

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-74-80

УДК 616.98:579.841.95

Н.В. Аронова, Н.В. Павлович, М.Г. Мелоян, М.В. Цимбалистова, **А.К. Носков**

### Особенности везикуляции у вирулентных и авирулентных ЛПС-дефектных штаммов *Francisella tularensis* различной подвидовой принадлежности

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Целью работы явилось сравнительное изучение внеклеточных везикул (OMVs) и их композиционного состава у вирулентных и авирулентных (ЛПС-дефектных) штаммов *Francisella tularensis* различной подвидовой принадлежности. **Материалы и методы.** С помощью трансмиссионной электронной микроскопии изучен процесс везикуляции у бактерий *F. tularensis*. Полученные препараты OMVs охарактеризованы по композиционному составу иммунологическими методами: реакция нейтрализации антител (РНАт), иммунохроматографический анализ, дот- и иммуноблоттинг. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что все природные вирулентные штаммы, обладающие S-типом липополисахарида (ЛПС), способны к образованию двух форм везикул: округлых и тубулярных (tubes), специфичных для *F. tularensis*. У авирулентных ЛПС-дефектных штаммов образование OMVs не зарегистрировано. Выявлено, что везикулы штаммов различных подвидов имеют свои индивидуальные морфологические особенности. Тубулярные структуры среднеазиатского штамма отличались большими размерами по сравнению с голарктическим штаммом. Возможно, именно это определило тот факт, что препараты везикул *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, полученные с использованием фильтров с диаметром пор 0,22 мкм были резко обеднены тубулярными формами. Предложен способ обеззараживания суспензий бактерий с помощью гентамицина, не влияющий на морфологию и антигенную активность везикул. При сравнительном изучении нескольких серий концентрированных препаратов OMVs из разных штаммов туляремийного микроба обнаружено, что все образцы обладали антигенной активностью в реакции преципитации по Оухтерлони, РНАт, ИХ-тесте, дот- и иммуноблоттинге. Исследуемые образцы содержали иммунодоминантный антиген – ЛПС и несколько мажорных антигенактивных белков. Выявлены отличия в композиционном составе иммунодоминантных белков везикул, полученных из штаммов разных подвидов туляремийного микроба.

**Ключевые слова:** везикулы наружной мембраны, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*, ЛПС.

Корреспондирующий автор: Аронова Надежда Валентиновна, e-mail: info@tularemia.ru.

Для цитирования: Аронова Н.В., Павлович Н.В., Мелоян М.Г., Цимбалистова М.В., Носков А.К. Особенности везикуляции у вирулентных и авирулентных ЛПС-дефектных штаммов *Francisella tularensis* различной подвидовой принадлежности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 3:74–80. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-74-80

Поступила 12.01.2024. Отправлена на доработку 27.02.2024. Принята к публ. 15.03.2024.

N.V. Aronova, N.V. Pavlovich, M.G. Meloyan, M.V. Tsimbalistova, **A.K. Noskov**

### Peculiarities of Vesiculation in Virulent and Avirulent LPS-Defective Strains of *Francisella tularensis* of Various Subspecies

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to compare outer membrane vesicles (OMVs) and their composition in virulent and avirulent (LPS-defective) strains of *Francisella tularensis* of various subspecies. **Materials and methods.** The vesiculation process in *F. tularensis* bacteria was studied using transmission electron microscopy. OMVs preparations were obtained and characterized by their composition using immunological methods: antibody neutralization test, immunochromatographic analysis, dot and immunoblotting. **Results and discussion.** It has been found that all natural virulent strains with the S type lipopolysaccharide (LPS) are able to produce two forms of vesicles – spherical and tubular (“tubes”), specific for *F. tularensis*. OMVs formation has not been registered in avirulent LPS-defective strains. It is revealed that vesicles of strains of various subspecies show their own individual morphological features. The tubes of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* are larger in size as compared to those of the subsp. *holarctica* strain. This is probably the reason why vesicle preparations from *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* obtained using filters with a diameter of pores being 0.22 μm contained a significantly reduced number of tubular forms. A method of disinfection of bacterial suspensions using gentamycin, which does not affect the morphology and antigenic activity of vesicles, is proposed. A comparative study of several series of concentrated OMVs preparations obtained from different strains has revealed that all samples had antigenic activity in the precipitation Ouchterlony test, antibody neutralization test, immunochromatographic assay, dot-blot and immunoblotting. Immunodominant antigen – LPS and several major antigenic proteins have been detected in the preparations. Differences in the composition of vesicle proteins in the strains of various *F. tularensis* subspecies have been identified.

**Key words:** outer membrane vesicles, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*, LPS.

*Conflict of interest:* The authors declare no conflict of interest.

*Funding:* The authors declare no additional financial support for this study.

*Corresponding author:* Nadezda V. Aronova, e-mail: info@tularemia.ru.

*Citation:* Aronova N.V., Pavlovich N.V., Meloyan M.G., Tsimbalistova M.V., Noskov A.K. Peculiarities of Vesiculation in Virulent and Avirulent LPS-Defective Strains of *Francisella tularensis* of Various Subspecies. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 3:74–80. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-74-80

Received 12.01.2024. Revised 27.02.2024. Accepted 15.03.2024.

