

Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*

Д.А.Кузнецова, О.Н.Подладчикова

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

Настоящее исследование посвящено изучению гидроксаматного сидерофора иерсиниахелина (Ych) возбудителя чумы *Yersinia pestis*. Целью работы были создание рекомбинантного штамма кишечной палочки – продуцента Ych, анализ экспрессии этого сидерофора в гетерологичном хозяине и оценка возможности использования рекомбинантного штамма для получения препарата Ych. В результате на основе плазмидного вектора сконструирована рекомбинантная плаزمид, содержащая четыре гена биосинтеза Ych (аналоги *ypj1529-1532*) без собственного промотора, которые экспрессируются под контролем нерегулируемого железом векторного P_{lac} промотора. Рекомбинантная плазмид, введенная в штамм *E. coli*, не синтезирующий собственные сидерофоры, способствует значительной экспрессии Ych. Сравнение свойств рекомбинантного и контрольного штамма, содержащего векторную плазмиду, позволило заключить, что экспрессия Ych в клетках кишечной палочки способствует защите бактерий от реактивных соединений кислорода. Анализ продукции Ych рекомбинантным штаммом выявил его перспективность для выделения Ych и его дальнейшей характеристики.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, сидерофор иерсиниахелин, рекомбинантная плазмид

Для цитирования: Кузнецова Д.А., Подладчикова О.Н. Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*. Бактериология. 2018; 3(1): 36–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44

Cloning and expression of *Yersinia pestis* yersiniachelin siderophore biosynthesis genes in *Escherichia coli*

D.A.Kuznetsova, O.N.Podladchikova

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

The present study investigates the *Yersinia pestis* hydroxamate siderophore yersiniachelin (Ych). We aimed at obtaining the recombinant *E. coli* strain-producer of Ych and the analysis of the siderophore expression in the heterologous host as well as at the possible application of the recombinant strain for Ych isolation. As a result we constructed a recombinant plasmid which carried four genes of the Ych biosynthesis (*ypj1529-1532* analogues) without their own promoter and being expressed under the control of Fe-independent vector P_{lac} promoter. When introduced into the strain which is unable to produce its own siderophores, the recombinant plasmid promoted significant Ych expression. The comparison of the recombinant and control strain carrying vector plasmid allowed us to conclude that Ych expression in *E. coli* protects bacteria from reactive oxygen species. The analysis of Ych production by the recombinant strain suggested that the strain is perspective for preparation and further characterization of Ych.

Keywords: *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, yersiniachelin siderophore, recombinant plasmid

For citation: Kuznetsova D.A., Podladchikova O.N. Cloning and expression of *Yersinia pestis* yersiniachelin siderophore biosynthesis genes in *Escherichia coli*. Bacteriology. 2018; 3(1): 36–44. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44

Железо является существенным элементом в метаболизме патогенных бактерий, однако в организме животных его доступность ограничена низкой растворимостью в физиологических условиях и прочной связью с белками, которые выполняют функции неспецифической защиты

хозяина от бактерий [1]. Повышение продукции этих белков в ответ на инфекцию является одним из элементов «пищевого иммунитета», который ограничивает доступность железа для бактерий [2]. Этот процесс способствует еще большему снижению концентрации свободного железа [3]. Недос-

Для корреспонденции:

Кузнецова Дарья Александровна, младший научный сотрудник, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40

Телефон: (863) 240-2703

E-mail: dariakuz3112@bk.ru

Статья поступила 23.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Daria A. Kuznetsova, junior researcher, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute

Address: 117/40 M. Gorkogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-2703

E-mail: dariakuz3112@bk.ru

The article was received 23.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

таток железа является для бактерий сигналом присутствия в организме хозяина, вследствие чего они перестраивают свой метаболизм [4]. Одним из первых этапов этой перестройки является секреция в среду низкомолекулярных хелаторов железа – сидерофоров, извлекающих этот элемент из комплексов с белками и доставляющих его бактериям [5, 6].

Известно, что сидерофоры вносят существенный вклад в развитие инфекционного процесса и являются признанными факторами вирулентности, выполняющими также множество других функций [7]. Они участвуют в поглощении ионов других «биологических» металлов и защищают бактерии от токсического действия ионов тяжелых металлов [8], обладают антиоксидантными свойствами [9], выполняют регуляторную функцию [10, 11]. В организме хозяина сидерофоры могут подавлять рост резидентной микрофлоры [12], способствовать выживанию бактерий в сыворотке крови [13], препятствовать ассимиляции фагоцитами железа, необходимого для их бактерицидного действия [14], стимулировать продукцию цитокинов [15], оказывать токсическое действие на ткани хозяина [16], а также служить секретиремым токсином, разрушающим митохондрии фагоцитов [17].

Многие патогены продуцируют несколько сидерофоров, которые выполняют разные функции [18], активных в отношении разных источников железа в организме хозяина и на разных этапах инфекции [19, 20]. В литературе накапливается все больше данных о том, что способность патогенных бактерий продуцировать множественные сидерофоры коррелирует с тяжестью вызываемого патогенами заболевания. Прежде всего, это связано с многообразием функций сидерофоров во время инфекции, а также с их разным родством к белку иммунной системы сидерокалину-2, который продуцируется эпителиальными клетками и нейтрофилами и инактивирует некоторые сидерофоры [21]. По современным представлениям, комбинация продуцируемых патогеном сидерофоров определяет его «репликативные ниши» и модулирует реакцию хозяина на инфекцию [7].

Важная роль сидерофоров для вирулентности бактерий подтверждается и многолетними исследованиями фенолятного сидерофора иерсиниабактина (Ybt) *Yersinia pestis*, который кодируется островом высокой патогенности (HPI-1) в составе нестабильного хромосомного *pgm* локуса [22]. Хотя этот сидерофор многие годы исследуется как на модели *Y. pestis*, так и других синтезирующих его патогенных энтеробактерий, у него продолжают обнаруживаться все новые функции, и механизм его участия в патогенезе чумы остается предметом изучения. У Ybt выявлена антиоксидантная активность [23], а также способность связывать ионы цинка [24] и меди, в комплексе с которой он проявляет активность супероксид-дисмутазы, снижающей токсичность радикалов и способствующей выживанию бактерий в макрофагах [25]. Эти исследования показали, что Ybt необходим возбудителю чумы не только для ассимиляции железа в организме млекопитающих, но и для защиты бактерий от бактерицидного действия систем врожденного иммунитета.

Многие годы Ybt считался единственным сидерофором *Y. pestis*, поскольку штаммы, не синтезирующие Ybt, на индикаторной среде для выявления сидерофоров [26] не проявляют сидерофорной активности [27]. Однако в секвениро-

ванных геномах разных штаммов *Y. pestis* выявлены гены биосинтеза и транспорта и других сидерофоров. Экспрессия этих генов *in vitro* и *in vivo* подтверждается результатами анализа данных транскриптомных и протеомных исследований [28]. Тем не менее сами сидерофоры не были выделены и охарактеризованы, и их роль в физиологии возбудителя чумы неизвестна.

