

С.А.Агеев, Р.З.Шайхутдинова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Т.И.Комбарова, С.В.Дентовская, А.П.Анисимов

КОНСТРУИРОВАНИЕ КАНДИДАТА В ВАКЦИННЫЕ ШТАММЫ *YERSINIA PESTIS* С ПОНИЖЕННОЙ РЕАКТОГЕННОСТЬЮ

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск.

Разработана методология направленного конструирования лишенных маркеров антибиотикоустойчивости неревертирующих $\Delta lpxM$ мутантов *Y. pestis*, сочетающая прямой сайт-направленный мутагенез, клонирование мутантной аллели $\Delta lpxM::cat$ в суицидном векторе pCVD442, гомологичную рекомбинацию *in vivo* и удаление кассеты устойчивости к антибиотикам. Созданный на основе вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ нокаутный мутант по гену *lpxM*, лишенный маркеров антибиотикоустойчивости, синтезировал липополисахарид (ЛПС) со сниженной способностью стимулировать продукцию TNF- α . Степень снижения провоспалительной активности ЛПС, синтезируемого мутантным штаммом *Y. pestis* EV $\Delta lpxM$, была значительно выше в тестах на клетках-мишенях человека по сравнению с мышинной моделью.

Ключевые слова: *lpxM*, сайт-направленный мутагенез, липополисахарид, эндотоксическая активность, *Yersinia pestis*.

Применяемая в настоящее время в странах СНГ чумная живая вакцина на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* EV стимулирует напряженный и эффективный поствакцинальный иммунитет и предохраняет от гибели после заражения атипичными вариантами возбудителя чумы за счет индукции иммунного ответа на целый ряд антигенов, расположенных на клеточной поверхности как типичных, так и измененных бактерий [4]. Однако и эта вакцина имеет значительные ограничения в применении из-за ее высокой реактогенности, связанной с наличием липополисахарида (ЛПС) в составе клеточной стенки *Y. pestis*. Одним из возможных путей уменьшения реактогенности является генно-инженерная модификация ЛПС, предотвращающая встраивание в липид А шестого жирно-кислотного остатка лауриновой кислоты [2]. Ранее был сконструирован мутант вакцинного штамма EV с нарушенным встраиванием лауриновой кислоты, у которого центральная часть кодирующего ее гена *lpxM* была замещена на ген устойчивости к канамицину. По данным авторов, по сравнению с исходным вакцинным штаммом $\Delta lpxM::kan$ мутант обладал сниженной реактогенностью [5, 8]. Однако использование такого штамма в качестве основы для живой вакцины недопустимо из-за присутствия в его геноме гена лекарственной устойчивости [9]. Поэтому целью настоящего исследова-

ния была разработка методики получения мутантного по гену *lpxM* штамма *Y. pestis*, лишенного маркеров лекарственной устойчивости как основы для разработки новой живой чумной вакцины со сниженной реактогенностью.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы, плазмиды, клеточные линии и животные. Для мутагенеза использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Для проведения генетических манипуляций применяли штаммы *Escherichia coli* DH5 α λ pir (конструирование суицидной плазмиды для мутагенеза) и S17 λ pir (конъюгативный перенос сконструированной суицидной плазмиды в клетки *Y. pestis*). Штаммы *E. coli* выращивали на жидких и плотных питательных средах Лурия-Бертани при температуре 37 °C [12]. Клетки *Y. pestis* выращивали на жидких и плотных питательных средах Хоттингера (pH 7,2–7,4) при температуре 28 °C. Используемые в работе плазмиды представлены в таблице.

В качестве клеток-индукторов TNF- α использовали макрофагоподобную мышиную линию J774.1A и линию человеческих промиелоцитов U937. Летальную токсичность ЛПС и индукцию TNF- α *in vivo* определяли для 8–10-недельных самок мышей

Используемые плазмиды

Плазмиды	Характеристика	Источник
pCP20	<i>bla cat c1857</i> λ P _R <i>flp</i> pSC101 <i>oriTS</i>	[6]
pCVD442	<i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>bla</i> , <i>sacB</i>	[7]
pCVD442- $\Delta lpxM::cat$	pCVD442, содержащая фрагмент $\Delta lpxM::cat$	Настоящее исследование
pKD3	<i>bla FRT cat FRT</i> PS1 PS2 <i>oriR6K</i>	[6]
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 <i>oriTS</i>	[6]