Aronova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7772-9276>  
Pavlovich N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>  
Meloyan M.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7268-9298>

Tsimbalistova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>  
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

В настоящее время возрастает интерес исследователей к такому феномену жизнедеятельности бактерий, как образование мембранных везикул. Установлено, что эти структуры многофункциональны и играют значимую роль в выживании и адаптации микроорганизмов, осуществляя взаимодействие бактерий с факторами окружающей среды, микробными сообществами или макроорганизмом [1–5]. Везикулы наружных мембран (OMVs) грамотрицательных бактерий имеют, как правило, сферическую форму, созданную фрагментами наружной мембраны, и содержат различные биологически активные молекулы: липополисахариды (ЛПС), ферменты, порины, токсины, рецепторы и, по некоторым данным, РНК или ДНК [1, 6]. Разнообразие композиционного состава позволяет OMVs выполнять самые разные биологические функции: принимать участие в колонизации, персистенции, экспрессии вирулентности, а также модулировать иммунный ответ хозяина [2, 6, 7]. В зависимости от условий окружающей среды бактериальные клетки способны варьировать включением тех или иных компонентов в OMVs [6, 8]. Изучение везикул наружных мембран показало их связь с пато- и иммуногенезом заболеваний бактериальной природы [1, 6, 9].

С практической точки зрения важной особенностью везикул является способность вызывать иммунный ответ макроорганизма, в том числе и специфический. Этот факт позволяет рассматривать их в качестве кандидатов в вакцинные препараты [10]. Основные преимущества такого подхода – это биологическая безопасность вакцины, нативная конформация антигенов в везикулах и возможность комбинированных препаратов [10]. Иллюстрацией этому может служить создание и успешное применение менингококковой везикулярной вакцины [11].

Туляремия является тяжелым заболеванием человека и животных и относится к вакциноконтролируемым природно-очаговым инфекциям. Этиологический агент болезни – *Francisella tularensis* – имеет длительную историю изучения, однако факторы его вирулентности до сих пор полностью не расшифрованы. В настоящее время принято считать, что патогенность возбудителя туляремии реализуется посредством сложного набора детерминант, экспрессирующихся преимущественно *in vivo* [12]. Большинство авторов признает, что одним из важных факторов вирулентности является ЛПС, который является также основным иммунодоминантным антигеном микробной клетки [13–16].

Многолетние исследования по созданию безопасной химической вакцины на основе ЛПС *F. tularensis* и антигенактивных белков не увенчались успехом. Как выявлено, очищенные препараты ЛПС или ЛПС-белковый комплекс, представляемый убитыми бактериями, не обладают токсичностью и протективной активностью [15, 17–19]. В связи с этим одним из подходов к решению проблемы может быть выяснение роли везикул бактерий в патогенезе и иммуногенезе туляремийной инфекции и создание в будущем на их основе везикулярной вакцины.

В научной литературе имеются лишь немногочисленные работы по изучению химического состава и биологической активности везикул франциселл, выполненные на весьма ограниченном наборе штаммов [19–25]. Следует подчеркнуть, что отличительной особенностью внеклеточных везикул туляремийного микроба является наличие двух видов OMVs: сферической формы, характерной для многих микробов, и палочковидной, специфичной только для франциселл, обозначаемой как трубочки (tubes или OMVs/T). Вместе с тем биологическая функция тубулярных элементов на сегодняшний день однозначно не установлена. Так, в работе I. Pavkova *et al.* показано поглощение везикул туляремийного микроба мышинными макрофагами и высказывается предположение о важной роли в этом процессе именно тубулярных структур [26]. До 2018 г. исследования выполнялись на слабо патогенном подвиде *F. tularensis* subsp. *novicida* и вакцинном штамме *F. tularensis* [19–21]. В последние годы появились работы по изучению продукции везикул и их протеома у вирулентных штаммов возбудителя [22–26]. Выявлена разница в белковом составе везикул между штаммами подвида *tularensis* и *holarctica*, а также показаны отличия в наборе белков у везикул, вырабатываемых в ответ на различные стрессовые условия окружающей среды [24, 25]. Интересно, что наибольшие изменения регистрировались в спектре белков, участвующих в биосинтезе и метаболизме компонентов бактериальной оболочки, таких как О-антиген, липид А, фосфолипиды, жирные кислоты и некоторые основные структурные белки внешней мембраны. В то же время для штаммов среднеазиатского подвида сведения о продукции везикул в литературе отсутствуют. Кроме того, протективная способность нативных везикул вирулентных штаммов возбудителя туляремии до настоящего времени изучена слабо. В частности, показано протективное действие только OMVs *F. tularensis* subsp. *novicida*

и *F. noatunensis*, а также везикул рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, презентующих на своей мембране ЛПС *F. tularensis* [19, 27–29].

**Целью** работы явилось сравнительное изучение внеклеточных везикул и их композиционного состава у вирулентных и авирулентных (ЛПС-дефектных) штаммов *F. tularensis* различной подвидовой принадлежности.