Наши исследования [29] показали, что *Y. pestis* действительно синтезирует еще один, гидроксаматный сидерофор иерсиниахелин (Ych), который кодируется хромосомным *usu* локусом, присутствующим у всех секвенированных штаммов *Y. pestis*. Структура Ych и его роль в физиологии *Y. pestis* в настоящее время не установлены. Неизвестно, участвует ли он в ассимиляции железа и других биологических металлов или выполняет какую-либо другую из множества свойственных сидерофорам функций. Для ответа на эти вопросы необходимо иметь препаративные количества Ych, которые невозможно получить из природных штаммов *Y. pestis*, которые в лабораторных условиях синтезируют лишь незначительные количества Ych.

В цели настоящего исследования входило создание рекомбинантного штамма кишечной палочки – продуцента Ych, анализ экспрессии этого сидерофора в гетерологичном хозяине и оценка возможности использования рекомбинантного штамма для выделения Ych.

Материалы и методы

Штаммы и питательные среды. Конструирование рекомбинантной плазмиды, содержащей гены биосинтеза Ych, было проведено в штамме *E. coli* Strata (Stratagene, США). Этот штамм резистентен к стрептомицину и содержит мутацию в гене β -галактозидазы *lacZ*ΔM15. Кроме того, штамм несет мутации в генах эндонуклеазы (*endA*) и рекомбиназы (*recA*) и не способен к рестрикции чужеродных фрагментов ДНК. Для экспрессии рекомбинантного Ych использован штамм *E. coli* H1884, не синтезирующий собственный сидерофор энтеробактин (штамм получен от д-ра А.Ракина, Германия).

Культуры бактерий выращивали в жидких и на плотных питательных средах LB (DIFCO, США), Хоттингера (ФКУЗ РостНИПЧИ) и M9, в которую при необходимости добавляли соли трехвалентного железа в концентрации 100 мкМ. Сидерофорную активность штаммов определяли на универсальной индикаторной среде для выявления сидерофоров [26]. Во все среды добавляли антибиотик ампициллин (50 мг/мл).

Праймеры и векторная плаزمиды. Праймеры для получения ПЦР-копии генов биосинтеза Ych (*p1529fov* и *p1532rev*) были разработаны в настоящей работе с помощью программы Vector NTI на основе последовательности нуклеотидов генома секвенированных штаммов *Y. pestis*, представленных в общедоступных базах данных. Для анализа рекомбинантной плазмиды с помощью ПЦР, кроме этих праймеров, дополнительно использовали праймер *pM13rev*, который предложен фирмой Stratagene (США). Структура праймеров представлена в таблице 1.

В качестве вектора для клонирования генов биосинтеза Ych использовали плазмиду pSC-A-amp/kan (Stratagene,

Таблица 1. **Использованные в работе праймеры**

Название	Структура	Происхождение
<i>pM13 rev</i>	5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'	StrataClone
<i>p1529fov</i>	5' CCAAGTTCCTGCATTAGACAGA 3'	Настоящее исследование
<i>p1532rev</i>	5' CGTTGCCGGATCATTACTGACCCTGAAT 3'	Настоящее исследование

Таблица 2. **Режим амплификации ДНК с праймерами *p1529f* и *p1532r***

Операция	Температура, °С	Время	Количество циклов
Начальная денатурация	98	4 мин	1
Денатурация	98	20 сек	
Отжиг	55	30 сек	25
Элонгация	72	4 мин	
Досинтез	72	4 мин	1

США), содержащую ген α -пептида β -галактозидазы (*lacZ*), с участками для клонирования фрагментов ДНК. При встраивании рекомбинантного фрагмента в вектор α -пептид не синтезируется, что позволяет производить отбор рекомбинантных клонов по отсутствию β -галактозидазной активности на индикаторной среде (2% X-gal).

Конструирование рекомбинантной плазмиды. ПЦР-копия генов, кодирующих биосинтез Ych, была получена с помощью праймеров *p1529f* и *p1532r* на матрице хромосомной ДНК, выделенной из вакцинного штамма *Y. pestis* EV76. Для ПЦР была использована ДНК-полимераза Pfu (Promega Corporation, США), совершающая минимальное количество ошибок при амплификации. Условия получения ПЦР-копии генов биосинтеза Ych представлены в таблице 2.

Полученный ПЦР-фрагмент длиной 5,63 т.п.н. был клонирован в клетках *E. coli* Strata в составе плазмидного вектора pSC-A-amp/kan (4,3т.п.н.) с помощью набора для клонирования ПЦР-продуктов StrataClone (Stratagene, США). Лигирование фрагмента с вектором, трансформацию клеток и отбор рекомбинантных клонов проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя набора. В качестве контроля использовали векторную плазмиду pSC-A-amp/kan. Препараты векторной и рекомбинантной (pSC-A-5EV) плазмид были получены из клеток *E. coli* Strata с помощью набора для выделения плазмид (Fermentas, EU). Препаратами трансформировали штамм *E. coli* H1884 методом электропорации. Выявление в клетках трансформантов векторной и рекомбинантной плазмид проводили путем гель-электрофореза в агарозном геле тотальной клеточной ДНК, а также с помощью ПЦР с праймерами *pM13rev* (комплементарен векторной ДНК) и *p1532rev* (комплементарен 3'-концу встроенного в вектор фрагмента ДНК).

Выделение рекомбинантного Ych. Для оценки возможности выделения Ych из рекомбинантного штамма была использована методика выделения сидерофоров гидроксаматного типа [30]. Для этого по 1 мл суспензии (10^9 мк/мл) контрольного и рекомбинантного штаммов, выращенных на агаре LB при 37°C, засеивали в 25 мл минимальной среды M9 и инкубировали 72 ч с аэрацией при 26°C. Бактерии осаждали центрифугированием при 8000 об/мин 15 мин, супернатант отбирали и фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм для удаления оставшихся бактерий. Фильтраты экстрагировали 10 мл бензилового

спирта, спиртовую фракцию отделяли в делительной воронке и смешивали с 50 мл этилового эфира и 2 мл воды. Водную фазу отделяли в делительной воронке и концентрировали в вакуумном роторном испарителе до объема 0,5 мл. Препараты, полученные из контрольного и рекомбинантного штаммов, анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах силикагеля с пришитой фазой С3 (Плазмохром RP3, МПО «Манометр», Россия). В качестве мобильной фазы при восходящей хроматографии использовали 60% этанол. Хроматограммы проявляли с помощью паров йода.

