

А.А.Лапин, А.Н.Мокриевич, Г.М.Вахрамеева, Т.И.Комбарова, И.В.Бахтеева,  
И.А.Дятлов, В.М.Павлов

## ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15/10 С ДЕЛЕТИРОВАННЫМ ГЕНОМ *recA*

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Делеция гена *recA* в геноме *Francisella tularensis* 15/10 приводит к повышению чувствительности к ультрафиолетовому облучению, снижению способности к гомологичной рекомбинации, незначительному снижению вирулентности для мышей. Эффективность размножения штамма *Francisella tularensis* 15/10 $\Delta$ *recA* в макрофагоподобных клетках, устойчивость к бактерицидному действию нормальной кроличьей сыворотки и протективные свойства на мышинной модели туляремии не изменились по сравнению с штаммом *Francisella tularensis* 15/10.

**Ключевые слова:** туляремийный вакцинный штамм, ген *recA*, рекомбинация, протективные свойства.

A.A.Lapin, A.N.Mokrievich, G.M.Vakhrameeva, T.I.Kombarova, I.V.Bakhteeva, I.A.Dyatlov, V.M.Pavlov

## Immunobiological Properties of *Francisella tularensis* 15/10 Strain with Deleted *recA* Gene

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Deletion of *recA* gene in *Francisella tularensis* 15/10 genome leads to the increase in its sensitivity to ultraviolet irradiation, reduction of the homologous recombination capacity, and a slight decline of virulence for mice. Efficacy of *Francisella tularensis* 15/10 $\Delta$ *recA* reproduction within microphage-like cells, its resistance to normal rabbit serum, and protective properties on the mouse model of tularemia are the same as in original *Francisella tularensis* 15/10.

**Key words:** tularemia vaccine strain, *recA* gene, recombination, protective properties.

Для профилактики туляремии в РФ используется живая вакцина, созданная на основе штамма *F. tularensis* 15/10. Анализ нуклеотидной последовательности генома штамма *F. tularensis* LVS [10], производного штамма *F. tularensis* 15/10, показал наличие *recA*-подобного гена [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=19299>]. Но функциональная роль этого гена для туляремийного микроба остается невыясненной. Ранее для близкородственного микроорганизма *F. tularensis subsp. novicida* было показано, что удаление *recA*-подобного гена приводит к повышению чувствительности к ультрафиолетовому облучению и воздействию алкилирующих агентов [5], но отсутствовали данные о влиянии этой мутации на гомологичную рекомбинацию и иммунобиологические свойства. Известно, что инактивация белка RecA в вакцинном штамме *Micobacterium bovis* BCG привела к стабилизации вакцинных свойств [7]. Поэтому представляет определенный интерес изучение иммунобиологических свойств *F. tularensis* 15/10 без *recA*-подобного гена.

### Материалы и методы

Штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в таблице.

Штамм *Francisella tularensis* 15/10 $\Delta$ *recA* получен методом аллельного обмена, описанным ранее [6].

Культивирование штаммов *F. tularensis* проводили при температуре 37 °С на среде FT-агар (ФГУН ГНЦ ПМБ) и жидкой питательной среде (FTB) [2],

при необходимости в питательные среды добавляли антибиотики полимиксин В (Pm) 100 мкг/мл, хлорамфеникол (Cm) 3 мкг/мл. Культивирование штаммов *E. coli* проводили на питательной среде Лурия-Бертани (LB) [8] при температуре 37 °С с добавлением соответствующих антибиотиков Cm 10 мкг/мл, Ap 100 мкг/мл.

Для приготовления клеточных бактериальных суспензий использовали забуференный физиологический раствор (ЗФР), pH 7,2. Стандартные генно-инженерные манипуляции проводили как описано [3]. Для определения чувствительности к перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) использовался диско-диффузионный метод с диаметром дисков 5 мм. Определение чувствительности к УФ-облучению проводили, используя UV-облучатель с длиной волны 254 нм, «Cole Parmer», США.

Линию мышинных макрофагоподобных клеток J774.A1 культивировали в пластиковых флаконах и планшетах для культур тканей (Corning Costar, США) в концентрации 3–9·10<sup>5</sup> м.к./мл в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Gibco, США) с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки теленка, 2 мМ L-глутамин и 0,2 % бикарбоната натрия при температуре 37 °С и концентрации углекислого газа 5 % в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, США).

Нормальная кроличья сыворотка (НКС) была получена от кроликов породы шиншилла. Оценку устойчивости к НКС туляремийных штаммов проводили по выживаемости бактерий в НКС после инкубирования бактериальной суспензии в концентрации 1·10<sup>6</sup> КОЕ/мл при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Штаммы и плазмиды

Название	Характеристика	Источник или ссылка
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> <i>supE44 ΔlacU169</i> (φ801acZΔM15) <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> -m <sub>k</sub> -) <i>recA</i> 19 <i>endAI</i> <i>gyrA96 thi-I elAI</i>	[13]
<i>E. coli</i> S17-1	<i>thi, thr, leu, tonA, lacy, supE, recA</i> : :RP4-2-Tc: :Mu, Kn: :Tn7	[11]
<i>E. coli</i> S17-1(pHV33-mob)	<i>E. coli</i> S17-1 с плазмидой pHV33-mob	[6]
<i>E. coli</i> S17-1(pHV33-mob/ <i>recA</i> )	<i>E. coli</i> S17-1 с плазмидой pHV33-mob/ <i>recA</i>	Данная работа
<i>Francisella tularensis</i> 15/10	Pm <sup>r</sup> , прототип вакцинного штамма	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»
<i>Francisella tularensis</i> 15/10Δ <i>recA</i>	<i>F. tularensis</i> 15/10 с инактивированным геном <i>recA</i>	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»
<i>Francisella tularensis</i> 15/10Δ <i>recA</i> (pHV33-mob/ <i>recA</i> )	<i>F. tularensis</i> 15/10 с инактивированным геном <i>recA</i> , несущий плазмиду pHV33-mob/ <i>recA</i> , содержащую регион хромосомной ДНК с нативным геном <i>recA</i>	Данная работа
<i>E. coli</i> S17-1(pPV/Δ <i>iglC</i> )	<i>E. coli</i> S17-1 с плазмидой pPV/Δ <i>iglC</i>	[6]
pPV/Δ <i>iglC</i>	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , <i>sacB</i> , <i>mob</i> содержит фрагмент хромосомы <i>F. tularensis</i> 15/10 с инактивированным геном <i>iglC</i>	[6]
pHV33-mob	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>s</sup>	[6]
pHV33-mob/ <i>recA</i>	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>s</sup> , содержит регион хромосомной ДНК <i>F. tularensis</i> 15/10 с нативным геном <i>recA</i>	Данная работа

В работе использовали мышей линии BALB/c. Определение LD<sub>50</sub> проводили согласно методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1]. Мышей линии BALB/c (по 5 в группе, самцы и самки, возраст 6–8 недель, массой 18–20 г) инфицировали подкожно бактериальной суспензией в дозах 1·10<sup>1</sup>, 1·10<sup>2</sup>, 1·10<sup>3</sup> и 1·10<sup>4</sup> КОЕ/мышь и наблюдали в течение 30 дней. Определение протективности проводили аналогично определению LD<sub>50</sub>, по прошествии 30 дней, мышам вводили подкожно культуру *F. tularensis* 503 в дозе 1·10<sup>3</sup> КОЕ/мышь (DCI штамма *F. tularensis* 503 для мышей линии BALB/c равна 1 КОЕ).

Ампликон размером 4009 п.о. с геном *recA* был получен с праймерами FSA 5'-AAAGTCGACCTG GTGGTTTGATGGTT-3' и RSA 5'-AAAGTCGACTAC CATCTCAAGGTACT-3' на матрице ДНК клеток штамма *F. tularensis* 15/10.

Плазида pHV33-mob/*recA* была получена в результате встраивания в плазмиду pHV33-mob по сайту рестрикции SalI ампликона с геном *recA*. Селекцию клонов *E. coli* DH5α с плазмидой pHV33-mob/*recA* проводили на среде с ампициллином с последующим ПЦР-анализом с праймерами FSA, RSA.

Мобилизационный перенос плазмид из клеток *E. coli* S17-1 в клетки *F. tularensis* проводили как описано [6].

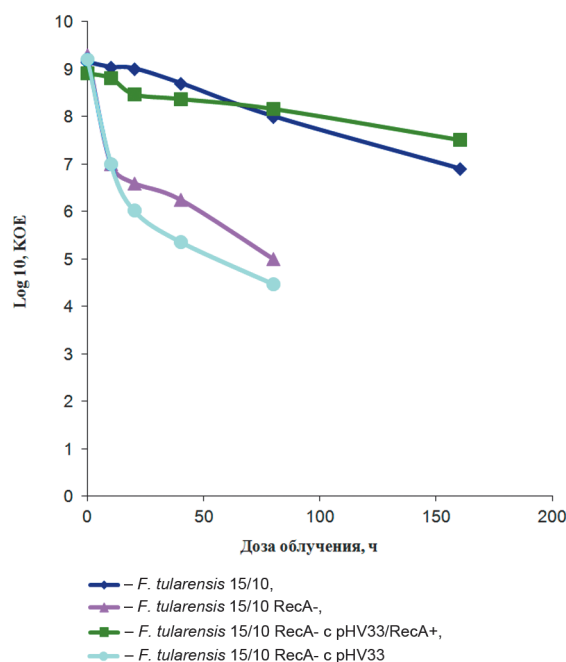
Результаты и обсуждение

Делеция гена *recA* не повлияла на культурально-морфологические свойства штамма при выращивании на плотных и жидких питательных средах. После 48 часов инкубации на FT-агаре выросли колонии диаметром 2 мм с характерной для культур вакцинного штамма туляремийного микроба формой и цветом.

Время удвоения оптической плотности культуры на среде FTB равнялось двум часам.

В мышинных макрофагоподобных клетках линии J774.A1 количество клеток *F. tularensis* 15/10Δ*recA* увеличилось за 21 ч в 44 раза, что не отличалось от данных для клеток штамма *F. tularensis* 15/10.

Клетки штамма *F. tularensis* 15/10Δ*recA* обладают повышенной чувствительностью к УФ-облучению по сравнению с исходным штаммом *F. tularensis* 15/10 (рисунок). Введение плазмиды pHV33-mob/*recA* с геном *recA* в клетки *F. tularensis* 15/10Δ*recA* полностью восстанавливает устойчивость бактерий к УФ-облучению.



Устойчивость штаммов *F. tularensis* 15/10 к УФ-облучению

Чувствительность бактерий штамма *F. tularensis* 15/10  $\Delta recA$  к бактерицидному действию перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) сравнима с таковой для клеток *F. tularensis* 15/10. Для концентраций перекиси водорода 1 % зона подавления составляла 0,9 см. Бактерицидная активность НКС для штаммов *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$  и *F. tularensis* 15/10 была практически одинакова и составила 10 % выживаемости. Эффективность переноса плазмиды pHV33-mob в штамм *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$  сопоставима с таковой родительского штамма *F. tularensis* 15/10.

Процесс гомологичной рекомбинации изучался с использованием плазмиды pPV/ $\Delta iglC$ , несущей последовательность, гомологичную хромосомной ДНК *F. tularensis* 15/10. Частота интеграции pPV/ $\Delta iglC$  в хромосомную ДНК штамма *F. tularensis* 15/10 составляла  $10^{-7}$ , тогда как для *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$  клоны с интегрированной плазмидой не получены, т.е. частота интеграции составляла менее  $10^{-9}$ . Эти данные позволяют сделать вывод о том, что делеция *recA* гена приводит к репрессии механизма рекомбинации.

Удаление гена *recA* из клеток *F. tularensis* 15/10 привело к десятикратному снижению остаточной вирулентности по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15/10.  $LD_{50}$  штамма *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$  составила  $5,0 \cdot 10^3$  КОЕ.