### Материалы и методы

Все этапы исследования проводили в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21. В работе использовали штаммы туляремиального микроба: *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 (типовой, вирулентный), 117 (вирулентный), 15 НИИЭГ (вакцинный); *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 543 (типовой, вирулентный) и *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 (типовой, слабо патогенный). В исследование включены также авирулентные изогенные ЛПС-дефектные варианты *F. tularensis* subsp. *holarctica* 117 *cap*<sup>-</sup> и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 543 *cap*<sup>-</sup>. Бактерии выращивали на агаре Мюллера – Хинтона с добавлением специальной ростовой добавки и полимиксина (100 ед/мл).

Визуализацию везикул в мазках стандартизованных бактериальных суспензий ( $10^{10}$  КОЕ/мл) и концентрированных препаратов проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) на цифровом микроскопе Jeol JEM 1011. Все манипуляции выполняли согласно МУ 1.3.3103-13. Для обеззараживания взвесей микроорганизмов и препаратов для электронной микроскопии использовали добавление глутарового альдегида до конечной концентрации 2,5 % с экспозицией 2 ч с последующим контролем их специфической стерильности бактериологическим методом. Исследуемые образцы окрашивали методом негативного контрастирования, для чего их наносили на сетки с пленкой-подложкой из формвара (0,5 %) и инкубировали 2 мин с 2 % раствором уранилацетата. Приготовленные образцы изучали в электронном микроскопе с увеличением в 40–200 тыс. раз.

В качестве исходного материала для выделения OMVs и OMVs/T использовали бактериальную суспензию суточной агаровой культуры в концентрации  $10^{10}$  КОЕ/мл (100 мл). Микробную взвесь обеззараживали гентамицином (200 мкг/мл, 2 ч при комнатной температуре) с последующим высевом на питательные среды с целью контроля стерильности. Для удаления клеток суспензию центрифугировали 15 мин при 10000 g и далее супернатанты фильтровали через мембраны (полиэтилсульфон, PES) с диаметром пор 0,45 мкм или 0,22 мкм. Концентрирование везикул в бесклеточных фильтрах осуществляли высокоскоростным центрифугированием (90 мин, 44000 g). Осадок ресуспендировали в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Контроль специфической стерильности полученных образцов осуществляли бактериологиче-

ским методом. Наличие и морфологию везикул в полученных препаратах оценивали по результатам просмотра мазков в ТЭМ.

Специфическую антигенную активность везикулярных препаратов исследовали в реакции преципитации по Оухтерлони и дот-блоттинге (1 мкл препарата на пятно) с экспериментальными кроличьими противотуляремиальной и «противоновицидной» сыворотками [30]. Иммунологическую активность везикул вирулентных штаммов регистрировали в реакции нейтрализации антител с коммерческим эритроцитарным антигенным туляремиальным диагностиком «РНГА-Аг-СтавНИПЧИ» (производство ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь) и с помощью иммунохроматографической тест-системы «ИХ тест-система *F. tularensis*» для выявления и идентификации возбудителя туляремии (производство ФБУН ПМБ ГНЦ Роспотребнадзора, Оболенск).

Изучение композиционного состава антигенов везикул проводили с помощью иммуноблоттинга [30]. Препараты разделяли в 15 % полиакриламидном геле в присутствии SDS по методике U.K. Laemmli [31] с последующим электропереносом на нитроцеллюлозную мембрану согласно H. Towbin, J. Gordon [30]. Для обработки блотов использовали экспериментальные кроличьи сыворотки против *F. tularensis* и *F. tularensis* subsp. *novicida* (титр 1:2500–1:5000). Антиген-активные зоны выявляли конъюгатом белка А с пероксидазой хрена (Sigma) и раствором тетраметилбензидина (ТМБ) (Serva).

### Результаты и обсуждение

Для сравнительного анализа образования OMVs у штаммов различной подвидовой принадлежности, а также оценки участия поверхностных структур туляремиального микроба в формировании внеклеточных везикул в работу включены штаммы голарктического и среднеазиатского подвида с полноценной структурой S-ЛПС, а также их изогенные ЛПС-дефектные (R-ЛПС) варианты, вакцинный штамм с укороченной длиной O-цепи ЛПС и штамм подвида *novicida* с S-ЛПС, обладающим другой антигенной специфичностью. С помощью ТЭМ стандартизованных бактериальных взвесей установлено, что вне зависимости от подвидовой принадлежности все типичные природные штаммы, в том числе и *F. tularensis* subsp. *novicida*, продуцировали везикулы двух типов: округлые (OMVs) и характерные для франциселл тубулярные (tubes, OMVs/T) (рис. 1).

Размер округлых везикул не отличался у разных штаммов и находился в пределах от 0,05 до 0,2 мкм (рис. 2).

Характерные для франциселл тубулярные структуры имели более крупные размеры – от 0,3 до 0,5 мкм в длину и 0,06–0,14 мкм в поперечнике (рис. 3).

Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, показавших, что бактерии

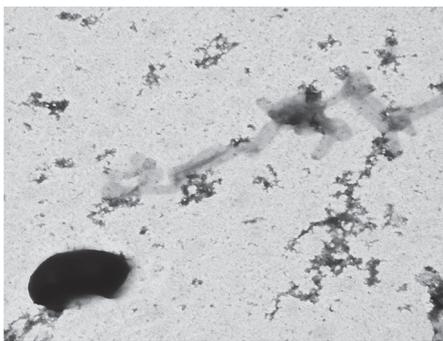


Рис. 1. Результаты ТЭМ бактериальной культуры *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503. Представлены бактериальные клетки (интенсивно окрашенные) и везикулы округлой и тубулярной формы (слабо окрашенные) (увеличение 1:60000)

Fig. 1. TEM of the bacterial culture of *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503. Bacterial cells (intensely stained) and vesicles of spherical and tubular shape (slightly stained) are presented (magnification 1:60000)

подвидов *novicida*, *holarctica* и *tularensis*, а также новый представитель рода – *F. noatunensis* продуцируют два морфотипа везикул [20, 21, 24, 25, 27, 28].

Вместе с тем результаты наших экспериментов выявили, что везикулы бактерии среднеазиатского подвида имеют свои индивидуальные особенности. Как и другие вирулентные штаммы, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 543 характеризовался интенсивной продукцией OMVs и OMVs/T. В то же время тубулярные элементы имели более крупные размеры (0,09–0,14 мкм) в ширину, чем у голарктических штаммов (0,06–0,11 мкм). Вакцинный штамм, обладающий укороченной длиной полисахаридной цепи ЛПС, уступал вирулентным штаммам и *F. tularensis* subsp. *novicida* в образовании OMVs/T. Заслуживает внимания тот факт, что, согласно данным ТЭМ, у исследуемых образцов из авирулентных мутантов туляремиального микроба, синтезирующих R-ЛПС, не зарегистрировано появление ни округлых, ни тубулярных форм везикул наружной мембраны. Эти ре-

зультаты сопоставимы с недавно опубликованными в работе J. Bavlovic *et al.*, в которой показано, что мутанты с неполноценным S-ЛПС демонстрировали низкую способность образовывать OMVs/T [32].

Полученные данные позволяют предполагать, что образование везикул у возбудителя туляремии коррелирует с синтезом полноценной капсулы и длинноцепочечной S-формы ЛПС.

Следующий этап исследования включал в себя получение концентрированных препаратов везикул туляремиального микроба разных подвигов и оценку их композиционного состава.

Анализ используемых методических приемов выделения везикул *F. tularensis* у разных авторов показал отсутствие стандартного подхода. Так, например, имеются сведения о применении мембран с разным диаметром пор (0,45 или 0,22 мкм) для удаления бактериальных клеток из препарата [22, 24]. Более того, в литературе отсутствуют данные о влиянии подвиговой принадлежности на эффективность выделения полноценных препаратов, содержащих OMVs и OMVs/T. В связи с этим мы провели предварительные опыты по изучению специфической стерильности биологического материала после фильтрации живых бактериальных взвесей разных подвигов через мембраны с различным размером пор. Контроль специфической стерильности образцов осуществляли бактериологическим методом. Как обнаружено, только мембраны 0,22 мкм позволили получить бесклеточные препараты для дальнейшей работы. В противоположность этому, мембраны 0,45 мкм не обеспечивали полное удаление бактериальных клеток, в частности препараты содержали жизнеспособные бактерии  $n \cdot 10^2$  КОЕ/мл для вирулентных штаммов *F. tularensis* и  $10^5$  КОЕ/мл для *F. tularensis* subsp. *novicida*. Поэтому мы исследовали возможность использования способа обеззараживания материала с помощью гентамицина.

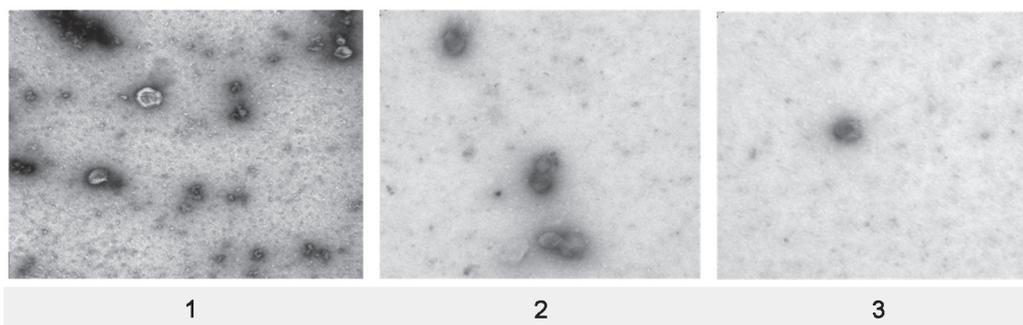


Рис. 2. Представлены OMVs округлой формы штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 (1) и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 543 (2, 3) (ТЭМ, 1:60000)

Fig. 2. OMVs of spherical shape from *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 (1) and *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 543 (2, 3) (TEM, 1:60000)