Результаты и обсуждение

Конструирование рекомбинантной плазмиды, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина

С целью конструирования рекомбинантной плазмиды, способствующей экспрессии Ych, была использована ПЦР-копия четырех кодирующих биосинтез Ych генов (*upo1529-1532*), которая была синтезирована с помощью праймеров *p1529f* и *p1532r* на матрице хромосомной ДНК, выделенной из вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 (рис. 1А). При этом ПЦР продукт длиной 5,63 т.п.н. не содержал регуляторных элементов экспрессии генов (промотора и оператора, узнаваемого репрессором Fur), ответственных за регуляцию биосинтеза Ych концентрацией железа в среде. В продукте также отсутствовали гены транспортных белков, необходимых для поглощения нагруженного железом Ych бактериями, и ген ферриредуктазы (*upo1528*), обеспечивающей освобождение железа из его комплекса с Ych внутри бактерий.

Полученный ПЦР-продукт был лигирован с помощью набора для клонирования ПЦР-продуктов (Stratagene, США) с плазмидным вектором pSC-A-amp/kan (4,3 т.п.н.), и лигазная смесь была использована для трансформации штамма *E. coli* Strata. В качестве контроля использовали препарат векторной плазмиды pSC-A-amp/kan. Анализ полученных клонов путем электрофореза тотальной клеточной ДНК в агарозном геле показал, что в синих клонах выявлялась плазида, соответствующая по подвижности вектору, а в белых – рекомбинантная плазида pSC-A-5EV с меньшей подвижностью в геле, следовательно, с большей молекулярной массой за счет рекомбинантного фрагмента ДНК (рис. 2А).

Для подтверждения наличия генов биосинтеза Ych в рекомбинантной плазмиде был проведен анализ двух штаммов с помощью ПЦР (рис. 2Б). В контрольном штамме, содержащем векторную плазмиду, отсутствует продукт амплификации с праймерами *pM13r* (комплементарен векторной ДНК) и *p1532r* (комплементарен 3'-концу рекомбинантного фрагмента ДНК). В то же время рекомбинантный штамм дает ПЦР-фрагмент длиной около 6 т.п.н., соответствующий по длине теоретически рассчитанному фрагменту ДНК (5,63 т.п.н. от рекомбинантного фрагмента + 0,15 т.п.н. от векторной ДНК). Эти данные свидетельствовали о встраивании рекомбинантного фрагмента ДНК в правильной ориентации по отношению к векторному промотору.

Таким образом, генетические эксперименты показали, что нами была получена рекомбинантная плазида, содер-

жащая гены биосинтеза Ych под контролем векторного промотора Plac, активность которого не подавляется белком-репрессором Fur и не зависит от наличия в среде железа. Эта плазмида была использована в дальнейшей работе для получения штамма-производителя Ych, а векторная плазмида pSC-A-amp/kan во всех экспериментах служила контролем.

Получение штамма *E. coli* – производителя иерсиниахелина

Для получения производителя Ych в качестве хозяина для рекомбинантной плазмиды pSC-A-5EV был использован экспериментальный штамм *E. coli* H1884, не синтезирующий

собственный сидерофор энтеробактин вследствие делеции генов биосинтеза энтеробактина entD и entF. Отсутствие синтеза собственного сидерофора в штамме-производителе, полученном из *E. coli* H1884, гарантирует получение из него более чистого препарата Ych. Кроме того, использование этого авирулентного штамма для получения Ych обеспечивает безопасность всех биохимических манипуляций при выделении сидерофора.

Трансформация штамма *E. coli* H1884 препаратом рекомбинантной плазмиды позволила получить предполагаемый штамм-производитель Ych, а в результате трансформации векторной плазмидой pSC-A-amp/kan – контрольный штамм.

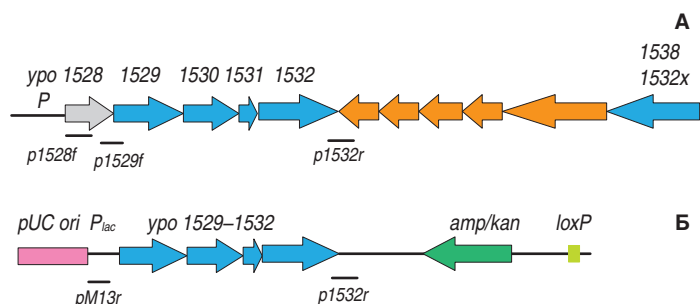


Рис. 1. Клонирование генов биосинтеза Ych в плазмидном векторе pSC-A-amp/kan: А – генетическая карта кластера генов, ответственных за биосинтез и транспорт Ych. Синим цветом обозначены гены, ответственные за биосинтез Ych, желтым цветом – за транспорт ферри-Ych в бактерии. Показаны праймеры (p1529f и p1532r), использованные для получения ПЦР-копии биосинтетических генов Ych; Б – генетическая карта рекомбинантной плазмиды pSC-A-5EV. Синим цветом обозначен рекомбинантный фрагмент, полученный с помощью ПЦР из штамма *Y. pestis* EV76.

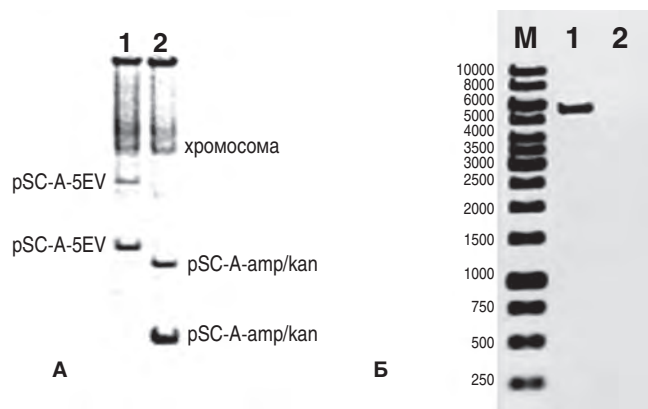


Рис. 2. Генетический анализ штамма *E. coli* Strata, содержащего векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (2) и рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1): А – электрофореграмма тотальной клеточной ДНК штаммов в 0,8% агарозном геле; Б – ПЦР-анализ штаммов с помощью праймеров pM13r и p1532r. М – ДНК-маркеры (п.н.).

