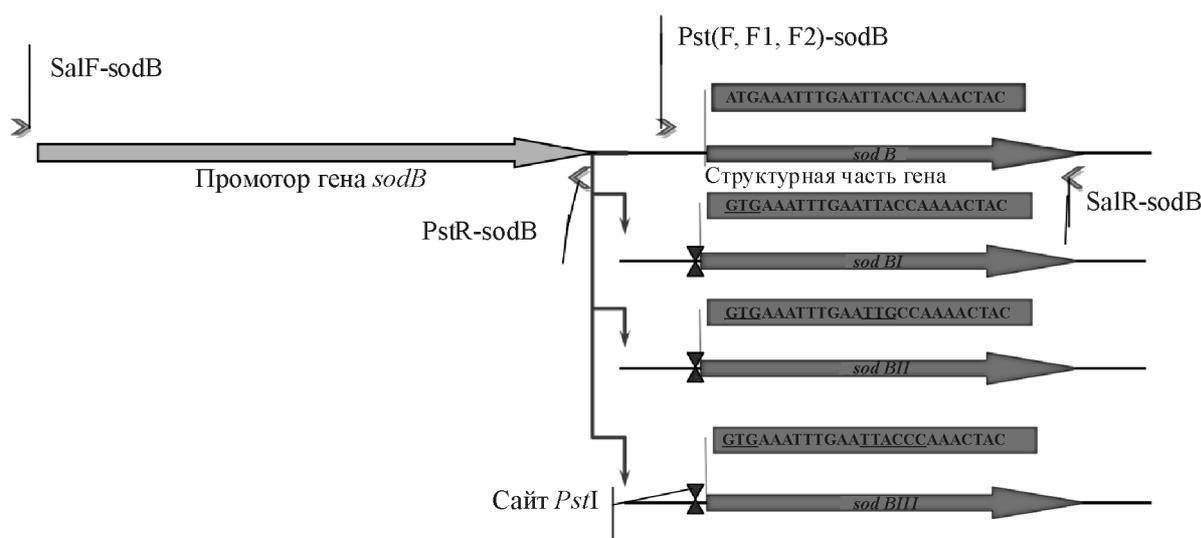


Рис.1. Схема получения ампликонов с фрагментами гена *sodB*. Символами (<>) указано положение праймеров для синтеза ампликонов, в прямоугольниках приведена нуклеотидная последовательность модифицированных участков гена *sodB*. Встроенный сайт *PstI* находится перед ATG-кодоном гена *sodB*