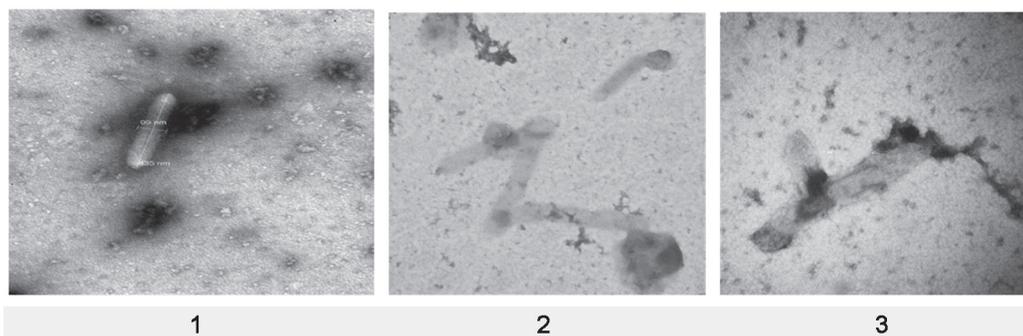


Рис. 3. Представлены OMVs тубулярной формы штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 (1, 2) и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 543 (3) (ТЭМ, 1:60000)

Fig. 3. OMVs of tubular shape from *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 (1, 2) and *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 543 (3) (TEM, 1:60000)

Установлено, что 200 мкг/мл гентамицина с экспозицией 2 ч при комнатной температуре обеспечивали специфическую стерильность бактериальной взвеси в концентрации 10<sup>10</sup> КОЕ/мл. В дальнейшем показано, что использование для выделения везикул микробных суспензий, обработанных гентамицином, не отражалось на морфологической целостности и антигенной активности OMVs и OMVs/T.

Для сравнительного анализа получены по два типа препаратов каждого подвида: с использованием фильтров с размером пор 0,45 и 0,22 мкм. Однако в отношении *F. tularensis* subsp. *novicida* образец, полученный с применением мембраны 0,45 мкм, был исключен из исследования, так как содержал большое количество клеток. Концентрирование осуществляли высокоскоростным центрифугированием (4 °C, 90 мин, 44000 g). Характеристики концентрированных образцов представлены в таблице.

Согласно результатам ТЭМ, все препараты содержали две морфологические формы везикул, за исключением образца среднеазиатского штамма, в котором после прохождения мембраны с порами 0,22 мкм крайне редко визуализировались тубулярные формы. Нельзя исключить, что данные структуры, в отличие от аналогичных палочковидных везикул subsp. *holarctica* или *novicida*, с затруднением преодолевают мембрану 0,22 мкм. Следовательно, везикулы штаммов различных подвидов имеют свои индивидуальные морфологические особенности, что необходимо учитывать при получении полноценных препаратов. Возможно, факт ограниченного проникновения через мелкие поры фильтра OMVs/T подвида *mediasiatica* обусловлен их более крупными размерами. При этом округлые формы меньшего размера присутствовали во всех изученных препаратах в большом количестве.

Исследуемые концентрированные препараты обладали четко регистрируемыми антигенными свойствами в реакции преципитации по Оухтерлони и дот-блоттинге. Дополнительно антигенная активность везикул вирулентных штаммов возбудителя туляремии, обусловленная присутствием ЛПС, подтверждена с коммерческими диагностическими препаратами в РНАт и с помощью ИХ-теста, как после мембран 0,45 мкм, так и в бесклеточных образцах (0,22 мкм). Параметры чувствительности используемых методов (10<sup>6</sup> м.кл./мл для РНАт и 10<sup>7</sup> м.кл./мл

для ИХ-теста) исключают возможность влияния на результат незначительного количества бактериальных клеток, оставшихся в материале после фильтров 0,45 мкм. Следовательно, антигенная активность препаратов обусловлена наличием везикул наружных мембран *F. tularensis*, содержащих ЛПС.

Результаты вестерн-блоттинга показали, что во всех образцах везикул возбудителя туляремии в значимых количествах присутствует иммунодоминантный специфический антиген – S-ЛПС *F. tularensis*, а в препарате *F. tularensis* subsp. *novicida* – S-ЛПС, специфичный для этого микроба (рис. 4).

Кроме того, в препаратах визуализируются несколько иммуноактивных белков с молекулярными массами в пределах 40–60 и 20–25 кДа. При сравнительном анализе препаратов, полученных из вирулентных штаммов разных подвидов возбудителя туляремии, установлено, что везикулы отличались по составу иммунодоминантных белков. Так, в везикулах штамма среднеазиатского подвида на иммуноблоте отсутствовал мажорный белок с молекулярной массой в районе 45 кДа. Особенностью штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* было присутствие высокомолекулярных белковых антигенов в пределах 40–100 кДа и так же, как и в других препаратах, наличие мажорного антигенактивного белка 20–25 кДа.

Таким образом, результаты исследования показали, что на процесс везикуляции туляремийного микроба существенное влияние оказывают поверхностные структуры бактериальной клетки. Так, наличие у туляремийного микроба полноценного S-ЛПС коррелирует со способностью бактерий к эффективной продукции везикул. В противоположность этому, у авирулентных вариантов, синтезирующих R-ЛПС, образование везикул не зарегистрировано. Наличие в везикулах в значимом количестве антигенактивного S-ЛПС *F. tularensis* свидетельствует о том, что этот биополимер принимает участие не только в продукции везикул, но и в реализации их биологических функций. Например, установлено, что в механизме поглощения везикул макрофагами важную роль играет ЛПС туляремийного микроба [26].