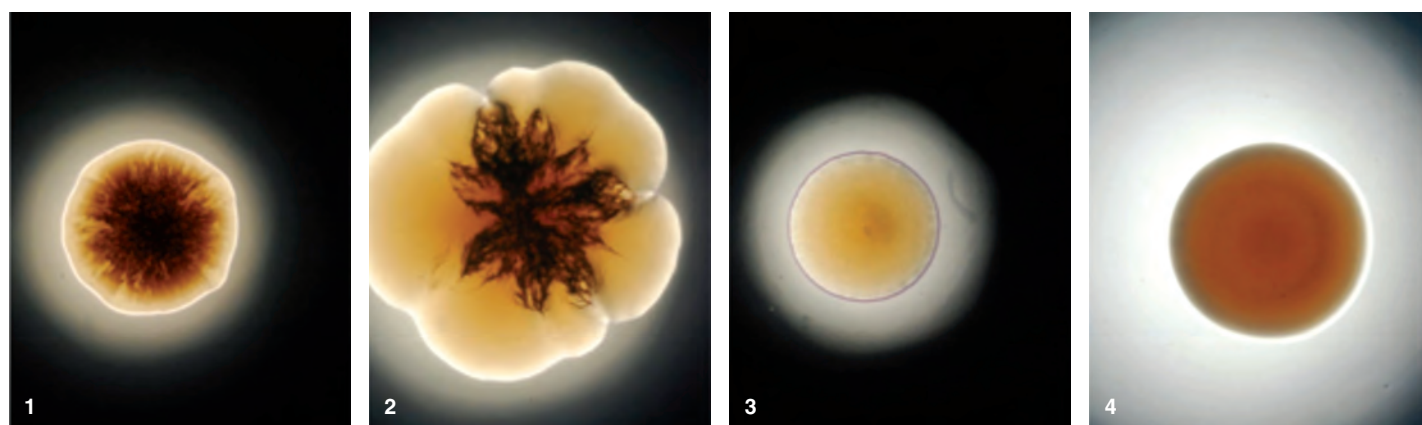


Рис. 3. Морфология колоний штамма *E. coli* H1884, содержащего рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1, 2) и векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (3, 4), при температуре 26°C (1,3) и 37°C (2, 4) и времени выращивания 48 ч.

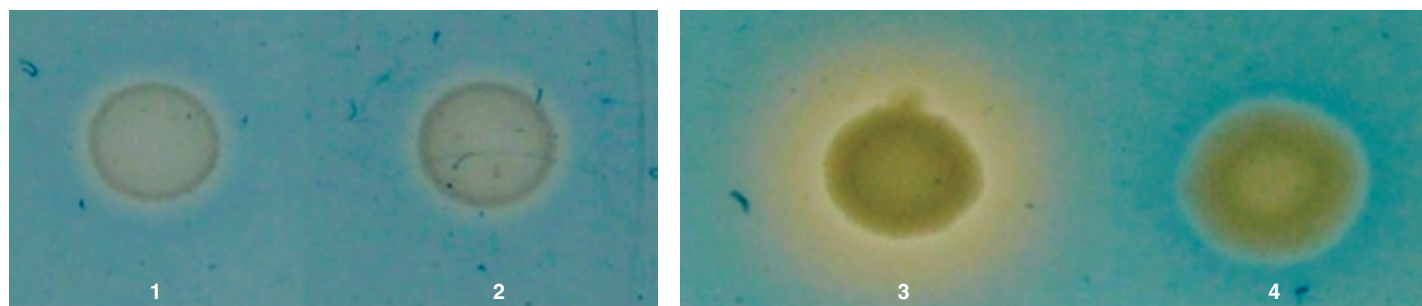


Рис. 4. Сидерофорная активность контрольного (2, 4) и рекомбинантного (1, 3) штаммов, выращенных в течение 48 ч на CAS-агаре при температуре 37°C (1, 2) и 26°C (3, 4).

Анализ штаммов, выращенных при разных температурах (26°C и 37°C) на среде LB, выявил значительные различия между ними по морфологии колоний. Так, в отличие от контрольного штамма, рекомбинантный образовывал колонии, внутри которых наблюдался коричневый преципитат, наиболее выраженный при 37°C (рис. 3). Можно предположить, что эта особенность является следствием накопления внутри клеток сидерофора, связанного с железом. Для подтверждения этого предположения требуются дальнейшие исследования.

Для доказательства продукции Ych рекомбинантным штаммом проводили его сравнение с контрольным штаммом на универсальной индикаторной среде (CAS-агар) для выявления сидерофоров (рис. 4). Как выяснилось, оба штамма не проявляли сидерофорной активности при выращивании на этой среде при 37°C. При этом сидерофорная активность регистрировалась в лизатах бактерий рекомбинантного штамма (данные не показаны). Хотя для *E. coli* температурный оптимум роста и осуществления всех жизненно важных функций – 37°C, при этой температуре сидерофор не выделялся в среду, а оставался внутри клеток. В то же время при выращивании рекомбинантного штамма на CAS-агаре при 26°C сидерофор секретировался в среду.

В отличие от контрольного штамма, не обладающего сидерофорной активностью, рекомбинантный штамм на CAS-агаре образовывал большую зону просветления вокруг посева за счет выделения Ych в среду (рис. 4). Эти результа-

ты свидетельствовали о том, что выделение сидерофора в среду происходит только при 26°C. Очевидно, при этой температуре рекомбинантный штамм включает какие-то неспецифические системы экспорта низкомолекулярных веществ.

Сравнительный анализ контрольного и рекомбинантного штаммов *E. coli* H1884

Выращивание контрольного и рекомбинантного штаммов в жидкой минимальной питательной среде M9 при 26°C и 37°C показало, что они не росли на этой среде в течение всего периода наблюдения (7 сут). Аналогичные результаты были получены и при выращивании штаммов на пластинах агара со средой M9. По-видимому, это было связано с тем, что оба штамма не синтезируют катехолатный сидерофор энтеробактин, необходимый для ассимиляции железа в железodefицитных условиях. При этом экспрессия рекомбинантным штаммом Ych не способствовала росту штамма, поскольку у него отсутствует рецептор Ych , необходимый для связывания и транспорта комплекса Ych с железом внутрь клеток. Полученные результаты согласуются с данными С. Adler et al. [9], которые отмечали отсутствие роста на минимальной среде M9 у мутанта *E. coli*, не продуцирующего сидерофор энтеробактин.

Стимуляции роста обоих штаммов при 26°C и 37°C способствовало добавление в жидкую или плотную среду M9 солей трехвалентного железа в концентрации 100 мкМ.

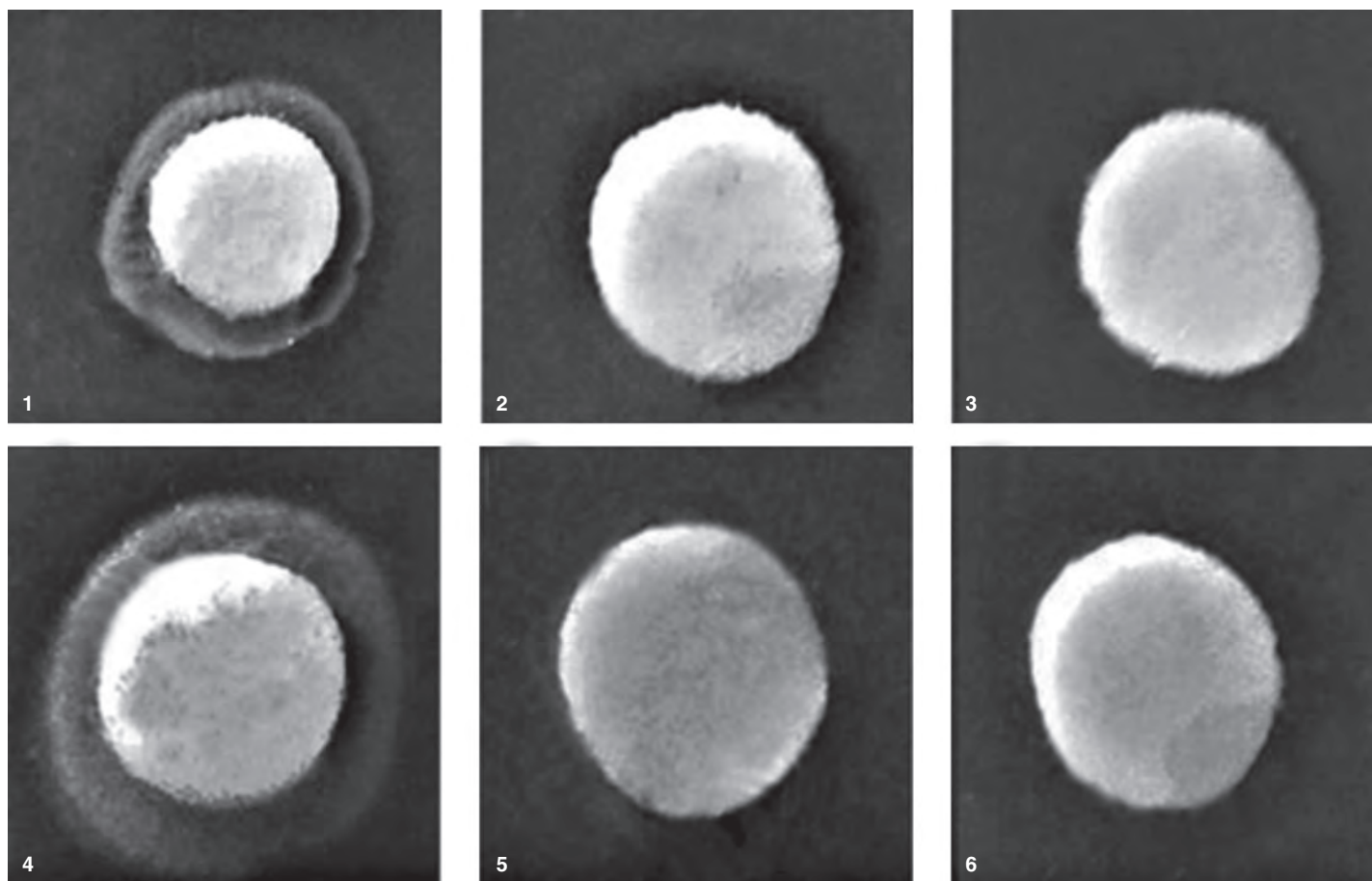


Рис. 5. Рост контрольного (1, 2, 3) и рекомбинантного (4, 5, 6) штаммов на агаре M9 после добавления к посевам дисков, пропитанных раствором хлорида трехвалентного железа различной концентрации: 0,1 mM (1, 4), 1 mM (2, 5), 10 mM (3, 6).

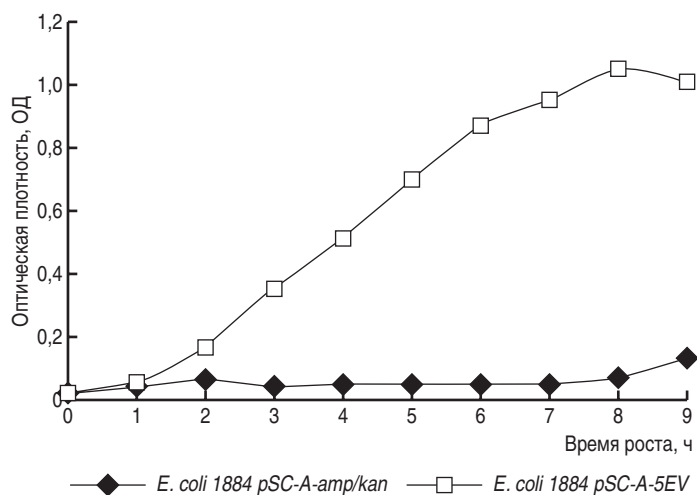


Рис. 6. Кривые роста контрольного и рекомбинантного штаммов при 37°C в жидкой питательной среде LB с аэрацией (шуттелирование при 150 rpm).

По-видимому, в такой концентрации железо может способствовать росту сидерофорнегативных мутантов за счет включения низкоаффинных систем транспорта. На рисунке 5 приведены результаты эксперимента, в котором на посевах двух штаммов на агаре M9 накладывали диски, пропитанные раствором хлорида трехвалентного железа различной концентрации. И в этом случае раствор концентрацией 100 мкМ стимулировал рост обоих штаммов. Однако увеличение концентрации трехвалентного железа до 1–10 мМ снимало стимулирующий эффект в отношении обоих штаммов, очевидно из-за токсичности высоких концентраций Fe^{3+} , которые, как известно, способствуют образованию реактивных соединений кислорода в реакции Хабер-Вайса [31]. Вышеописанные эксперименты не выявили различий между контрольным и рекомбинантным штаммом и продемонстрировали зависимость их роста от наличия в среде железа.

Значительные различия между штаммами были выявлены при их выращивании в средах с достаточным содержанием железа (LB, M9+ Fe^{3+}) в условиях аэрации. Оказалось, что при аэрации контрольный штамм отставал от рекомбинантного по скорости роста, главным образом на начальных этапах. Особенно наглядно эти различия проявлялись при выращивании штаммов при 37°C с аэрацией (рис. 6) и не наблюдались при выращивании бактерий в микроаэрофильных условиях (без аэрации).

Эти данные позволяли предположить, что экспрессия Ych рекомбинантным штаммом защищает бактерии от реактивных соединений кислорода. Чтобы в этом убедиться, проанализировали чувствительность двух штаммов к перекиси водорода. Для этого суспензии двух штаммов, предварительно выращенных в жидкой среде LB при 37°C, высевали на пластины агара, в центр которых помещали бумажный диск, пропитанный 3% раствором перекиси водорода. Через 24 ч выращивания при 37°C на агаре вокруг дисков отмечалась зона отсутствия роста бактерий, диаметр которой был существенно меньше у рекомбинантного, чем у контрольного штамма (рис. 7). Интересно, что эти различия были не столь выражены у бактерий, предварительно выращенных при 26°C, то есть в условиях, способствующих выделению Ych в среду. Вышеописанные различия между штаммами указывали на возможную роль Ych в качестве антиоксиданта, способствующего снижению чувствительности бактерий к бактерицидному действию перекиси водорода.