Мыши линии BALB/c, иммунизированные клетками штамма *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$  в дозе  $1 \cdot 10^1$ ,  $1 \cdot 10^2$ ,  $1 \cdot 10^3$  и  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/мышь, были устойчивы к заражению в дозе  $1 \cdot 10^3$  КОЕ/мышь штамма *F. tularensis* 503.

Таким образом, изучение иммунобиологических свойств полученного штамма *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$  сравнительно со штаммом исходного типа показало одинаковые культурально-морфологические свойства и повышение чувствительности к ультрафиолетовому облучению. Данное наблюдение совпадает с результатами работы [5] и, возможно, говорит об участии гена *recA* в репарации повреждений хромосомы, вызванных УФ-облучением. Полученные данные об отсутствии влияния мутации гена *recA* у клеток *F. tularensis* на чувствительность к  $H_2O_2$  не отличают туляремийный микроб от *Brucella abortus* [9]. Мутантный штамм сохранил свойство выживать в нормальной кроличьей сыворотке [4] и не утратил способности к размножению в макрофагоподобных клетках J774. А1, что важно для формирования в организме хозяина клеточного иммунитета [12]. Аттенуирование на порядок при сохранении протективных свойств можно рассматривать как положительный признак для живой вакцины, а существенное снижение способности к гомологичной рекомбинации позволяет говорить о стабилизации полезных качеств штамма.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 58 с.
2. Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(102):66–7.
3. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1964. 479 с.
4. Мокриевич А.Н., Кондакова А.Н., Валаде Э., Платонов М.Е., Вахрамеева М.Е., Шаikhутдинова Р.З., Миронова Р.И., Блах Д., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Комбарова Т.И., Видаль Д., Павлов В.М., Линднер Б., Дятлов И.А., Книрель Ю.А. Биологические свойства и строение липополисахарида вакцинного штамма *Francisella tularensis*, полученного при инактивации гена «чувства кворума» *qseC*. Биохимия. 2010; 75(4):539–48.
5. Berg J.M., Mdluli K.E., Nano F.E. Molecular Cloning of the *recA* Gene and Construction of a *recA* Strain of *Francisella novicida*. Infect. and Immun. 1992; 60(2): 690–3.
6. Golovliov I., Sjostedt A., Mokrievich A., Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol. Lett. 2003; 222:273–80.
7. Keller M., Boettger E.C., Sande P. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural *recA* mutant. BMC Microbiol. 2008; 8:120.
8. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. N.Y.: Gold Harbor Laboratory. 1972. 436 p.
9. Roux C.M., Booth N.J., Bellaire B.H., Gee J.M., Roop R.M. II, Kovach M.E., Tsois R.M., Elzer P.H., Ennis D.G. RecA and RadA Proteins of *Brucella abortus* Do Not Perform Overlapping Protective DNA Repair Functions following Oxidative Burst J. Bacteriol. 2006; 188(14):5187–95.
10. Sandstrom G. The tularemia vaccine. J. Chem. Tech. Biotech. 1994; 59:315–20.
11. Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology. 1983; 1:784–91.
12. Sjostedt A., Sandstrom G., Tärnvik A., Jaurin B. Nucleotide sequence and T-cell epitopes of a membrane protein of *Francisella tularensis*. J. Immunol. 1990; 145:311–7.
13. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Res. 1989; 17:3469–78.

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

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 58 p.
2. Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. [Simple liquid nutrient medium for molecular genetic investigations of *Francisella tularensis*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 4(102):66–7.
3. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. M.: Mir; 1964. 479 p.
4. Mokrievich A.N., Kondakova A.N., Valade E., Platonov M.E., Vakhrameeva M.E., Shaikhutdinova R.Z., Mironova R.I., Blakha D., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Kombarova T.I., Vidal' D., Pavlov V.M., Lindner B., Dyatlov I.A., Knirel' Yu.A. [Biological properties and lipopolysaccharide structural organization of *Francisella tularensis* vaccine strain obtained after *qseC* gene inactivation]. Biokhimiya. 2010; 75(4):539–48.

### Authors:

Lapin A.A., Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

### Об авторах:

Лапин А.А., Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Дятлов И.А., Павлов В.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 04.07.11.