Впервые изучена везикуляция туляремийного микроба среднеазиатского подвида, бактерии которого характеризовались интенсивной продукцией OMVs и OMVs/T, но при этом имели свои индивидуальные особенности. При фильтрации бактериаль-

Характеристика препаратов везикул из штаммов *F. tularensis* различной подвидовой принадлежности, полученных при использовании фильтров с различным диаметром пор

Characterization of vesicle preparations from *F. tularensis* strains of different subspecies, obtained using filters with various pore size

Показатели Indicators	Подвиды <i>F. tularensis</i> / Subspecies of <i>F. tularensis</i>					
	subsp. <i>holarctica</i>		subsp. <i>mediasiatica</i>		subsp. <i>novicida</i>	
Размер пор фильтрующей мембраны, мкм Filter membrane pore size, microns	0,45	0,22	0,45	0,22	0,45	0,22
Концентрация бактерий, КОЕ/мл Bacterial content, CFU/ml	10 <sup>3</sup>	Рост отсутствует No growth	10 <sup>3</sup>	Рост отсутствует No growth	10 <sup>6</sup>	Рост отсутствует No growth
Наличие двух типов везикул, OMVs/OMVsT Presence of two types of vesicles, OMVs/OMVsT	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+

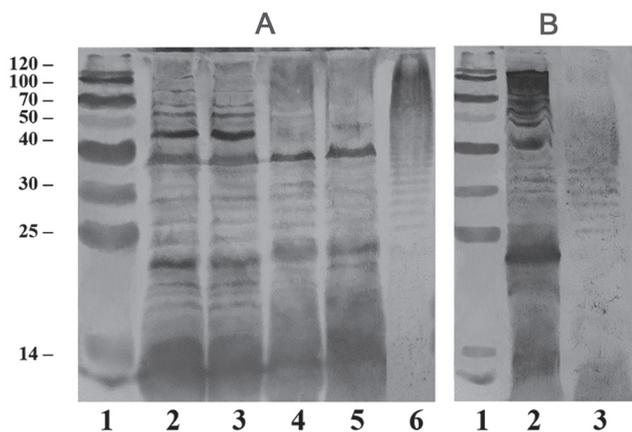


Рис. 4. Результаты иммуноблоттинга препаратов везикул:

A – иммуноблоттинг препаратов везикул с экспериментальной кроличьей противотуляремийной сывороткой. Треки: маркеры молекулярного веса (кДа) (1); препараты везикул штаммов *F. tularensis* 503 при использовании фильтров 0,22 мкм (2) и 0,45 мкм (3); *F. tularensis* 543 при использовании фильтров 0,22 мкм (4) и 0,45 мкм (5); препарат ЛПС *F. tularensis* 503 (50 мкг) (6);

B – иммуноблоттинг препаратов везикул с экспериментальной кроличьей сывороткой против *F. tularensis* subsp. *novicida*. Треки: маркеры молекулярного веса (кДа) (1); препарат везикул *F. tularensis* subsp. *novicida* при использовании фильтров 0,22 мкм (2); препарат ЛПС *F. tularensis* subsp. *novicida* (50 мкг) (3)

Fig. 4. Results of immunoblotting of vesicle preparations:

A – immunoblotting of vesicle preparations with experimental rabbit serum against *F. tularensis*. Tracks: molecular weight markers (kDa) (1); vesicle preparations of *F. tularensis* 503 when using filters of 0.22 microns (2) and 0.45 microns (3); *F. tularensis* 543 when using filters of 0.22 microns (4) and 0.45 microns (5); LPS preparation of *F. tularensis* 503 (50 mcg) (6);

B – immunoblotting of vesicle preparations with experimental rabbit serum against *F. tularensis* subsp. *novicida*. Tracks: molecular weight markers (kDa) (1); *F. tularensis* subsp. *novicida* vesicle preparation when using filters of 0.22 microns (2) and *F. novicida* LPS preparation (50 mcg) (3)

ных суспензий через мембраны с мелкими порами (0,22 мкм) получены образцы, обедненные содержанием тубулярных форм. Можно предположить, что данный факт связан с более крупными, по сравнению с голарктическим штаммом, размерами этих структур. Более того, выявлена разница в спектре иммунодоминантных белков везикул в зависимости от подвидовой принадлежности родительского штамма. Полученные результаты обуславливают перспективность дальнейшего изучения роли внеклеточных везикул в пато- и иммуногенезе туляремийной инфекции.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

**Список литературы**

1. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
2. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
3. Schwechheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(10):605–19. DOI: 10.1038/nrmicro3525.
4. Малкова М.А., Дудина Л.Г., Девришов Д.А., Бывалов А.А. Везикулообразование грамотрицательных бактерий (обзор литературы). *Advanced Science.* 2017; 4:3.