Об антиоксидантной активности Ych можно было судить и по результатам действия двухвалентного железа на посевах двух штаммов на агар M9. Так, использование в экспериментах для стимуляции роста контрольного и рекомбинантного штаммов соли двухвалентного железа выявило значительные различия между штаммами (рис. 8). Оказалось, что Fe^{2+} стимулирует рост только рекомбинантного штамма в концентрации до 1 мМ, но не способствует росту контрольного штамма. Как известно, двухвалентное железо обладает более высокой, чем трехвалентное железо, прооксидантной

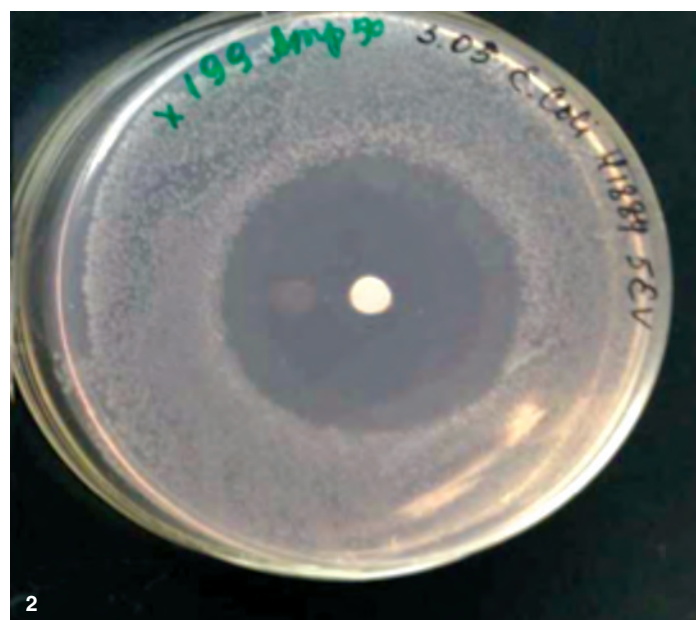
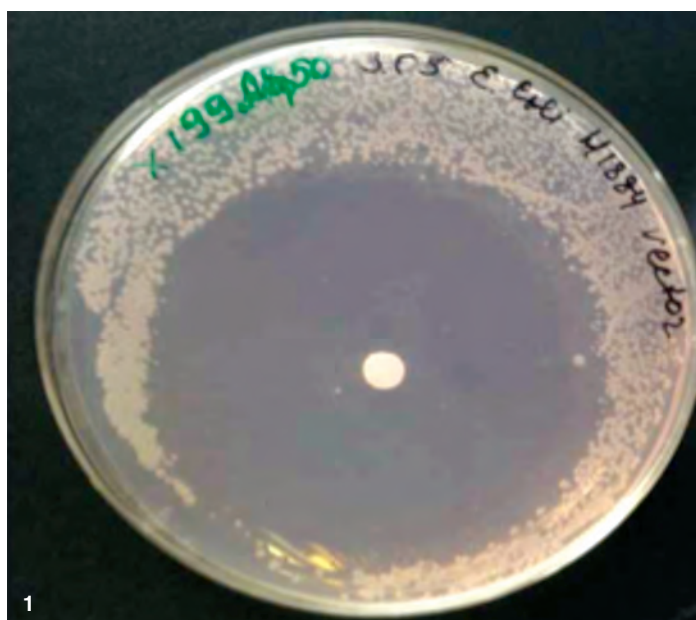


Рис. 7. Влияние перекиси водорода на рост штамма *E. coli* H1884, содержащего векторную (1) и рекомбинантную (2) плазмиды.

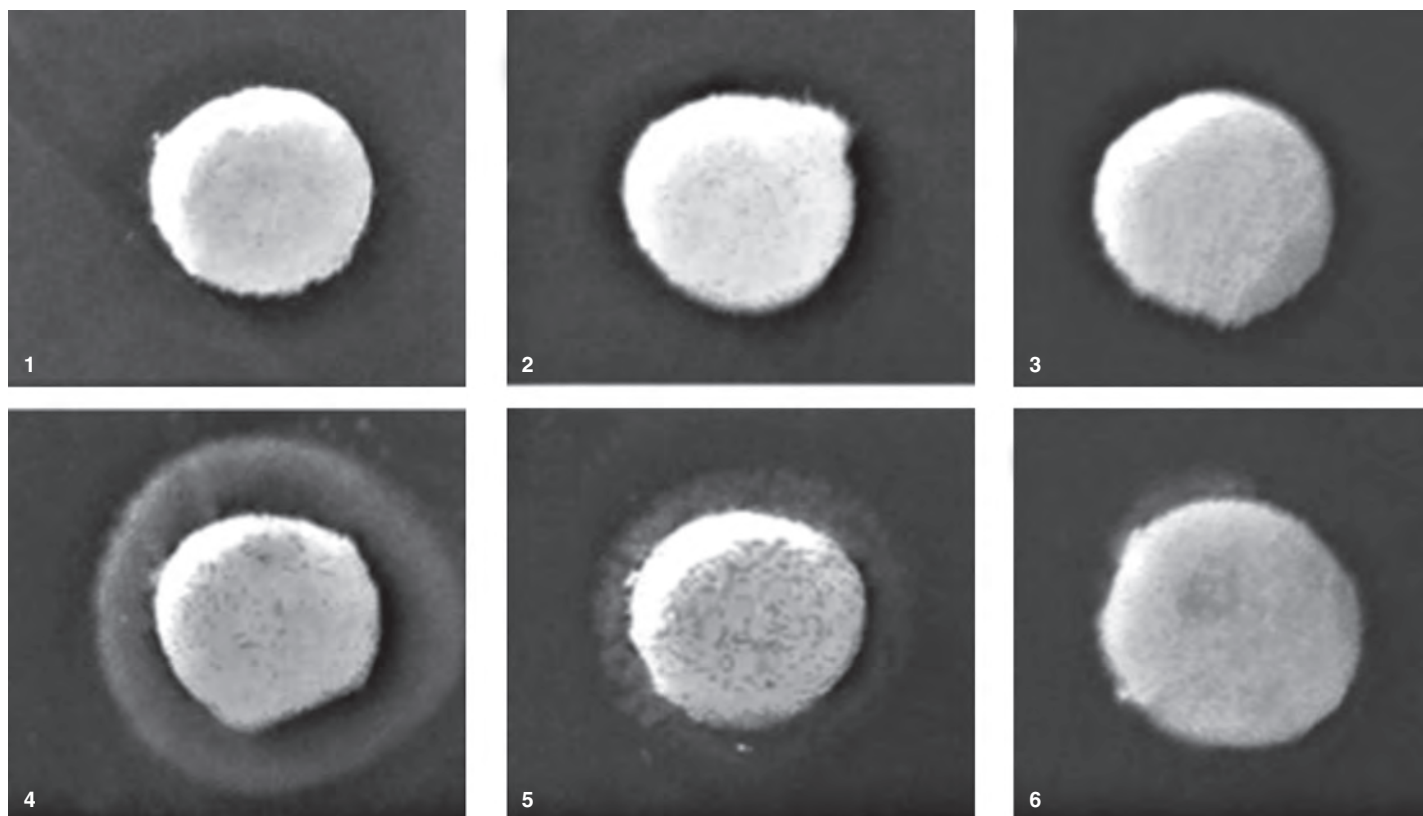


Рис. 8. Рост при 37°C контрольного (1, 2, 3) и рекомбинантного (4, 5, 6) штаммов на агаре М9 после добавления к посевам дисков, пропитанных раствором сульфата двухвалентного железа различной концентрации: 0,1 мМ (1, 4), 1 мМ (2, 5), 10 мМ (3, 6).

активностью, поскольку в присутствии кислорода образует наиболее активные гидроксил-радикалы в реакции Фентона [31]. Поэтому ионы Fe^{2+} токсичны для бактерий, не обладающих мощными антиоксидантными механизмами. По-видимому, снижение токсичности двухвалентного железа в присутствии Ych дает возможность рекомбинантному штамму поглощать железо с помощью имеющихся у кишечной палочки сидерофор-независимых систем ассимиляции двухвалентного железа.

Полученные данные указывали на то, что имеющийся в рекомбинантном штамме Ych не способствует поглощению железа в железodefицитной среде М9 из-за отсутствия рецептора сидерофора. При этом Ych обладает антиоксидантной активностью, стимулируя рост бактерий в присутствии прооксидантов (азрация, перекись водорода, соли двухвалентного железа). Антиоксидантная активность обнаружена у целого ряда бактериальных и дрожжевых сидерофоров. Особенно выражена она у энтеробактерий, синтезирующих катехолатные сидерофоры типа энтеробактина [9, 32]. Но гидроксаматные сидерофоры также обладают подобными свойствами [33] за счет наличия в них остатков гидроксамовых кислот [34]. Интересно, что антиоксидантная активность у двух типов сидерофоров проявлялась только при их внутриклеточной локализации. Результаты наших экспериментов также свидетельствуют о том, что Ych, когда он находится главным образом внутри клеток (при 37°C), проявляет более выраженную антиоксидантную активность, чем тогда, когда его значительная часть выделяется в среду (при 26°C).

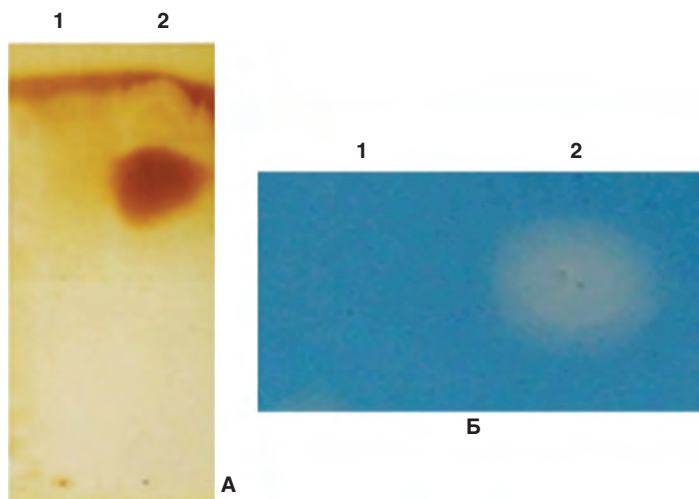


Рис. 9. Анализ препаратов Ych, полученных из контрольного (1) и рекомбинантного (2) штамма: А – ТСХ-анализ препаратов на пластинах силикагеля с приштавленной фазой С3. Мобильная фаза – 60% этанол, детекция в парах йода; Б – сидерофорная активность препаратов на CAS-агаре.

Оценка возможности использования рекомбинантного штамма для выделения иерсиниахелина

Выращивание контрольного и рекомбинантного штамма в различных условиях позволило определить, что Ych выделяется штаммом-продуктом в культуральную среду при 26°C в жидкой среде М9, содержащей 100 мкМ трехвалентного железа. В этих условиях два штамма выращивали в течение 3 сут, и из культуральных сред получали препараты по методике, описанной в Материалах и методах.

Анализ полученных таким образом препаратов с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах силикагеля (рис. 9А) показал, что, в отличие от препарата, полученного из контрольного штамма, препарат из рекомбинантного штамма содержал компонент с Rf 0,7, окрашивающийся йодом.

Сидерофорную активность полученных препаратов тестировали на CAS-агаре, на который наносили анализируемые растворы. Результат учитывали после 5 ч инкубации при 26°C. О наличии сидерофорной активности у препаратов судили по появлению желтого пятна на месте нанесения препарата на зеленую индикаторную среду (рис. 9Б). Сравнение препаратов, полученных из контрольного и рекомбинантного штаммов, выявило, что препарат из рекомбинантного штамма, в отличие от препарата из контрольного штамма, обладал сидерофорной активностью на CAS-агаре.

Таким образом, результаты исследований показали, что рекомбинантный штамм синтезирует и при 26°C выделяет в среду значительные количества Ych и может быть использован в качестве штамма-продуцента этого сидерофора. Апробированная методика может быть применена в дальнейших экспериментах для получения препаративных количеств Ych для изучения структуры, функции и роли этого сидерофора в физиологии и патогенности возбудителя чумы.

Финансирование

Работа выполнена за счет базового финансирования ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Благодарность

Авторы выражают признательность доктору А.Ракину (Институт гигиены и медицинской микробиологии Макса фон Петтенкофера, Мюнхен, Германия) за штамм *E. coli* H1884.