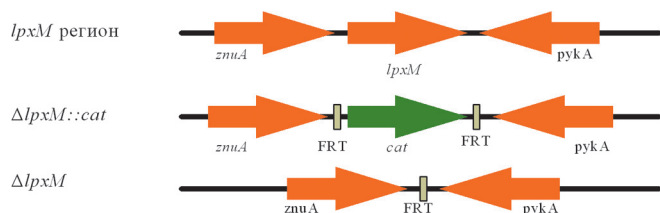


Рис. 1. Схема конструирования LpxM-варианта штамма *Y. pestis* EV

линии BALB/c массой (19±2) г.

Конструирование штаммов *Y. pestis* с инактивированным геном *lpxM*. Рестрикционно-лигазные работы выполняли по руководству T.Maniatis *et al.* [11].

На основе вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, предварительно трансформированного RedGam-хелперной плазмидой pKD46, был получен мутант $\Delta lpxM::cat$ путем замены кодирующей последовательности гена на кассету устойчивости к хлорамфениколу [6] (рис. 1). ПЦР-продукт для мутагенеза, амплифицированный с праймерами Cat1-f (ataacgtgtcttctgtaatgatgattagccaccgccaattctaagagttcccgtagtagctggagctgcttc) и Cat2-r (tggtacgaccaataaccagtcgtatcatccgcgtcgaataagttattttaagataatgggaattagccatggctcc), представлял собой ген *cat* плазмиды pKD3, ограниченный FRT сайтами и фланкированный с двух сторон короткими участками гомологии (55 п.н.) гена *lpxM*. После введения методом электропорации в вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ 100 нг полученного ПЦР-продукта отбирали клоны с фенотипом Cm^R Ap^R. В дальнейшем мутантную аллель $\Delta lpxM::cat$ сконструированного штамма *Y. pestis* EV $\Delta lpxM::cat$ /pKD46 амплифицировали с праймерами Cat3-f (agtctgtcagccatcgtag) и Cat4-r (atgggtgcscatcacatcgcc) и клонировали в суицидном векторе pCVD442, предварительно гидролизованном SmaI, в клетках *E. coli* DH5 α λ pir. Передачу рекомбинантной плазмиды pCVD442- $\Delta lpxM::cat$ в штамм *E. coli* S17 λ pir осуществляли методом электропорации, а из него в штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ – методом конъюгативного переноса. Контрselection конъюгантов *Y. pestis* и вторичную рекомбинацию проводили, как описано ранее [7].

Удаление кассеты устойчивости к хлорамфениколу в инактивированном гене и последующую элиминацию плазмиды pCP20 проводили, как описано ранее [6]. В результате был получен лишенный маркера антибиотикоустойчивости штамм *Y. pestis* EV $\Delta lpxM$ (Ap^SCm^S) с инактивированным геном *lpxM*. Для подтверждения корректности структуры полученных мутантов на каждом из этапов мутагенеза использовали ПЦР (рис. 2). Для определения нуклеотидной последовательности фрагмента $\Delta lpxM$ штамма *Y. pestis* EV $\Delta lpxM$ использовали прямой метод секвенирования без предварительного клонирования геномных фрагментов ДНК.

Выделение и анализ структуры ЛПС. Выделение, электрофоретический контроль препаратов и визуализацию ЛПС в полиакриламидных гелях, а также

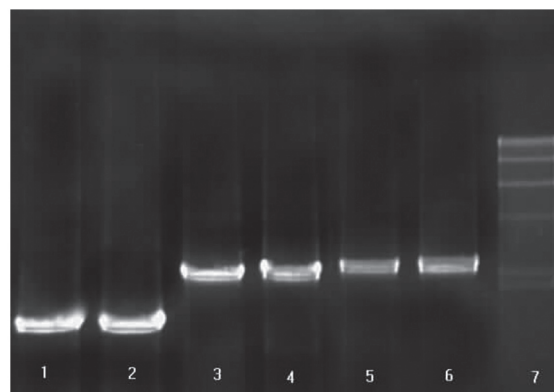


Рис. 2. Сравнительный анализ продуктов амплификации ДНК штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, EV $\Delta lpxM::cat$ и EV $\Delta lpxM$:

Треки: 1, 2 – EV $\Delta lpxM$ (1268 п.н.); 3, 4 – EV $\Delta lpxM::cat$ (2198 п.н.); 5, 6 – EV НИИЭГ (2457 п.н.); 7 – ДНК λ гидролизованная рестриктазой HindIII. Электрофорез в 0,7 % агарозном геле

определение структуры полученных препаратов ЛПС с помощью масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с Фурье преобразованием и ионизацией электрораспылением (МС ИЭР) проводили, как описано ранее [10]. В качестве отрицательного контроля при изучении индукции цитокинов и определении летальной токсичности использовали ЛПС вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15/10, не обладающий эндотоксической активностью [3]. В качестве положительного контроля в экспериментах по индукции цитокинов использовали ЛПС штамма *E. coli* O55:B5 (Sigma).

Индукция TNF- α *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vivo* определяли количество TNF- α в сыворотке крови мышей BALB/c, сенсibilизированных актиномицином Д, после введения препаратов ЛПС в дозе 50 мкг/мышь. В экспериментах *in vitro* определяли количество TNF- α в супернатанте клеток млекопитающих после их инкубации с ЛПС в дозах от 3 до 300 нг/мл в течение 18 ч. Количество TNF- α в клеточном супернатанте или в сыворотке крови мышей методом иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы Bender MedSystems.

Определение летальной токсичности ЛПС. Токсичность ЛПС определяли по величине LD₅₀ после подкожного введения 5-кратных разведений препаратов ЛПС мышам линии BALB/c. Вычисление величин LD₅₀ и доверительных интервалов (для вероятности 95 %) определяли по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

Оценка безвредности. Определение безвредности исследуемых штаммов проводили в соответствии с методическими указаниями МУ 3.3.1.1113-02 «Основные требования отбора новых вакцинных штаммов чумного микроба».

Результаты и обсуждение

Разработанная методология направленного конструирования лишенных маркеров антибиотикоустойчивости нереввертирующих мутантов *Y. pestis*,

сочетающая прямой сайт-направленный мутагенез, клонирование мутантной аллели $\Delta lpxM::cat$ в суицидном векторе pCVD442, гомологичную рекомбинацию *in vivo* и удаление кассеты устойчивости к антибиотику позволила нам получить $\Delta lpxM$ мутант вакцинного штамма EV линии НИИЭГ. Препарат ЛПС, выделенный из мутантного штамма, мигрировал в ДСН-ПААГ быстрее и с образованием более компактной полосы, чем препарат исходного штамма EV линии НИИЭГ, подтверждая меньший размер молекул. Согласно результатам проведенной МС ИЭР, масс-спектр липида A EV $\Delta lpxM$ включал только тетраацильные и пентаацильные варианты, в то время как в масс-спектре исходного штамма EV НИИЭГ присутствовали тетраацильные, пентаацильные и гексаацильные производные липида A.

Мы оценили TNF- α -индуцирующую активность препаратов ЛПС, выделенных из мутантного штамма *Y. pestis* EV $\Delta lpxM$ и вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, используя мышиную макрофагоподобную клеточную линию J774A.1 и линию человеческих промиелоцитов U937. Индукция синтеза TNF- α препаратом ЛПС из штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для обеих клеточных культур была дозозависимой и не отличалась от таковой контрольного ЛПС штамма *E. coli* O55:B5. Модифицированный ЛПС слабее индуцировал синтез TNF- α макрофагами по сравнению с ЛПС «дикого типа». Использование клеток-мишеней различной видовой принадлежности позволило установить, что уменьшение эндотоксической активности мутантного ЛПС более выражено на человеческих, и менее – на мышинных клетках-мишенях (рис. 3). Количество TNF- α в супернатанте моноцитарных клеток U937 увеличивалось незначительно и практически не отличалось от уровня, индуцируемого ЛПС *F. tularensis* 15/10, который был использован в качестве отрицательного контроля. Выявленное различие провоспалительного ответа макрофагов разной видовой принадлежности на действие исходного и мутантного ЛПС, скорее всего,

обусловлено разной специфичностью рецепторов к ЛПС у человека и мыши [13].

Данные, полученные нами на мышиную макрофагоподобную клеточную линию J774A.1 *in vitro*, согласовались с данными, полученными на мышях линии BALB/c в экспериментах *in vivo*. Внутривентральное введение обоих препаратов ЛПС мышам, sensibilizированным актиномицином Д, приводило к индукции синтеза TNF- α . Уровень TNF- α в сыворотке мышей после введения ЛПС исходного вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ достоверно превышал аналогичный показатель для препарата ЛПС EV $\Delta lpxM$ – (52,9 \pm 5,9) нг/мл и (38,0 \pm 4,1) нг/мл соответственно. Уровень TNF- α у животных контрольной группы не поднимался выше 50 пкг/мл. Введение ЛПС *F. tularensis* не приводило к повышению уровня сывороточного TNF- α у мышей.

Уровни LD₅₀ для ЛПС родительского штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и мутантного штамма EV $\Delta lpxM$ для мышей линии BALB/c составили 648,3 (205–5149,3) и 129,7 (32,6–516,2) мг/мышь соответственно. Таким образом, делеция гена *lpxM* приводила к пятикратному снижению токсичности мутантного ЛПС.

Оценка безвредности штамма EV $\Delta lpxM$ для белых мышей линии BALB/c по сравнению с исходным штаммом EV НИИЭГ также продемонстрировала снижение его токсических свойств. Иммунизация мышей мутантным штаммом EV $\Delta lpxM$ не вызывала гибели животных при подкожном введении его в дозах от 10² до 10⁷ КОЕ, тогда как введение эталонного штамма EV НИИЭГ в дозах 10⁵ и 10⁷ КОЕ на мышь приводило к гибели 10 и 40 % животных.

Таким образом, разработанный комплекс методических приемов, препаратов ДНК и бактериальных штаммов обеспечивает контролируемое конструирование лишенных маркеров лекарственной устойчивости *lpxM* мутантов *Y. pestis* – кандидатов в вакцинные штаммы со сниженной реактогенностью, а также может быть легко адаптирован для других грамотрицательных бактерий. Созданный на основе

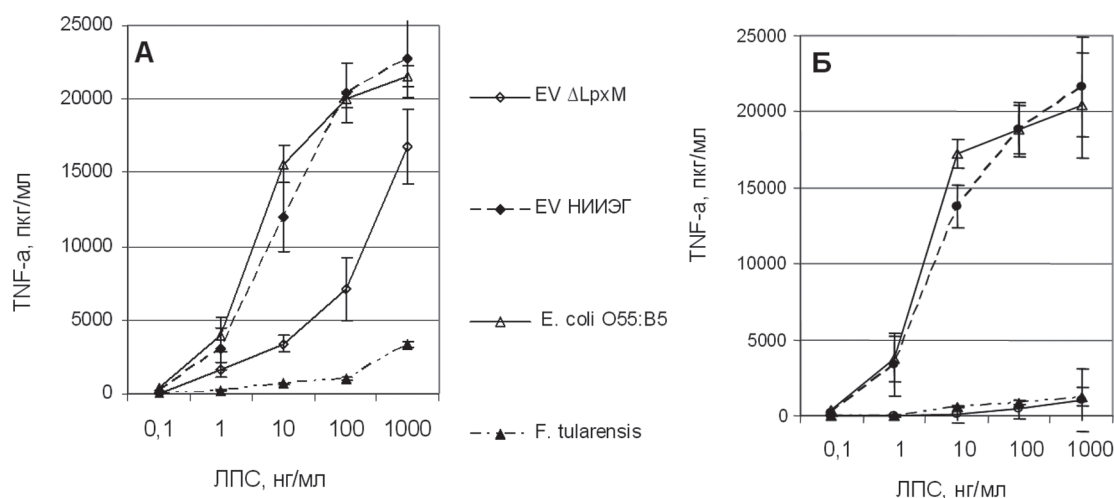


Рис. 3. Уровни TNF- α в супернатанте макрофагоподобных мышинных клеток J774.1A (А) и моноцитарных клеток человека U937 (Б) после стимуляции препаратами ЛПС из штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ и EV $\Delta lpxM$

вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ нокаутный мутант по гену *lpxM*, лишенный маркеров антибиотикоустойчивости, синтезировал ЛПС со сниженной способностью стимулировать продукцию TNF- α . Степень снижения провоспалительной активности ЛПС, синтезируемого мутантным штаммом *Y. pestis* EV Δ *lpxM*, была значительно выше в тестах на клетках-мишенях человека по сравнению с мышинной моделью.

Работа выполнена по государственным контрактам № 124-Д от 11.06.2009 г. и № 52-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Государственное издательство медицинской литературы; 1962, 104 с.
2. Дентовская С.В., Шайхутдинова Р.З., Книрель Ю.А., Иванов С.А., Анисимов А.П. Конструирование вакцинных штаммов грамотрицательных бактерий со сниженной реактогенностью. Мол. генет. 2006; 2:3–8.
3. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Шайхутдинова Р.З., Кондакова А.Н., Быстрова О.В. и др. Структурное разнообразие и эндотоксическая активность липополисахарида *Yersinia pestis*. Биохимия. 2008; 73(2):237–46.
4. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.
5. Anisimov A.P., Shaikhutdinova R.Z., Pan'kina L.N., Feodorova V.A., Savostina E.P., Byistrova O.V. et al. Effect of deletion of the *lpxM* gene on virulence and vaccine potential of *Yersinia pestis* in mice. J. Med. Microbiol. 2007; 56(4):443–53.
6. Datsenko K., Wanner B. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97:6641–45.
7. Donnenberg M.S., Kaper J.B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect. Immun. 1991; 29(12):4310–7.
8. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P., Sayapina L.V., Motin V.L., Dentovskaya S.V. et al. A *Yersinia pestis* *lpxM*-mutant live vaccine induces enhanced immunity against bubonic plague in mice and guinea pigs. Vaccine. 2006; 25:7620–8.
9. Frey J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. Vaccine. 2006; 25:5598–605.
10. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z. et al. Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 2005; 44(5):1731–43.
11. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular cloning:

a laboratory manual. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982; 281 p.

12. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. 1972. 280 p.

13. Walsh C., Gangloff M., Monie T., Smyth T., Wei B., McKinley T.J. et al. Elucidation of the MD-2/TLR4 interface required for signaling by lipid IVA. J. Immunol. 2008; 181(2):1245–54.

S.A.Ageev, R.Z.Shaikhutdinova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, T.I.Kombarova, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov

Construction of Candidate *Yersinia pestis* Vaccine Strains with Reduced Reactogenicity

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

The technology of directed constructing of non-reverting *Y. pestis* Δ *lpxM* mutants, lacking antibiotic resistance markers was developed. It included direct site-specific mutagenesis, cloning of mutant Δ *lpxM::cat* allele in pCVD442 suicide vector, homologous recombination *in vivo* and deletion of the antibiotic resistance cassette. *lpxM* gene knockout mutant created on the basis of vaccine *Y. pestis* EV NIEG strain lacking antibiotic resistance markers synthesized a lipopolysaccharide (LPS) with reduced ability to stimulate TNF- α production. The level of reduction of anti-inflammatory activity of the LPS synthesized by the mutant *Y. pestis* EV Δ *lpxM* strain was significantly higher in the test with human target cells in comparison with mouse model.

Key words: *lpxM*, site-specific mutagenesis, lipopolysaccharide, endotoxic activity, *Yersinia pestis*.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistic Methods in Microbiological Investigations]. Leningrad: Gos. Izd. Med. Lit.; 1962. 104 p.
2. Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Knirel' Yu. A., Ivanov S.A., Anisimov A.P. [Constructing of Gram-Negative Bacteria Vaccine Strains with Reduced Reactogenicity]. Mol. Gen. 2006; 2:3–8.
3. Dentovskaya S.V., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Shaikhutdinova R.Z., Kondakova A.N., Byistrova O.V., Lindner B., Knirel Y.A., Anisimov A.P. [Structural Diversity and Endotoxic Activity of the Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*]. Biochemistry. 2008; 73(2):192–9.

Authors:

Ageev S.A., Shaikhutdinova R.Z., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kombarova T.I., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: anisimov@obolensk.org

Об авторах:

Агеев С.А., Шайхутдинова Р.З., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболениск, Московская обл. E-mail: anisimov@obolensk.org

Поступила 27.01.11.