5. Луста К.А. Бактериальные мембранные внеклеточные нановезикулы: строение, биогенез, функции, использование в биотехнологии и медицине (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология.* 2015; 51(5):443–52. DOI: 10.7868/S0555109915040091.
6. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(1):81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.
7. Schooling S.R., Beveridge T.J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* 2006; 188(16):5945–57. DOI: 10.1128/JB.00257-06.
8. Lee E.Y., Choi D.S., Kim K.P., Gho Y.S. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom. Rev.* 2008; 27(6):535–55. DOI: 10.1002/mas.20175.
9. Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26(8):1343–7. DOI: 10.4014/jmb.1604.04080.
10. Wang S., Gao J., Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019; 11(2):e1523. DOI: 10.1002/wnan.1523.
11. Pizza M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms.* 2020; 8(10):1521. DOI: 10.3390/microorganisms8101521.
12. Spidlova P., Stojkova P., Sjöstedt A., Stulik J. Control of *Francisella tularensis* virulence at gene level: network of transcription factors. *Microorganisms.* 2020; 8(10):1622. DOI: 10.3390/microorganisms8101622.
13. Jones B.D., Faron M., Rasmussen J.A., Fletcher J.R. Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:32. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00032.
14. Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2015; 5:94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094.
15. Ellis J., Oyston C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4):631–46. DOI: 10.1128/CMR.15.4.631-646.2002.
16. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Сравнительный анализ иммунного ответа кролика на антигены живых и убитых бактерий рода *Francisella*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2001; 2:26–30.
17. Sandström G., Sjöstedt A., Johansson T., Kuoppa K., Williams J.C. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1992; 5(4):201–10. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05902.x.
18. Оноприенко Н.Н., Павлович Н.В. Роль липополисахарида в токсичности бактерий рода *Francisella*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2003; 3:23–9.
19. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 2011; 10(3):954–67. DOI: 10.1021/pr1009756.
20. McCaig W.D., Koller A., Thanassi D.G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J. Bacteriol.* 2013; 195(6):1120–32. DOI: 10.1128/JB.02007-12.
21. Chen F., Cui G., Wang S., Nair M.K.M., He L., Qi X., Han X., Zhang H., Zhang J.R., Su J. Outer membrane vesicle-associated lipase FtlA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(7):e66. DOI: 10.1038/emi.2017.53.
22. Champion A.E., Bandara A.B., Mohapatra N., Fulton K.M., Twine S.M., Inzana T.J. Further characterization of the capsule-like complex (CLC) produced by *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*: protective efficacy and similarity to outer membrane vesicles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:182. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00182.
23. Sampath V., McCaig W.D., Thanassi D.G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol. Microbiol.* 2018; 107(4):523–41. DOI: 10.1111/mmi.13897.
24. Klimentova J., Pavkova I., Horcickova L., Bavlovic J., Kofronova O., Benada O., Stulik J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* releases differentially loaded outer membrane vesicles under various stress conditions. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2304. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02304.
25. Klimentova J., Rehulka P., Pavkova I., Kubelkova K., Bavlovic J., Stulik J. Cross-species proteomic comparison of outer membrane vesicles and membranes of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* versus subsp. *holarctica*. *J. Proteome Res.* 2021; 20(3):1716–32. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00917.
26. Pavkova I., Klimentova J., Bavlovic J., Horcickova L., Kubelkova K., Vlcek E., Raabova H., Filimonenko V., Ballek O., Stulik J. *Francisella tularensis* outer membrane vesicles participate in the early phase of interaction with macrophages. *Front. Microbiol.* 2021; 12:748706. DOI: 10.3389/fmicb.2021.748706.
27. Brudal E., Lampe E.O., Reubsæet L., Roos N., Hegna I.K., Thrane I.M., Koppang E.O., Winther-Larsen H.C. Vaccination with outer membrane vesicles from *Francisella noatumensis* reduces

development of francisellosis in a zebrafish model. *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 42(1):50–7. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.10.025.

28. Lagos L., Tandberg J.I., Repnik U., Boysen P., Ropstad E., Varkey D., Paulsen I.T., Winther-Larsen H.C. Characterization and vaccine potential of membrane vesicles produced by *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in an adult zebrafish model. *Clin. Vaccine Immunol.* 2017; 24(5):e00557-16. DOI: 10.1128/CVI.00557-16.

29. Stevenson T.C., Cywes-Bentley C., Moeller T.D., Weyant K.B., Putnam D., Chang Y.F., Jones B.D., Pier G.B., DeLisa M.P. Immunization with outer membrane vesicles displaying conserved surface polysaccharide antigen elicits broadly antimicrobial antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2018; 115(14):E3106–E3115. DOI: 10.1073/pnas.1718341115.

30. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding – current status and outlook. *J. Immunol. Methods.* 1984; 72(2):313–40. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90001-2.

31. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

32. Bavlovic J., Pavkova I., Balonova L., Benada O., Stulik J., Klimentova J. Intact O-antigen is critical structure for the exceptional tubular shape of outer membrane vesicles in *Francisella tularensis*. *Microbiol. Res.* 2023; 269:127300. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127300.

## References

1. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.

2. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.

3. Schwechheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(10):605–19. DOI: 10.1038/nrmicro3525.

4. Malkova M.A., Dudina L.G., Devrishov D.A., Byvalov A.A. [Vesicle formation in gram-negative bacteria (literature review)]. *Advanced Science.* 2017; (4):3.

5. Lusta K.A. [Bacterial outer membrane nanovesicles: structure, biogenesis, functions, use in biotechnology and medicine (review)]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology]*. 2015; 51(5):443–52. DOI: 10.7868/S0555109915040091.

6. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(1):81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.