Литература/References

- Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*. 2013 May 15;13(5):509-519. DOI: 10.1016/j.chom.2013.04.010
- Parrow NL, Fleming RE, Minnick MF. Sequestration and scavenging of iron in infection. *Infect Immun*. 2013 Oct;81(10):3503-14. DOI: 10.1128/IAI.00602-13
- Becker KW, Skaar EP. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol Rev*. 2014 Nov;38(6):1235-49. DOI: 10.1111/1574-6976.12087
- Skaar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog*. 2010 Aug 12;6(8):e1000949. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000949
- Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep*. 2010 May;27(5):637-57. DOI: 10.1039/b906679a.
- Sah S, Singh R. Siderophore: structural and functional characterization. A comprehensive review agriculture (Polnohospodárstvo). 2015;61(3):97-114.
- Holden V, Bachman MA. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*. 2015 Jun;7(6):986-95. DOI: 10.1039/c4mt00333k
- Schalk J, Hannauer M, Braud A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol*. 2011 Nov;13(11):2844-54. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x
- Adler C, Corbalan NS, Peralta DR, Pomares MF, de Cristóbal RE, Vincent PA. The alternative role of enterobactin as an oxidative stress protector allows *Escherichia coli* colony development. *PLoS One*. 2014 Jan 2;9(1):e84734. DOI: 10.1371/journal.pone.0084734.
- Llamas MA, Sparrius M, Kloet R, Jiménez CR, Vandenbroucke-Grauls C, Bitter W. The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2006 Mar;188(5):1882-91. DOI: 10.1128/JB.188.5.1882-1891.2006
- Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):7072-7. DOI: 10.1073/pnas.092016999
- Fgaier H, Eberl HJ. A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens via iron chelation. *J J Theor Biol*. 2010 Apr 21;263(4):566-78. DOI: 10.1016/j.jtbi.2009.12.003.
- Hissen AHT, Chow JMT, Pinto LJ, Moore MM. Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infect Immun*. 2004 Mar;72(3):1402-8.
- Britigan BE, Rasmussen GT, Olakanmi O, Cox CD. Iron acquisition from *Pseudomonas aeruginosa* siderophores by human phagocytes: an additional mechanism of host defense through iron sequestration. *Infect Immun*. 2000 Mar;68(3):1271-5.
- Varesio L, Battaglia F, Raggi F, Ledda B, Bosco MC. Macrophage-inflammatory protein-3a/CCL-20 is transcriptionally induced by the iron chelator desferrioxamine in human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-κB. *Mol Immunol*. 2010 Jan;47(4):685-93. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.10.031
- Rada B, Jendrysik MA, Pang L, Hayes CP, Yoo DG, Park JJ, et al. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PLoS One*. 2013;8(1):e54205. DOI: 10.1371/journal.pone.0054205.
- Kirienko NV, Ausubel FM, Ruvkun G. Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 10;112(6):1821-6. DOI: 10.1073/pnas.1424954112
- Palmer LD, Skaar EP. Transition metals and virulence in bacteria. *Annu Rev Genet*. 2016 Nov 23;50:67-91. DOI: 10.1146/annurev-genet-120215-035146
- Brickman TJ, Armstrong SK. Temporal signaling and differential expression of *Bordetella* iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators. *Biometals*. 2009 Feb;22(1):33-41. DOI: 10.1007/s10534-008-9189-9
- Sandy M, Butler A. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chem Rev*. 2009 Oct;109(10):4580-95. DOI: 10.1021/cr9002787
- Sia AK, Allred BE, Raymond KN. Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. *Curr Opin Chem Biol*. 2013 Apr;17(2):150-7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.014
- Perry RD, Fetherston JD. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect*. 2011 Sep;13(10):808-17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008
- Paauw A, Leverstein-van Hall MA, van Kessel KP, Verhoef J, Fluit AC.. Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. *PLoS One*. 2009 Dec 29;4(12):e8240. DOI: 10.1371/journal.pone.0008240.
- Bobrov AG, Kirillina O, Fetherston JD, Miller MC, Burlison JA, Perry RD. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicemic plague in mice. *Mol Microbiol*. 2014 Aug;93(4):759-75. DOI: 10.1111/mmi.12693.
- Chaturvedi KS, Hung CS, Giblin DE, Urushidani S, Austin AM, Dinauer MC, Henderson JP. Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. *ACS Chem Biol*. 2014 Feb 21;9(2):551-61. DOI: 10.1021/cb400658k
- Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*. 1987 Jan;160(1):47-56.
- Forman S, Paultey JT, Fetherston JD, Cheng YQ, Perry RD. *Yersinia* ironomics: comparison of iron transporters among *Yersinia pestis* biotypes and its nearest neighbor, *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biometals*. 2010 Apr;23(2):275-94. DOI: 10.1007/s10534-009-9286-4.

28. Rakin A, Schneider L, Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Nov 30;2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151
29. Podladchikova O, Rykova V, Antonenka U, Rakin A. *Yersinia pestis* autoagglutination is mediated by Hcp-like protein and siderophore yersiniachelin (Ych). *Adv Exp Med Biol.* 2012;954:289-92. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_36
30. Payne SM. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.* 1994;235:329-44.
31. Pierre J.L., Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biometals.* 1999 Sep;12(3):195-9.
32. Peralta DR, Adler C, Corbalán NS, PazGarcía EC, Pomares MF, Vincent PA Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS One.* 2016 Jun 16;11(6):e0157799. DOI: 10.1371/journal.pone.0157799
33. Eisendle M, Schrettl M, Kragl C, Müller D, Illmer P, Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 2006 Oct;5(10):1596-603. DOI: 10.1128/EC.00057-06
34. Končić MZ, Barbarić M, Perković I, Zorc B. Antiradical, chelating and antioxidant activities of hydroxamic acids and hydroxyureas. *Molecules.* 2011 Jul 25;16(8):6232-42. DOI: 10.3390/molecules16086232.

Информация о соавторе:

Подладчикова Ольга Николаевна, старший научный сотрудник, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2703
E-mail: olgapod54@mail.ru

Information about co-author:

Olga N. Podladchikova, senior researcher, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute
Address: 117/40 M. Gorkogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-2703
E-mail: olgapod54@mail.ru

МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ПЕЧАТЬ

Бактериальная терапия экземы?

Согласно первоначальным данным, полученным в ходе предварительных клинических испытаний на национальном уровне Институтом здоровья, местное лечение живой культурой *Roseomonas mucosa* – бактерией, естественно присутствующей на коже, было безопасно для взрослых и детей с атопическим дерматитом (экземой) и ослабляло тяжесть заболевания. Доклиническая работа на мышинной модели атопического дерматита показала, что штаммы *R. mucosa*, собранные с поверхности здоровой кожи, могут облегчить симптомы заболевания.

Myles IA, Earland NJ, Anderson ED, Moore IN, Kieh MD, Williams KW, et al.
First-in-human topical microbiome transplantation with Roseomonas mucosa for atopic dermatitis.
JCI Insight. 2018;3(9). pii: 120608. doi: 10.1172/jci.insight.120608

Личинки мясных мух помогли найти новое средство против инфекций

Российские ученые нашли способ улучшить действие антибиотиков на биопленки, образованные бактериями, которые становятся причиной до 80% всех инфекционных заболеваний. Это удалось с помощью белкового соединения, полученного из личинок мух. Разработка поможет более эффективно бороться с микробными инфекциями. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ).

Chernysh S, Gordya N, Tulin D, Yakovlev A.
Biofilm infections between Scylla and Charybdis: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics. *Infect Drug Resist.* 2018 Apr 9;11:501-514. doi: 10.2147/IDR.S157847

Медики предложили способ остановить устойчивый к антибиотикам туберкулез

Российские ученые в сотрудничестве с американскими коллегами создали алгоритм для наиболее быстрого и эффективного выявления случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

Использование стратегии FAST в 2 российских больницах привело к значительному уменьшению количества случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью через 12 месяцев после ее внедрения.

Miller AC, Livchits V, Ahmad Khan F, Atwood S, Kornienko S, Kononenko Y, et al.
Turning off the tap: Using the FAST approach to stop the spread of drug-resistant tuberculosis in the Russian Federation.
J Infect Dis. 2018 Apr 5. doi: 10.1093/infdis/jiy190.