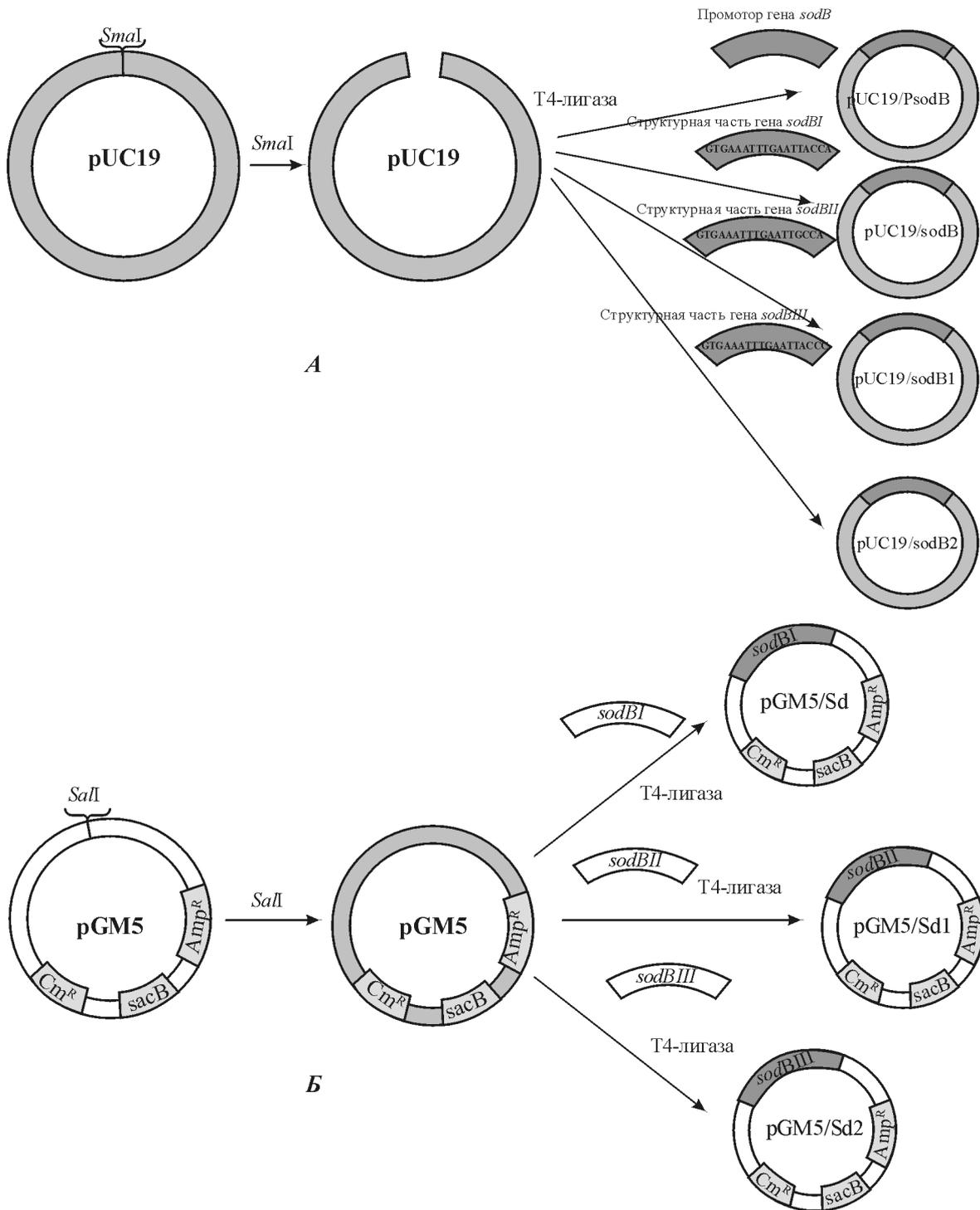


Рис. 2. Схема получения плазмид: А — с фрагментами ампликонов; Б — суицидных плазмид с модифицированными вариантами гена *sodB* *F. tularensis*

плазмиду pGM5 гидролизовали рестриктазами *SalI* и *NheI* (Fermentas) (см. рис. 2, Б). Полученными лигатами трансформировали клетки *E. coli* DH5α и отбирали клоны на среде с Amp. Затем ме-

тодом ПЦР с праймерами SalF-sodB и SalR-sodB отбирали клоны, дающие ампликон размером 1247 п.н. и соответственно содержащие одну из рекомбинантных плазмид — pGM5/Sd, pGM5/Sd1 или

pGM5/Sd2. Отобранные клоны проверяли на способность расти на среде с Cm, а также осуществлять подавленный «осклизлый» рост на среде с сахарозой, которая обеспечивается генами *cat* и *sacB* плазмиды pGM5.

Перенос модифицированных вариантов гена *sodB* в хромосому *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Варианты гена *sodB* из плазмид pGM5/Sd, pGM5/Sd1 и pGM5/Sd2 переносили в хромосому *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом аллельного обмена [20] с рядом изменений. Плазмидами с модифицированными генами трансформировали клетки туляремийного микроба методом электропорации на приборе Eppendorf 2510. Электропорацию осуществляли в кювете с зазором 1 мм, на которую накладывали импульс с напряжением 1750 В в течение 5 мс. Отбор клонов с интегрированными плазмидами проводили на FT-агаре (ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболensk), содержащем Cm. Контроль интеграции модифицированного гена *sodB* в хромосому осуществляли методом ПЦР-анализа ДНК-клонов с парой праймеров SalF-*sodB* и SalR-*sodB* с последующим гидролизом полученных ампликонов рестриктазой *PstI* (ампликон размером 1247 п.н. с гена *sodB* исходного штамма не содержал сайт рестрикции для *PstI*, а ампликоны с модифицированных вариантов генов расщеплялись рестриктазой *PstI* на два фрагмента размером 654 и 593 п.н.). Для аллельного обмена клоны с двумя копиями *sodB* гена засеивали в жидкую среду FTB до концентрации $3 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, растили 5 ч при 37° и затем высевали из 2-го, 3-го и 4-го разведения по 100 мкл на FT-агар с добавлением сахарозы. Клоны, утратившие интегрированную плазмиду, не росли на среде с Cm и не формировали осклизлые колонии при росте на среде с сахарозой. Эти клоны были проанализированы методом ПЦР с использованием пары праймеров SalF-*sodB* и SalR-*sodB* и последующим гидролизом ампликонов рестриктазой *PstI*. Наличие нуклеотидных замен в модифицированных штаммах проверяли секвенированием ампликонов, полученных с использованием пары праймеров SalF-*sodB* и SalR-*sodB*.

Определение ферментативной активности FeSOD. Оценку активности FeSOD штаммов *F. tularensis* проводили по методу, описанному ранее [21]. Для анализа использовали бактериальные суспензии ($3 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), приготовленные из ночных агаровых культур, которые инокулировали из расчета 1 мл суспензии в 20 мл жидкой питательной среды FTB и культивировали в течение 6 и 24 ч. Бактерии затем осаждали центрифугированием при 9000 об/мин в течение 15 мин при 4° (Beckman, ротор JA-20); полученные осадки ре-

суспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (Cole Parmer, США) в режиме пятикратной обработки ультразвуковыми импульсами по 15 с при мощности 20 Вт. Клеточные остатки осаждали при 12000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге Minispeen (Eppendorf, Германия). Осветленные образцы ультразвукового дезинтегратора (УЗД) стандартизовали по оптической плотности (ОП=0,3 при длине волны 280 нм, спектрофотометр Ultrospec 3100 Pro (Pharmacia, США)). Белки разделяли электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях, согласно методике [21]. Гель с разделенными фракциями бактериальных белков помещали в раствор 2,5 мМ нитротетразолиевого синего (Sigma, США) в 30 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,8, и инкубировали на качалке в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем гель переносили в раствор, содержащий 30 мМ TEMED (Sigma, США), 30 мкМ сульфат железа («Химмед») и 30 мкМ рибофлавин («Фармстандарт», Россия) и инкубировали на качалке 20 мин при комнатной температуре. Для проявления неокрашенных полос в результате ферментативной активности FeSOD гель освещали в течение 15 мин лампой дневного света и затем фотографировали. Полученную зимограмму анализировали с помощью программы GelAnalyser (<http://www.gelanalyzer.com>). Активность ферментов модифицированных штаммов рассчитывали в относительных единицах, принимая активность фермента штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ за единицу.

Оценка воздействия перекиси водорода на рост штаммов *F. tularensis*. Бактериальные суспензии штаммов *F. tularensis* ($3 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), приготовленные из ночных агаровых культур, засеивали по 0,3 мл в пробирки с 2,7 мл среды FTB и культивировали в течение 6 ч при 37° с перемешиванием в режиме ротации 170 об/мин. Затем в пробирки вносили раствор перекиси водорода до конечной концентрации 2,5 и 5 мМ, а в контрольные добавляли такой же объем ЗФР и культивировали еще 2 ч. ОП образцов через 8 ч определяли на спектрофотометре при длине волны 595 нм.

Оценка подавления роста бактерий паракватом. Бактериальные суспензии штаммов *F. tularensis* ($3 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), приготовленные из ночных агаровых культур, засеивали по 0,3 мл в пробирки с 2,7 мл среды FTB и культивировали в течение 6 ч при 37° с перемешиванием в режиме ротации (170 об/мин). Затем в опытные пробирки вносили водный раствор параквата (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 0,015 мМ, 0,03 и 0,06 мМ, а в контрольные добавляли такой

же объем ЗФР и культивировали еще 2 ч, после чего определяли ОП образцов.

Синтез кДНК на матрице суммарного пула РНК *F. tularensis*. Из анализируемой биомассы штаммов выделяли РНК с помощью набора РИ-БО-золь-В (Amplisens, Москва), согласно инструкции производителя. Для синтеза кДНК использовали набор Реверта-Л («Синтол»).

Оценка количества мРНК изучаемых генов в клетках туляремийного микроба. Определение относительного количества мРНК генов *sodB* и *groEL* в клетках туляремийного микроба проводили в два этапа. На первом получали в одних и тех же условиях кДНК, используя в качестве матрицы суммарную РНК бактерий. Затем методом ПЦР-РВ определяли относительное количество кДНК, содержащих последовательности изучаемых генов. В качестве внутреннего стандарта использовали кДНК, синтезированную на матрице 16SpРНК. Такой анализ дает возможность измерить концентрацию ДНК с исследуемой нуклеотидной последовательностью, определяя количество циклов, после которых флуоресцентный сигнал красителя SIBRGreen становится выше определенного уровня, превышающего фоновую флуоресценцию. Данный подход позволяет определить относительное содержание мРНК в бактерии в перерасчете на одну молекулу 16SpРНК вне зависимости от общего содержания РНК в образце. Уровень транскрипции вычисляли по разнице значений пороговых циклов для целевого гена и 16SpРНК, считая, что за один цикл происходит удвоение молекул амплифицируемых кДНК. ПЦР с использованием кДНК гена *sodB* осуществляли с помощью праймеров SodBF и SodBR, а с использованием *groEL* — праймеров GroELF и GroELR, комплементарных внутренним областям исследуемых генов. кДНК 16SpРНК амплифицировали, используя праймеры 530F и 907R.

Статистическая обработка. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В геноме *F. tularensis* ген *sodB* размером 579 п.н. кодирует белок FeSOD с молекулярной массой 21,9 кДа. Структурная часть гена *sodB* начинается с последовательности нуклеотидов **ATGAAATTTGAATTACCCAAAA...**, кодирующей N-концевые аминокислоты: MKFELPK.... Для снижения скорости трансляции FeSOD с мРНК *sodB* нами были синтезированы три варианта гена *sodB* с заменой природных кодонов на редко используемые

у *F. tularensis* кодоны без изменения кодируемой аминокислотной последовательности белка. При выборе редко встречающихся кодонов в геноме *F. tularensis* были использованы данные о частоте встречаемости кодонов в генах туляремийного микроба с высоким уровнем экспрессии белков RecA, GroEL, AspA и Tul4 [22]. Для синтеза вариантов гена *sodB* были сконструированы праймеры, частично комплементарные природной последовательности гена и несущие необходимые нуклеотидные замены: PstF-sodB, содержащий вместо стартового кодона ATG кодон GTG; PstF1-sodB, в котором стартовый кодон ATG и кодон TTA в четвертом положении заменены на GTG и TTG, соответственно; PstF2-sodB, в котором стартовый кодон ATG и кодон CCA в пятом положении заменены на GTG и CCC, соответственно. Эти праймеры перед кодирующей частью содержали нуклеотидную последовательность сайта для эндонуклеазы *PstI*, причем последний нуклеотид сайта G был первым нуклеотидом стартового кодона GTG.

С использованием созданных праймеров были синтезированы три варианта кодирующей части гена *sodB* с одной из нуклеотидных последовательностей начала гена — **GTGAAATTTGAATACCCAAAA**, **GTGAAATTTGAATTGCCAAAA** и **GTGAAATTTGAATTACCCAAAA**. При объединении фрагментов ДНК кодирующей части гена *sodB* размером 593 п.н. и фрагмента ДНК, содержащего промоторную область гена размером 654 п.н., синтезированного с помощью пары праймеров PstR-sodB/SalF-sodB, были получены три варианта гена: *sodBI*, *sodBII* и *sodBIII* (см. рис. 1). Праймер PstR-sodB содержал дополнительно нуклеотидную последовательность сайта эндонуклеазы *PstI*. Данный сайт являлся маркером для модифицированных генов *sodB*, в которых кодон ATG был заменен на GTG.

При встраивании синтезированных генов в суицидный вектор pGM5 были получены плазмиды pGM5/Sd, pGM5/Sd1 и pGM5/Sd2, содержащие гены *sodBI*, *sodBII* и *sodBIII*, соответственно (см. рис. 2, Б).

Для аллельного обмена природного гена *sodB* на модифицированные варианты суицидные плазмиды были перенесены в бактерии *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом электропорации. Эффективность переноса плазмид с мутантными генами *sodB* в хромосому *F. tularensis* 15 НИИЭГ составила 10^3 КОЕ/мкг плазмидной ДНК. При анализе 10 клонов, выросших на среде с Cm, плазмидная ДНК в автономном состоянии обнаружена не была (данные не приведены), что указывает на интеграцию плазмид в хромосому. В результате

встраивания плазмид в геном туляреминого микроба возникли диплоидные по гену *sodB* клоны, содержащие как природный, так и модифицированный вариант гена. Эти клоны были устойчивы к Cm и не росли на среде с сахарозой из-за наличия генов *sacB* и *cat* плазмиды pGM5 в хромосомах бактерий.

В результате внутригеномной рекомбинации по гомологичным участкам природного и модифицированного генов *sodB* происходила делеция плазмид из хромосомы и возникали 2 варианта бактерий: первый — с природной копией гена *sodB*; второй — с модифицированной копией гена. Такие бактерии утратили гены *sacB* и *cat*, приобретая тем самым способность расти на среде с сахарозой и чувствительность к Cm, а также, по данным ПЦР, не содержали *ori*-область плазмиды pGM5 (данные не приведены). Частота делеции плазмиды из генома составляла 0,1 — 0,4 % в разных экспериментах. При ПЦР-анализе клонов, выросших на среде с сахарозой и чувствительных к Cm, с праймерами SalF-*sodB* и SalR-*sodB* было получено два типа ампликонов: содержащие сайт *PstI* и не содержащие его. Было проанализировано три группы по 10 клонов, потенциально содержащих разные модифицированные гены. В этих группах было выявлено от двух до пяти клонов с модифицированным геном *sodB* (данные не приведены). Для дальнейших исследований из каждой группы отобрали по одному клону, содержащему модифицированный ген *sodB*: *F. tularensis* 15/SodBI с геном *sodBI*, *F. tularensis* 15/SodBII с геном *sodBII* и *F. tularensis* 15/SodBIII с геном *sodBIII* (рис. 3).

Видно, что полученные ампликоны 15/Sod BI, 15/Sod BII и 15/Sod BIII подвержены гидролизу рестриктазой *PstI* и продукты гидролиза имеют меньшую молекулярную массу, чем исходный ампликон, подтверждая тем самым замещение нативного гена *sodB* на его модифицированный вариант.

Наличие нуклеотидных замен в гене *sodB* этих клонов было подтверждено секвенированием.

Все три модифицированных варианта росли на FT-агаре и в жидкой питательной среде FTB со скоростью, характерной для исходного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Скорость удвоения ОП жидких культур в логарифмической фазе роста как модифицированных вариантов, так и штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ составила ~2 ч (данные не приведены).

Для оценки влияния изменений, внесенных в ген *sodB*, на уровень трансляции на матрице мРНК *sodB* была определена супероксиддисмутазная активность в клетках туляреминого микроба,

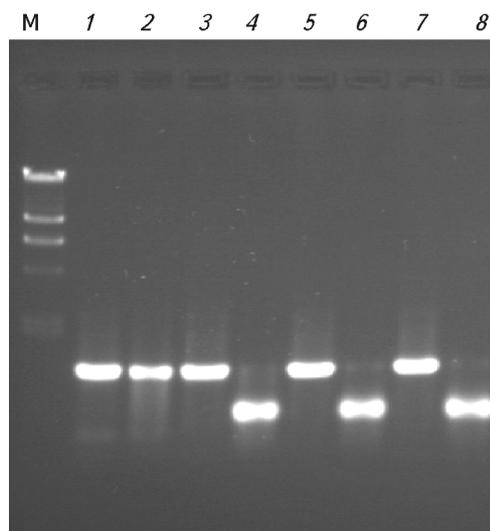


Рис. 3. Электрофореграмма ампликонов, полученных с помощью праймеров SalF-*sodB* и SalR-*sodB*, с ДНК клонов, выросших на среде с сахарозой и чувствительных к Cm (дорожки 1, 3, 5, 7), и продуктов их гидролиза рестриктазой *PstI* (дорожки 2, 4, 6, 8): М — маркер молекулярной массы — *HindIII*-фрагменты ДНК фага λ ; дорожки 1, 2 — ампликоны с ДНК *F. tularensis* 15 НИИЭГ; дорожки 3, 4 — ампликоны с ДНК *F. tularensis* 15/SodBI; 5, 6 — ампликоны с ДНК *F. tularensis* 15/SodBII; 7, 8 — ампликоны с ДНК *F. tularensis* 15/SodBIII

находящихся в логарифмической и в стационарной фазах роста. Для этого исследовали степень окрашивания нитротетразолиевым синим белковых полос, полученных в результате неденатурирующего электрофореза в ПААГ осветленных ультразвуковых лизатов исследуемых бактерий (рис. 4).

Для полуколичественной оценки активности фермента FeSOD проводили денситометрическое определение суммарной светимости неокрашенных полос после электрофореза (табл. 3). За единицу активности принята активность фермента штамма 15 НИИЭГ.

Видно, что светимость полос штаммов в логарифмической фазе роста различается по интенсивности, а в стационарной фазе эта интенсивность практически одинакова.

Видно, что замена стартового кодона ATG на GTG в гене *sodB* не оказала значительное влияние на ферментативную активность, а следовательно, и на количество синтезированного активного белка FeSOD бактериальными клетками *F. tularensis* 15/SodBI, находящимися в логарифмической фазе роста (см. рис. 4, дорожка 3). Добавление еще одного редко встречающегося кодона в ген *sodB* привело к заметному снижению уровня синтеза белка FeSOD в клетках штаммов *F. tularensis* 15/SodBII и 15/SodBIII в логарифмической фазе

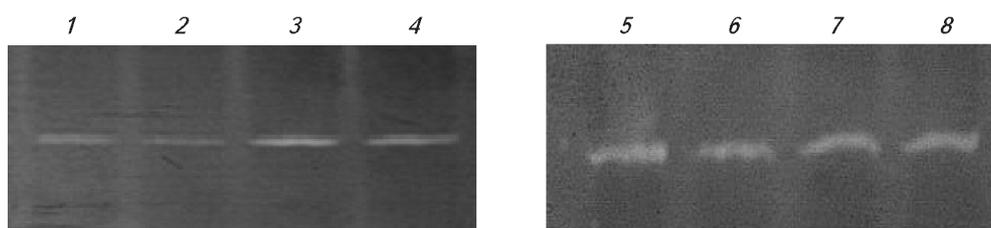


Рис. 4. Зимограмма УЗД препаратов штаммов *F. tularensis*, находящихся в логарифмической (дорожки 1—4) и стационарной (дорожки 5—8) фазах роста: дорожки 1, 5 — *F. tularensis* 15/SodBIII; 2, 6 — *F. tularensis* 15/SodBII; 3, 7 — *F. tularensis* 15/SodBI; 4, 8 — *F. tularensis* 15 НИИЭГ

(см. рис.4, дорожки 1 и 2). Примечательно, что замена кодона лейцина ТТА на ТТГ более существенно повлияла на трансляцию белка FeSOD с мРНК (15/SodBII), чем замена кодона пролина ССА на ССС (15/SodBIII), в логарифмической фазе. Бактерии всех исследованных штаммов тулярийского микроба, находящиеся в стационарной фазе роста, обладали практически одинаковой активностью FeSOD (см. рис. 4, дорожки 5—8).

Поскольку по данным количественного ПЦР-РВ в модифицированных штаммах, находящихся в логарифмической фазе роста, содержание мРНК, синтезированной с гена *sodB*, по отношению к количеству 16SpРНК практически совпало с долей аналогичной мРНК, синтезированной штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (данные не приведены), то наблюдаемое снижение количества активного фермента FeSOD с большой долей вероятности связано со снижением скорости трансляции белка с мРНК гена *sodB*.

Для оценки устойчивости бактерий к оксидативному стрессовому воздействию в качестве индуктора реактивных кислородных радикалов, в частности, свободных супероксидных радикалов, были использованы перекись водорода и паракват (N,N'-диметил-4,4'-дипиридила дихлорид). Последний, являясь акцептором электронов, переносит их на молекулярный кислород, приводя к образованию супероксид-аниона [23]. Указанные реагенты в различных концентрациях добавляли в жидкие культуры, находящиеся в логарифмичес-

кой фазе роста, и регистрировали изменение ОП бактериальных суспензий через 2 ч последующего культивирования (рис. 5).

Степень подавления роста бактерий родительского и модифицированных штаммов в присутствии перекиси водорода и параквата была пропорциональна концентрации стрессовых агентов. Внесение в ген *sodB* мутаций в разной степени оказывало влияние на способность бактерий противостоять стрессовому действию перекиси водорода и параквата. Штаммы *F. tularensis* 15/SodBI и 15/SodBIII не отличались от родительского штамма по реакции на внесение перекиси водорода и параквата. Рост штамма *F. tularensis* 15/SodBII статистически достоверно ($P < 0,05$) замедлялся на 48 % при концентрации перекиси водорода в среде 2,5 мМ и на 70% при концентрации 5 мМ по сравнению с немодифицированным штаммом.

Рост штамма *F. tularensis* 15/SodBII также достоверно ($P < 0,05$) снижался на 53 %, 57 % и 66 % при добавлении параквата до концентрации 0,015, 0,03 и 0,06 мМ, соответственно.

Ранее было показано, что при воздействии перекиси водорода на клетки *F. tularensis* активируется синтез целого ряда белков, среди которых белок стресса GroEL [24—26]. Синтез этих белков усиливается также при размножении бактерий в макрофагах [27].

Для изучения влияния замен кодонов в гене *sodB* на транскрипцию гена *groEL* методом коли-

Таблица 3

Относительная активность фермента FeSOD у модифицированных штаммов относительно исходного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Штамм / Фаза роста	15/SodBI	15/SodBII	15/SodBIII	15 НИИЭГ
Логарифмическая	0,92 ± 0,04	0,37 ± 0,06	0,62 ± 0,05	1
Стационарная	0,99 ± 0,06	0,95 ± 0,06	0,97 ± 0,05	1

чественного ПЦР-РВ был определен уровень синтеза мРНК этого белка по сравнению с количеством 16SpРНК в модифицированных штаммах, находящихся в логарифмической фазе роста в присутствии перекиси водорода и без нее (рис. 6).

Добавление перекиси водорода в жидкую питательную среду приводило к некоторому усилению синтеза мРНК гена *groEL* всеми штаммами, включая родительский, но только у штаммов *F. tularensis* 15/SodBII и 15/SodBIII наблюдалось достоверное увеличение количества мРНК этого белка как по отношению к родительскому штамму, так и по сравнению с исследуемыми культурами, полученными без добавления перекиси водорода ($P < 0,05$).

Суммируя приведенные данные, можно сказать, что среди модифицированных вариантов вак-

цинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ штамм *F. tularensis* 15/SodBII обладает наименьшим уровнем супероксиддисмутазной активности, наибольшей чувствительностью к стрессовому воздействию параквата и перекиси водорода в логарифмической фазе роста и наибольшим уровнем активации синтеза иммунологически значимого белка GroEL. Эти данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований с использованием штамма *F. tularensis* LVS, в котором была произведена замена только стартового кодона ATG на GTG, приведшая к усилению синтеза белка GroEL [13]. В нашем случае для значимого снижения активности FeSOD помимо замены стартового кодона необходимо было заменить еще кодон TTA, находящийся в четвертом положении мРНК, на кодон TTG.

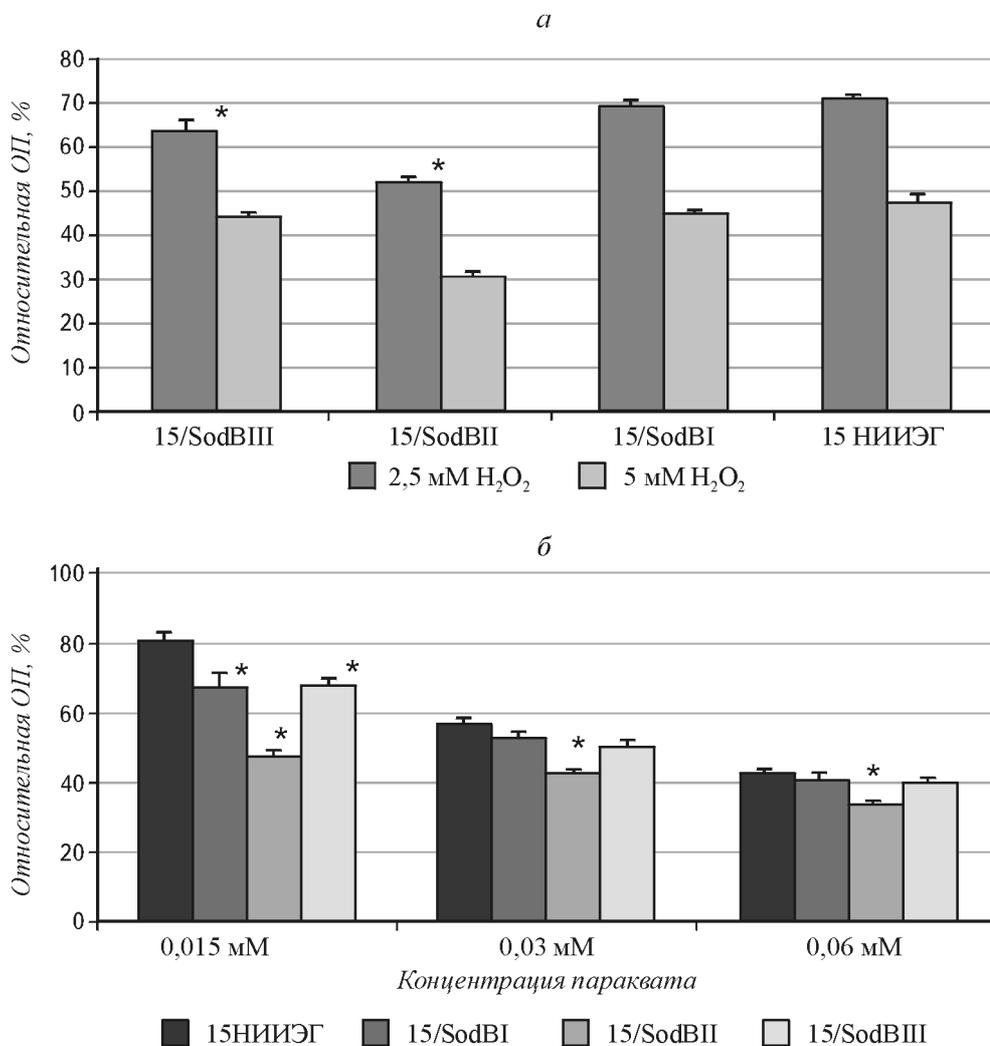


Рис. 5. Влияние перекиси водорода (а) и параквата (б) на размножение исходного и модифицированных штаммов *F. tularensis* в жидкой питательной среде ФТВ. За 100%-ную ОП принимали плотность бактериальных культур, выросших в течении 8 ч без окислительного стресса: *отмечены данные, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контрольных значений

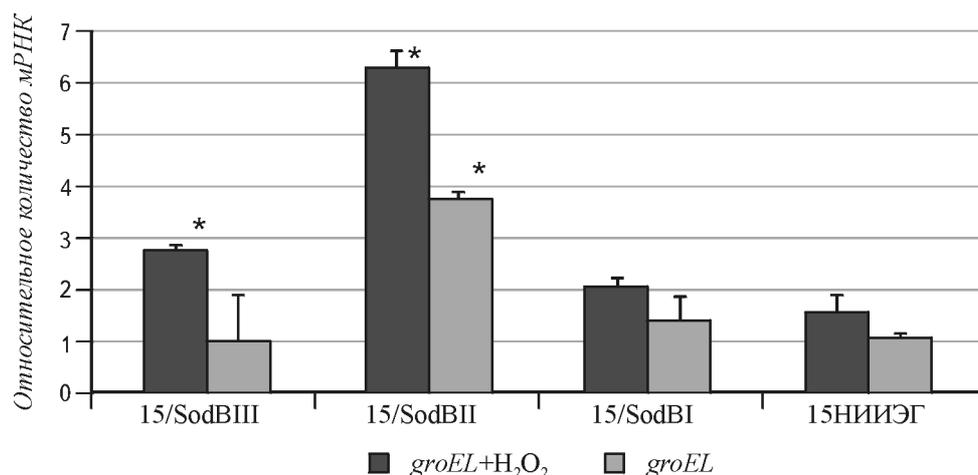


Рис. 6. Влияние перекиси водорода на уровень синтеза мРНК белка GroEL в штаммах *F. tularensis* 15/SodBI, 15/SodBII, 15/SodBIII и 15 НИИЭГ, находящихся в логарифмической фазе роста. Относительное количество мРНК выражено в числе целевых молекул мРНК в расчете на одну молекулу 16S рРНК: *отмечены данные, достоверно ($P < 0,05$) отличающиеся от контрольных значений

В результате проведенных генно-инженерных манипуляций нами на основе вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ получены модифицированные штаммы с транзитивно сниженным уровнем ферментативной активности FeSOD в результате замены в гене *sodB* природных кодонов на редко встречающиеся. Показано, что почти трехкратное снижение ферментативной активности FeSOD не влияет на скорость роста бактерий в жидкой питательной среде, но приводит к усилению синтеза стрессового белка GroEL. Полученные штаммы интересны для изучения влияния активности FeSOD на иммуногенность туляремийного микроба.

Разработанная схема модификации генов вакцинного штамма туляремийного микроба может быть использована для изучения других жизненно важных генов. Подобные модификации позволят получить информацию о роли таких генов в иммунопатогенезе туляремийного микроба. Штамм *F. tularensis* 15/SodBII, обладающий наименьшим из полученных модифицированных штаммов уровнем синтеза FeSOD, является перспективным для проведения иммунологических исследований по созданию туляремийной вакцины.

Работа выполнена в рамках темы №035 НИР «Идентификация и изучение биологических, молекулярно-генетических, биохимических характеристик возбудителя туляремии, в том числе культур с атипичными свойствами» отраслевой программы Роспотребнадзора «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и сниже-

ния инфекционной заболеваемости в Российской Федерации (на 2011—2015 гг.)».

Получено 25.08.15

ЛИТЕРАТУРА

- Oyston, P.C. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis* / P.C. Oyston, A. Sjostedt, R.W. Titball // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2004. — V. 12. — P. 967—978.
- Медуницын Н.В. Вакцинология: изд. 2-е, перераб. и доп.— М.: Триада-Х, 2004. — 448 с.
- Marohn, M.E. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals / M.E. Marohn, E.M. Barry // *Vaccine.* — 2013. — V. 31. — P. 3485—3491.
- Miller, R.A. Role of oxidants in microbial pathophysiology / R.A. Miller, B.E. Britigan // *Clin. Microbiol. Rev.* — 1997. — V.10. — P. 1—18.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. Oxygen radicals in biological system [Eds. A.J.Parker, and A.N. Glazered]. — New York: Academic Press, 1990.
- Hassan, H. M. Microbial superoxide dismutases // *Adv. Genet.* — 1989. — V. 26. — P. 65—97.
- Khelef, N. *In vivo* and *in vitro* analysis of *Bordetella pertussis* catalase and Fe-superoxide dismutase mutants / N. Khelef, D. DeShazer, R.L. Friedman, N. Guiso // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1996. — V. 142. — P. 231—235.
- Шиманюк Н.И. Супероксиддисмутазная активность у представителей рода *Francisella* / Н.И. Шиманюк, Н.В. Павлович, Б.Н. Мишанькин // *Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* — 1992. — № 5.—6. — С. 7—9.
- Gee, J. M. The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice / J.M. Gee, M.W. Valderas, M.E. Kovach, V.K. Gripper, G.T. Robertson, W.-L. Ng, J.M. Richardson, M.E.

- Winkler, R.M. II. Roop // *Infect. Immun.* — 2005. — V. 73. — P. 2873—2880.
10. Battistoni, A. Increased expression of periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase enhances survival of *Escherichia coli* invasive strains within nonphagocytic cells / A. Battistoni, F. Pacello, S. Folcarelli, M. Ajello, G. Donnarumma, R. Greco, M. Grazia Ammendolia, D. Touati, G. Rotilio, P. Valenti // *Infect. Immun.* — 2000. — V. 68. — P. 30—37.
 11. Sadosky, A. B. The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability / A.B. Sadosky, J.W. Wilson, H.M. Steinman, A.H. Shuman // *J. Bacteriol.* — 1994. — V. 176. — P. 3790—3799.
 12. Cortez, N. Molecular cloning and expression analysis of the *Rhodobacter capsulatus sodB* gene, encoding an iron superoxide dismutase / N. Cortez, N. Carrillo, C. Pasternak, A. Balzer, G. Klug // *J. Bacteriol.* — 1998. — V. 180. — P. 5413—5420.
 13. Bakshi, C.S. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence / C.S. Bakshi, M. Malik, K. Regan, J.A. Melendez, D.W. Metzger, V.M. Pavlov, T.J. Sellati // *J. Bacteriol.* — 2006. — V.188(17). — P. 6443—6448.
 14. Martin, R.G. Transcriptional and translational regulation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon in *Escherichia coli* / R.G. Martin, J.L. Rosner // *Mol. Microbiol.* — 2004. — V. 53. — P. 183—191.
 15. Лапин А.А. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis* / А.А. Лапин, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, Л.В. Домотенко, М.В. Храмов // *Пробл. особо опасных инф.* — 2009. — № 4. — С. 66—67.
 16. Мокриевич А.Н. Получение и иммунобиологические свойства вакцинного штамма туляремиального микроба без одной копии гена *iglC* и без гена *recA* / А.Н. Мокриевич, Г.М. Вахрамеева, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, Т.И. Комбарова, Т.Б. Кравченко, И.А. Дятлов, В.М. Павлов // *Молекул. генетика, микробиол., вирусол.* — 2015. — № 3. — С. 33—39.
 17. Pomerantsev, A.P. Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10 / A.P. Pomerantsev, I.R. Golovliov, Y. Ohara, A.N. Mokrievich, M. Obuchi, A. Norqvist, K. Kuoppa, V.M. Pavlov // *Plasmid.* — 2001. — V.46. — P. 210—222.
 18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.
 19. Pavlov, V.M. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis* / V.M. Pavlov, A.N. Mokrievich, K. Volkovoy // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 1996. — V. 13. — P. 253—256.
 20. Golovliov, I. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis* / I. Golovliov, A. Sjostedt, A. Mokrievich, V. Pavlov // *FEMS Microbiol Lett.* — 2003. — V. 222. — P. 273—280.
 21. Beauchamp, C.O. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C.O. Beauchamp, I. Fridovich // *Anal. Biochem.* — 1971. — V. 44. — P. 276—287.
 22. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. — М.: Изд-во «ТиРу», 2012.
 23. Bus, J.S. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity / J.S. Bus, J.E. Gibson // *Environ. Health Perspectives.* — 1984. — V. 55. — P. 37—46.
 24. Imlay, J.A. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide / J.A. Imlay, S. Linn // *J. Bacteriol.* — 1987. — V. 169. — P. 2967—2976.
 25. Ericsson, M. Long-lasting recall response of CD4+ and CD8+ alphabeta T cells, but not gammadelta T cells, to heat shock proteins of *Francisella tularensis* / M. Ericsson, M. Kroca, T. Johansson, A. Sjostedt, A. Tarnvik // *Scand. J. Infect. Dis.* — 2001. — V. 33. — P. 145—152.
 26. Ericsson, M. Increased synthesis of DnaK, GroEL, and GroES homologs by *Francisella tularensis* LVS in response to heat and hydrogenperoxide / M. Ericsson, A. Tarnvik, K. Kuoppa, G. Sandstrom // *Infect. Immun.* — 1994. — V.1. — P. 178—183.
 27. Golovliov, I. Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein / I. Golovliov, M. Ericsson, G. Sandstrom, A. Tarnvik, A. Sjostedt // *Infect. Immun.* — 1997. — V. 65. — P. 2183—2189.
- M.A. SUKHOVA, G.M. VAKHRAMEEVA,
T.B. KRAVCHENKO*, A.N. MOKRIEVICH,
V.M. PAVLOV, and I.A. DYATLOV
- The State Research Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moscovskaya oblast Russia
- e-mail: info@obolensk.org

Constructing and Studying of the Properties of *Francisella tularensis* 15 NIIEG Variants with Reduced Expression of *sodB* Gene Encoding Fe-Superoxide Dismutase

Within the frames of the investigation on constructing of an improved live tularemia vaccine with less reactogenicity by the method of allelic replacement using a suicidal plasmid pGM5, the mutant variants have been obtained from the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIIEG with a reduced expression of the superoxide dismutase *sodB* gene. This reduction was a result of the substitution of rare for frequent natural codons in the Fe-superoxide dismutase (FeSOD) gene. It was shown that the decrease in the FeSOD production up to 30% of the level in the original strain had no negative effect on the rate of the tularemia cause reproduction. It was shown that the mutant strains were more sensitive to hydrogen peroxide and paraquat as compared to the vaccine bacteria. All the strains were shown (by Q-PCR) to have at the log phase the elevated content of gene *groEL* mRNA encoding GroEL chaperone.

Key words: GroEL, FeSOD, *Francisella tularensis* 15 NIIEG, *sodB*, tularemia.

* Author for correspondence.