7. Schooling S.R., Beveridge T.J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* 2006; 188(16):5945–57. DOI: 10.1128/JB.00257-06.

8. Lee E.Y., Choi D.S., Kim K.P., Gho Y.S. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom. Rev.* 2008; 27(6):535–55. DOI: 10.1002/mas.20175.

9. Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26(8):1343–7. DOI: 10.4014/jmb.1604.04080.

10. Wang S., Gao J., Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019; 11(2):e1523. DOI: 10.1002/wnan.1523.

11. Pizza M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms.* 2020; 8(10):1521. DOI: 10.3390/microorganisms8101521.

12. Spidlova P., Stojkova P., Sjöstedt A., Stulik J. Control of *Francisella tularensis* virulence at gene level: network of transcription factors. *Microorganisms.* 2020; 8(10):1622. DOI: 10.3390/microorganisms8101622.

13. Jones B.D., Faron M., Rasmussen J.A., Fletcher J.R. Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:32. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00032.

14. Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2015; 5:94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094.

15. Ellis J., Oyston C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4):631–46. DOI: 10.1128/CMR.15.4.631-646.2002.

16. Aronova N.V., Pavlovich N.V. [Comparative analysis of the rabbit's immune response to antigens of live and killed bacteria of the genus *Francisella*]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2001; (2):26–30.

17. Sandström G., Sjöstedt A., Johansson T., Kuoppa K., Williams J.C. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide

from *Francisella tularensis* LVS. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1992; 5(4):201–10. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05902.x.

18. Onoprienko N.N., Pavlovich N.V. [The role of lipopolysaccharide in the toxicity of bacteria of the genus *Francisella*]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2003; (3):23–9.

19. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 2011; 10(3):954–67. DOI: 10.1021/pr1009756.

20. McCaig W.D., Koller A., Thanassi D.G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J. Bacteriol.* 2013; 195(6):1120–32. DOI: 10.1128/JB.02007-12.

21. Chen F., Cui G., Wang S., Nair M.K.M., He L., Qi X., Han X., Zhang H., Zhang J.R., Su J. Outer membrane vesicle-associated lipase FtlA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(7):e66. DOI: 10.1038/emi.2017.53.

22. Champion A.E., Bandara A.B., Mohapatra N., Fulton K.M., Twine S.M., Inzana T.J. Further characterization of the capsule-like complex (CLC) produced by *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*: protective efficacy and similarity to outer membrane vesicles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:182. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00182.

23. Sampath V., McCaig W.D., Thanassi D.G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol. Microbiol.* 2018; 107(4):523–41. DOI: 10.1111/mmi.13897.

24. Klimentova J., Pavkova I., Horcickova L., Bavlovic J., Kofronova O., Benada O., Stulik J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* releases differentially loaded outer membrane vesicles under various stress conditions. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2304. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02304.

25. Klimentova J., Rehulka P., Pavkova I., Kubelkova K., Bavlovic J., Stulik J. Cross-species proteomic comparison of outer membrane vesicles and membranes of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* versus subsp. *holarctica*. *J. Proteome Res.* 2021; 20(3):1716–32. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00917.

26. Pavkova I., Klimentova J., Bavlovic J., Horcickova L., Kubelkova K., Vlcek E., Raabova H., Filimonenko V., Ballek O., Stulik J. *Francisella tularensis* outer membrane vesicles participate in the early phase of interaction with macrophages. *Front. Microbiol.* 2021; 12:748706. DOI: 10.3389/fmicb.2021.748706.

27. Brudal E., Lampe E.O., Reubsaet L., Roos N., Hegna I.K., Thrane I.M., Koppang E.O., Winther-Larsen H.C. Vaccination with outer membrane vesicles from *Francisella noatunensis* reduces development of francisellosis in a zebrafish model. *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 42(1):50–7. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.10.025.

28. Lagos L., Tandberg J.I., Repnik U., Boysen P., Ropstad E., Varkey D., Paulsen I.T., Winther-Larsen H.C. Characterization and vaccine potential of membrane vesicles produced by *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in an adult zebrafish model. *Clin. Vaccine Immunol.* 2017; 24(5):e00557-16. DOI: 10.1128/CVI.00557-16.

29. Stevenson T.C., Cywes-Bentley C., Moeller T.D., Weyant K.B., Putnam D., Chang Y.F., Jones B.D., Pier G.B., DeLisa M.P. Immunization with outer membrane vesicles displaying conserved surface polysaccharide antigen elicits broadly antimicrobial antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2018; 115(14):E3106–E3115. DOI: 10.1073/pnas.1718341115.

30. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding – current status and outlook. *J. Immunol. Methods.* 1984; 72(2):313–40. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90001-2.

31. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

32. Bavlovic J., Pavkova I., Balonova L., Benada O., Stulik J., Klimentova J. Intact O-antigen is critical structure for the exceptional tubular shape of outer membrane vesicles in *Francisella tularensis*. *Microbiol. Res.* 2023; 269:127300. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127300.

## Authors:

Aronova N.V., Pavlovich N.V., Meloyan M.G., Tsimbalistova M.V., Noskov A.K. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

## Об авторах:

Аронова Н.В., Павлович Н.В., Мелоян М.Г., Цимбалистова М.В., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru.