

Влияние состава питательной среды на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ

М.А.Сотникова, К.В.Хлопова, Г.М.Вахрамеева, Т.Б.Кравченко, А.Н.Мокриевич, В.М.Павлов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Возбудитель туляремии *Francisella tularensis* – внутриклеточный паразит, одним из факторов патогенности которого является система транспорта VI типа, содержащая в составе пилей белок IglC. Для инактивации активных форм кислорода, вырабатываемых инфицированными *F. tularensis* клетками макроорганизма, бактерия синтезирует ферменты супероксиддисмутазы SodB и SodC. В работе количественным методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) проведена оценка транскрипционной активности генов *sodB*, *sodC* и *iglC* в зависимости от фазы роста вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и состава питательных сред. Показано, что уровень мРНК гена *iglC* в бактериях, культивируемых в среде ВНИ, существенно превышал уровень мРНК гена *iglC* по сравнению со средой ЖПС. Уровень мРНК гена *sodB* в среде ЖПС не менялся вне зависимости от фазы роста, тогда как уровень мРНК гена *sodB* в среде ВНИ снизился в 5 раз при достижении стационарной фазы. Количество мРНК гена *sodC* на ранней и поздней фазах роста в ВНИ было практически идентичным, тогда как в среде ЖПС количество мРНК гена *sodC* на поздней фазе роста было 2,8 раза больше по сравнению с ранней фазой. Показано, что скорость роста бактерий в питательной среде ЖПС была достоверно выше по сравнению со средой ВНИ. Культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенная в среде ВНИ, обладала повышенной способностью к диссеминации в организме инфицированных мышей линии BALB/c на ранних стадиях инфекционного процесса. Предложено использовать, наряду с традиционными методами оценки эффективности питательных сред для культивирования вакцинных туляремийных штаммов, современный постгеномный подход, заключающийся в определении методом ПЦР-РВ транскрипционной активности генов белков IglC, SodB и SodC, играющих важную роль в инициации вакцинального процесса.

Ключевые слова: *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, мРНК, *sodB*, *sodC*, *iglC*, питательная среда, мыши BALB/c

Для цитирования: Сотникова М.А., Хлопова К.В., Вахрамеева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Павлов В.М. Влияние состава питательной среды на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Бактериология. 2023; 8(4): 36–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-36-41

Influence of the composition of the nutrient medium on the molecular biological properties of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG

M.A.Sotnikova, K.V.Khlopova, G.M.Vakhrameeva, T.B.Kravchenko, A.N.Mokrievich, V.M.Pavlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The causative agent of tularemia, *Francisella tularensis*, is an intracellular parasite, the main factors of pathogenicity of which are the type VI transport system, which contains the IglC protein in the pili. To inactivate reactive oxygen species produced by host cells infected with *F. tularensis*, the bacterium synthesizes the superoxide dismutase enzymes SodB and SodC. In this work, the transcriptional activity of the *sodB*, *sodC* and *iglC* genes was assessed using a quantitative real-time PCR method depending on the growth phase of the vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG and the composition of the nutrient media. It was shown that the level of *iglC* gene mRNA in bacteria cultivated in the BHI medium was significantly higher than the level of *iglC* gene mRNA compared to the ZhPS medium. The *sodB* gene mRNA level in the ZhPS medium did not change regardless of the growth phase, while the *sodB* gene mRNA level in the BHI medium decreased 5-fold upon reaching the stationary phase. The amount of *sodC* gene mRNA in the early and late growth phases in BHI was almost identical, whereas in the ZhPS medium

Для корреспонденции:

Сотникова Мария Александровна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0117

Статья поступила 02.11.2023, принята к печати 25.12.2023

For correspondence:

Maria A. Sotnikova, junior researcher, Laboratory of microbiology of tularemia, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117

The article was received 02.11.2023, accepted for publication 25.12.2023

the amount of *sodC* gene mRNA in the late growth phase was 2.8 times higher compared to the early phase. It was shown that the growth rate of bacteria in the ZhPS nutrient medium was significantly higher compared to the BHI medium. The *F. tularensis* 15 NIIEG culture grown in BHI medium had an increased ability to disseminate in the body of infected BALB/c mice at the early stages of the infectious process. It is proposed to use, along with traditional methods for assessing the effectiveness of nutrient media for the cultivation of vaccine tularemia strains, a modern post-genomic approach, which consists in determining by real-time PCR the transcriptional activity of the genes for the proteins IglC, SodB and SodC, which play an important role in the initiation of the vaccine process.

Key words: *Francisella tularensis* 15 NIIEG, mRNA, *sodB*, *sodC*, *iglC*, nutrient medium, BALB/c mice

For citation: Sotnikova M.A., Khlopova K.V., Vakhrameeva G.M., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Pavlov V.M. Influence of the composition of the nutrient medium on the molecular biological properties of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIIEG. *Bacteriology*. 2023; 8(4): 36–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-36-41

Ф акультативный внутриклеточный паразит *Francisella tularensis* является возбудителем туляремии у людей и животных. Для профилактики туляремии у людей в России используют лиофильно высушенную живую вакцину, приготовленную на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Данный штамм отличается от вирулентных природных изолятов *F. tularensis* spp. *holarctica* практически полной авирулентностью для морских свинок и сниженной вирулентностью для белых мышей из-за наличия делеций в хромосоме в районе генов *pilA* и *pilE* и гена липопротеина, соответствующего гену *FTT_0918* подвида *tularensis* [1, 2].

Бактерии *F. tularensis* для защиты от радикалов O²·, вырабатываемых как самими бактериями, так и фагоцитами макроорганизма, синтезируют два вида ферментов: железо-зависимую (FeSOD) и медь/цинк-зависимую (CuZnSOD) супероксид-дисмутазы [3]. Наличие функционально активного гена *sodB*, кодирующего фермент FeSOD в геноме *F. tularensis*, жизненно необходимо для размножения туляремийного микроба *in vitro* и *in vivo* [3], тогда как ген *sodC*, кодирующий фермент CuZnSOD, влияет только на их выживаемость *in vivo* [4].

Существенную роль в патогенности *F. tularensis* играет транспортная система VI типа [5]. Одним из ключевых элементов данной системы является белок IglC, кодируемый геном *iglC*, локализованным на хромосоме в области так называемого «острова патогенности». Вирулентные для человека штаммы туляремийного микроба, в отличие от других видов *F. tularensis*, содержат в хромосоме две копии «острова патогенности» [6]. Делеция обеих копий гена *iglC* в геномах природных изолятов *F. tularensis* приводит к формированию авирулентных для мелких грызунов штаммов бактерий [7, 8].

Показано, что состав питательной среды и условия культивирования влияют на спектр белков, синтезируемых бактериями *F. tularensis* [9]. Так, антигенный спектр бактерий *F. tularensis* LVS, культивированных в жидкой питательной среде BHI, содержащей сердечно-мозговую экстракт, подобен антигенному спектру бактерий, выделенных из инфицированных мышинных макрофагов, но существенно отличается по антигенному спектру бактерий, культивированных в жидкой питательной среде Мюллера–Хинтон [10].

Цель работы заключалась в определении транскрипционной активности генов *sodB*, *sodC* и *iglC* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на разных фазах роста *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидких питательных средах BHI и ЖПС, а также в сравнении ростовых и морфологических параметров изучаемых культур и начальных этапов их диссеминации в организме экспериментальных мышей линии BALB/c.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ («ГКПМ-Оболensk», ФБУН ГНЦ ПМБ). Бактерии культивировали на FT-агаре (ФГУН ГНЦ ПМБ) при 37°C в термостате (Heratherm, Thermo Scientific, США) и в жидких питательных средах: ЖПС на основе гидролизата казеина с добавлением дрожжевого экстракта, цистеина и двухвалентного железа [11] и BHI на основе пептона с добавлением сердечно-мозгового экстракта (HIMEDIA, Индия) в термостатируемой качалке GFL 3032 (Германия) при 37°C и скорости ротации 160 об./мин.

В колбы объемом 100 мл с 10 мл питательной среды вносили бактериальную суспензию ночной агаровой культуры до конечной концентрации 2•10⁸ КОЕ/мл. Оптическую плотность бактериальных культур определяли на фотоколориметре «Экотест 2020» (Россия) при длине волны 595 нм. Изучение морфологии бактериальных клеток, окрашенных фуксином по стандартной методике, проводили с использованием микроскопа с цифровой фотокамерой OLYMPUS VX43 (Япония).

Для оценки уровней синтеза матричных РНК (мРНК) в клетках туляремийного микроба были сконструированы праймеры на основе нуклеотидных последовательностей исследуемых генов (Gen Bank NCBI, CP066295.1) с помощью программного обеспечения Vector NTI (табл. 1).

Праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Для выделения РНК из бактерий *F. tularensis* образцы культур объемом 2 мл отбирали через 4 и 24 ч культивирования. После осаждения бактерий центрифугированием в

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-РВ для детекции уровня транскрипции генов *iglC*, *sodB*, *sodC* и 16S РНК
Table 1. Primers for real-time PCR to detect the level of transcription of the *iglC*, *sodB*, *sodC* and 16S RNA genes

Название праймера / Primer name	Последовательность / Subsequence	Ген-мишень / Target gene
iglCF	5'acaggaatacaagtgccgagacc	<i>iglC</i>
iglCR	5'aaacaccataagtctgttgctc	<i>iglC</i>
SbcF	5'ctacctacgctgtgatgcat	<i>sodB</i>
SbcR	5'gctcagaacaattgccagttt	<i>sodB</i>
SCcF	5'tgagtatgcttctactgtattag	<i>sodC</i>
SCcR	5'tagtctctataactccacacc	<i>sodC</i>
F16S	5'cgtaattcctttgagtttagc	16S PHK
R16S	5'gtgccagcagccgcggtaa	16S PHK

течение 5 мин (центрифуга MiniSpin Eppendorf, Германия, 12 000 об./мин) осадки суспендировали в 80 мкл забуференного физиологического раствора (ЗФР) и выделяли РНК с использованием набора реагентов «РНК-экстран» («Синтол») по инструкции фирмы-производителя. Для удаления примесной ДНК в препаратах РНК полученные образцы обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКаз (Fermentas, Латвия), согласно протоколу производителя. Оценку количества и качества выделенной РНК проводили на сканирующем спектрофотометре NanoDrop UV/visible (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США).

Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали на матрицах РНК с помощью набора реактивов «Реверта-L» («Амплиценс», Россия) по протоколу фирмы-производителя.

ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) по программе: 94°C – 5 мин (1 цикл), 94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с (35 циклов). В пробирки объемом 200 мкл вносили: 1 мкл кДНК и 24 мкл ПЦР-смеси (10 пкмоль каждого из пары праймеров, 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green, 2,5 мкл 25 мМ раствора MgCl₂, деионизованная вода до 24 мкл).

Для оценки уровня экспрессии применяли метод сравнения индикаторных пороговых циклов, нормированных по содержащейся в образцах 16S-рРНК.

Оценку начальной стадии диссеминации бактерий *F. tularensis* проводили на мышах линии BALB/c (виварий ГНЦ ПМБ) возрастом 6–8 нед., весом 18–20 г. Мышей (6 самцов в группе) заражали подкожно в дозе 100 м.к. в объеме 0,1 мл. На 2-е и 3-и сутки мышей подвергали эвтаназии, селезенки асептически отбирали и гомогенизировали в 1 мл ЗФР. Суспензии разбавляли в 10 раз стерильным ЗФР, высевали по 10 мкл из каждого разведения на чашки с FT-агаром и инкубировали в течение 72 ч. Работы с микроорганизмами выполнялись в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами [12].

Все стадии исследования с участием животных соответствовали законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также одобрены соответствующими комитетами «Использование современных средств содержания животных» (ФБУН ГНЦ ПМБ №7 от 11.09.2013); «Порядок работы с СПФ животными в современных исследованиях» (ФБУН ГНЦ ПМБ №7 от 11.09.2013).

Каждую пробу в экспериментах исследовали в трех повторях, эксперименты повторяли по меньшей мере дважды. Все статистические расчеты и определение уровней значимости (*p*) были проделаны с помощью программы GraphPad Prism 8 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Стандартные отклонения *p* < 0,05 считали статистически значимыми.

Результаты исследования и их обсуждение

Методом ПЦР-РВ нами был проведен сравнительный анализ уровней синтеза мРНК генов *sodB*, *sodC* и *iglC* в бактериях *F. tularensis* 15 НИИЭГ на логарифмической (4 ч) и стационарной (24 ч) фазах роста культуры в средах ВНИ и

Таблица 2. Транскрипционная активность генов *sodB*, *sodC* и *iglC* в бактериях *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидких питательных средах

Table 2. Transcriptional activity of the *sodB*, *sodC* and *iglC* genes in the bacteria *F. tularensis* 15 NIEG in liquid nutrient media

Относительные уровни мРНК генов / Relative mRNA levels of genes						
Гены / Genes	<i>iglC</i>		<i>sodB</i>		<i>sodC</i>	
Питательные среды / Culture media	ЖПС	ВНИ	ЖПС	ВНИ	ЖПС	ВНИ
4 ч роста / 4 hours growth	6,4	8,2	1,0	0,5	0,4	0,3
24 ч роста / 24 hours growth	11,4	42,8	1,1	0,1	1,1	0,4

ЖПС. Относительные уровни кДНК, полученные с мРНК исследуемых генов, нормировали делением количества соответствующей кДНК к количеству кДНК с матрицы 16S РНК. Все полученные значения были увеличены в 10⁴ раз. Результаты приведены в табл. 2.

Из полученных данных следует, что на 4 ч роста уровни синтеза мРНК гена *iglC* в бактериях в питательной среде ВНИ по сравнению со средой ЖПС достоверно не отличались друг от друга, однако при достижении стационарной фазы роста уровень синтеза мРНК гена *iglC* в среде ВНИ существенно возрос и превысил уровень синтеза в среде ЖПС в 3,8 раза.

Количество мРНК гена *sodB* в бактериях через 4 ч роста в среде ЖПС было выше, чем в среде ВНИ, причем данная тенденция сохранялась к 24 ч роста. Уровень мРНК гена *sodB* в среде ВНИ снизился в 5 раз при достижении стационарной фазы роста. Количество мРНК гена *sodC* в бактериях на ранней и поздней фазах роста в ВНИ было практически одинаковым, тогда как в среде ЖПС количество мРНК гена *sodC* на поздней фазе роста было несколько выше по сравнению с ранней фазой (табл. 2).

Анализ динамики роста культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в средах ВНИ и ЖПС показал, что вне зависимости от состава питательной среды штамм демонстрирует экспонен-

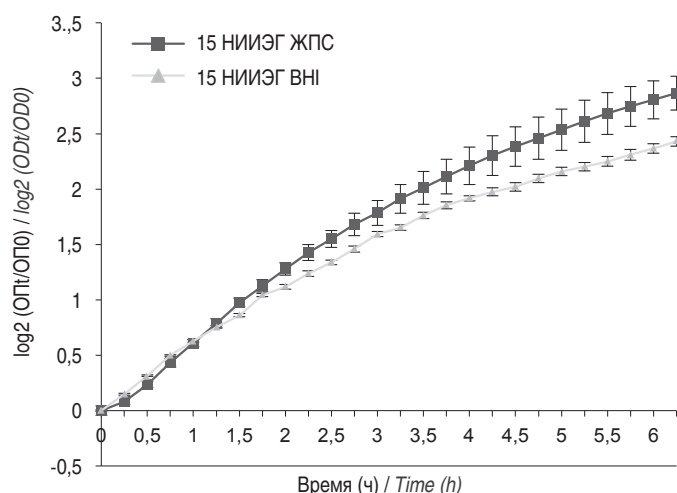


Рис. 1. Динамика роста штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в средах ЖПС и ВНИ: ОПО – оптическая плотность культуральной жидкости в начальный момент культивирования; ОDt – текущее значение оптической плотности.

Fig. 1. Dynamics of growth of the strain *F. tularensis* 15 NIEG in ZhPS and BHI culture media: OD₀ – the optical density of the culture at the initial moment of cultivation; OD_t – current value of optical density.

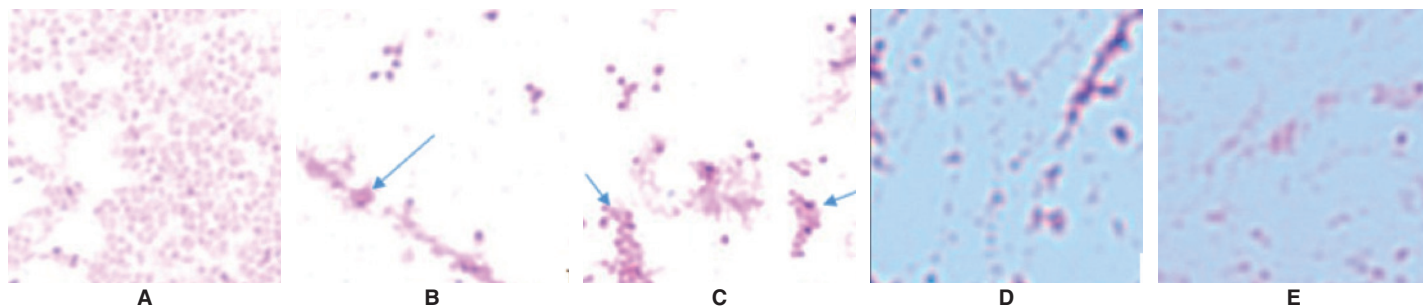


Рис 2. Влияние состава питательных сред и фазы роста культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ на структуру клеточных агрегатов: А – ночная агаровая культура; В – культура через 6 ч роста на среде ВНИ; С – культура через 6 ч роста на среде ЖПС; D – через 24 ч роста на среде ВНИ; Е – культура через 24 ч роста на среде ЖПС.

Fig. 2. The influence of the composition of nutrient media and the growth phase of the *F. tularensis* 15 NIIEG culture on the structure of cell aggregates: A – overnight agar culture; B – culture after 6 hours of growth on BHI medium; C – culture after 6 hours of growth on the medium; D – culture after 24 hours of growth on BHI medium; E – culture after 24 hours of growth on ZhPS medium.

циальный рост без выраженного лаг-периода. На начальной стадии скорости роста культур практически идентичны, но по мере увеличения времени культивирования скорость роста культуры в среде ЖПС достоверно опережала скорость роста культуры в среде ВНИ (рис. 1).

Состав питательной среды влияет не только на скорость роста культур, но и на морфологию бактериальных клеточных агрегатов, свойственных туляремийному микробу. Сравнение окрашенных фуксином мазков культур на 6 ч и 24 ч роста показало существенное отличие между образцами, полученными при культивировании на средах ВНИ и ЖПС. В мазке ночной агаровой культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ визуализируются клеточные агрегаты с минимальным количеством изолированных клеток (рис. 2 А). В мазках образцов бактериальной культуры из среды ЖПС к 6 ч наблюдалась начальная агрегация по сравнению с агаровой культурой, а к 24 ч начинали возникать, наряду с крупными аморфными агрегатами, и тяжелоподобные структуры (рис. 2 С, Е).

В отличие от среды ЖПС, по мере роста бактерий в среде ВНИ к 6 ч клеточные агрегаты ночной культуры распались на мелкие фрагменты с образованием протяженных вытянутых структур с последующим их укрупнением к 24 ч культивирования (рис. 2 В, D).

Состав жидкой питательной среды влиял не только на культурально-морфологические свойства культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ, но и на способность бактерий к диссеминации в организме экспериментальных мышей линии BALB/c. Количество бактерий, высеваемых из селезенки инфицированных мышей через 2 и 3 суток, приведено в табл. 3.

Полученные данные показали достоверную разницу в бактериальной нагрузке на селезенку мышей для культуры, выращенной в среде ВНИ, по сравнению со средой ЖПС на 3-и сутки после инфицирования.

Таблица 3. Обсемененность селезенки мышей линии BALB/c бактериями *F. tularensis* 15 НИИЭГ после заражения 24-часовыми культурами, выращенными в средах ВНИ и ЖПС

Table 3. Contamination of the spleens of BALB/c mice with *F. tularensis* 15 NIIEG bacteria after infection with 24-hour cultures grown in BHI and ZhPS media

Питательная среда / Nutrient medium	2-е сутки / 2nd day	3-и сутки / 3rd day
ЖПС	116,7 ± 228,7	56,7 ± 111,1
ВНИ	4213,3 ± 5906,6	28160,0 ± 7160,1

Результаты проведенных исследований демонстрируют, что компонентный состав жидкой питательной среды для культивирования *F. tularensis* оказывает существенное влияние на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Нами показано, что скорость размножения бактерий на поздней стадии роста вакцинного штамма 15 НИИЭГ в среде ВНИ с сердечно-мозговым экстрактом ниже, чем в среде ЖПС, содержащий дрожжевой экстракт.

Как известно, основным компонентом среды ВНИ является пептон (ферментативный гидролизат казеина), а среды ЖПС – кислотный гидролизат казеина, обогащенный аминокислотами и короткими пептидами, что благоприятно влияет на ростовые характеристики бактерий, поскольку *F. tularensis* является ауксотрофом по ряду аминокислот, включая гистидин, лизин, метионин, цистеин, аргинин и тирозин [13]. Фактором роста является также витаминно-минеральные компоненты дрожжевого экстракта [11].

Равные скорости роста культур на начальном этапе культивирования можно объяснить присутствием накопленных внутриклеточных метаболитов в посевном материале биомассы ночной агаровой культуры, выращенной на FT-агаре, более богатой среде по сравнению со средой ВНИ.

Состав питательных сред влиял и на морфологию клеточных агрегатов, формирующихся в процессе размножения бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В отличие от среды ЖПС, в среде ВНИ в процессе роста наблюдался более выраженный переход от диффузной структуры клеточных агрегатов, характерной для ночной агаровой культуры, к филаментозным образованиям.

Состав питательных сред влиял также на уровни активности генов *sodB*, *sodC* и *iglC*, важных как для метаболизма туляремийного микроба, так и для приживления и размножения бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* в организме хозяина. Поскольку культивирование бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в среде ВНИ приводило к существенному повышению уровня мРНК гена *iglC* по сравнению со средой ЖПС, причем эта разница усиливалась по мере роста культуры, то можно предположить, что усиление экспрессии гена *iglC* оказывает положительное влияние на факторы, задействованные в процессе диссеминации бактериальных клеток в организме мышей.

Как известно, активные кислородные радикалы O²• в эукариотических клетках выполняют двойную роль: в высоких

концентрациях они действуют как бактерицидные факторы, инактивирующие внутриклеточные патогены в результате повреждения молекул ДНК, РНК, липидов и белков, а при низких концентрациях служат вторичными сигнальными молекулами, регулируя экспрессию различных медиаторов воспаления [14, 15]. Ферменты супероксиддисмутазы *sodB* и *sodC* туляремиального микроба вовлечены как в процессы защиты бактерий от бактерицидного действия факторов «окислительного взрыва» макрофагов, так и в процесс подавления активации синтеза медиаторов воспаления в ответ на инфицирование бактериями эукариотических клеток. Более низкий уровень активности супероксиддисмутаз, согласно полученным данным по уровням мРНК генов *sodB* и *sodC*, в среде ВНИ по сравнению со средой ЖПС, вероятно, позволяет бактериям на начальных этапах проникновения в макрофаги за счет более низкой скорости инактивации радикалов O_2^- снизить уровень синтеза медиаторов воспаления, увеличивая время до начала «окислительного взрыва» в макрофагах, тем самым обеспечивая бактериальную экспансию и системную диссеминацию в паренхиматозных органах. Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными для мышей линии C57BL/6, инфицированных бактериями *F. tularensis* LVS, культивированными на среде ВНИ и среде Мюллера–Хинтон [8].

Полученные результаты, наряду с традиционными методами оценки эффективности питательных сред для культивирования вакцинных туляремиальных штаммов, позволяют предложить современный постгеномный подход, заключающийся в определении методом ПЦР-РВ транскрипционной активности генов белков IgIC, SodB и SodC, играющих важную роль в инициации вакцинального процесса.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. McLendon MK, Apicella MA, Allen LA. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:167-85. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126
2. Нарышкина ЕА, Краснов ЯМ, Альхова ЖВ, Баданин ДВ, Осин АВ, Ляшова ОЮ, и др. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020;2:91-97. DOI:10.21055/0370-1069-2020-2-91-97
3. Bakshi CS, Malik M, Regan K, Melendez JA, Metzger DW, Pavlov VM, et al. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J Bacteriol.* 2006 Sep;188(17):6443-8. DOI: 10.1128/JB.00266-06

4. Melillo AA, Mahawar M, Sellati TJ, Malik M, Metzger DW, Melendez JA, et al. Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J Bacteriol.* 2009 Oct;191(20):6447-56. DOI: 10.1128/JB.00534-09
5. Santic M, Molmeret M, Klose KE, Jones S, Kwaik YA. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol.* 2005 Jul;7(7):969-79. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00526.x
6. De Bruin OM, Duplantis BN, Ludu JS, Hare RF, Nix EB, Schmerk CL, et al. The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IgIA, IgIB, IgIC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology (Reading).* 2011 Dec;157(Pt 12):3483-3491. DOI: 10.1099/mic.0.052308-0
7. Мокриевич АН, Павлов ВМ, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Бахтеева ИВ, и др. Свойства бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica*, лишенных способности синтезировать белок IgIC. *Бактериология.* 2017;2(4):17-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24
8. Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund AL, Zingmark C, Golovliov I, Sjöstedt A, et al. Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* 2009 Aug;77(8):3424-31. DOI: 10.1128/IAI.00196-09
9. Zarrella TM, Singh A, Bitsaktsis C, Rahman T, Sahay B, Feustel PJ, et al. Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium's surface-carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity. *PLoS One.* 2011;6(7):e22335. DOI: 10.1371/journal.pone.0022335
10. Kumar S, Sunagar R, Pham G, Franz BJ, Rosa SJ, Hazlett KR, et al. Differential Cultivation of *Francisella tularensis* Induces Changes in the Immune Response to and Protective Efficacy of Whole Cell-Based Inactivated Vaccines. *Front Immunol.* 2017 Jan 10;7:677. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00677
11. Лапин АА, Павлов ВМ, Мокриевич АН, Домотенко ЛВ, Храмов МВ. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2009;4(102):66-67. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-66-67
12. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». М., 2021.
13. Svensson K, Larsson P, Johansson D, Byström M, Forsman M, Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol.* 2005 Jun;187(11):3903-8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005
14. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem.* 1997 Sep;69(3):1330-1. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69031330.x
15. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):1-18. DOI: 10.1128/CMR.10.1.1

References

1. McLendon MK, Apicella MA, Allen LA. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:167-85. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126
2. Naryshkina EA, Krasnov YM, Alhova ZV, Badanin DV, Osin AV, Lyashova OYu, et al. Whole-Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of *Francisella tularensis* Vaccine Strain 15 НИИЭГ. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2020;2:91-97. DOI:10.21055/0370-1069-2020-2-91-97 (In Russian).
3. Bakshi CS, Malik M, Regan K, Melendez JA, Metzger DW, Pavlov VM, et al. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J Bacteriol.* 2006 Sep;188(17):6443-8. DOI: 10.1128/JB.00266-06
4. Melillo AA, Mahawar M, Sellati TJ, Malik M, Metzger DW, Melendez JA, et al. Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide

- dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J Bacteriol.* 2009 Oct;191(20):6447-56. DOI: 10.1128/JB.00534-09
5. Santic M, Molmeret M, Klose KE, Jones S, Kwak YA. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol.* 2005 Jul;7(7):969-79. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00526.x
6. de Bruin OM, Duplantis BN, Ludu JS, Hare RF, Nix EB, Schmerk CL, et al. The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IgIA, IgIB, IgIC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology (Reading).* 2011 Dec;157(Pt 12):3483-3491. DOI: 10.1099/mic.0.052308-0
7. Mokrievich AN, Pavlov VM, Vakhrameeva GM, Mironova RI, Kombarova TI, Bakhteeva IV, et al. Properties of *F. tularensis* subsp. *holarctica* bacteria deprived the ability to synthesize igIC protein. *Bacteriology.* 2017;2(4):17-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24 (In Russian).
8. Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund AL, Zingmark C, Golovliov I, Sjöstedt A, et al. Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* 2009 Aug;77(8):3424-31. DOI: 10.1128/IAI.00196-09
9. Zarella TM, Singh A, Bitsaktsis C, Rahman T, Sahay B, Feustel PJ, et al. Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium's surface-carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity. *PLoS One.* 2011;6(7):e22335. DOI: 10.1371/journal.pone.0022335
10. Kumar S, Sunagar R, Pham G, Franz BJ, Rosa SJ, Hazlett KR, et al. Differential Cultivation of *Francisella tularensis* Induces Changes in the Immune Response to and Protective Efficacy of Whole Cell-Based Inactivated Vaccines. *Front Immunol.* 2017 Jan 10;7:677. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00677
11. Lapin AA, Pavlov VM, Mokrievich AN, Domotenko LV, Khramov MV. Simple liquid nutrient medium for molecular genetic investigations of *Francisella tularensis*. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2009;4(102):66-67. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-66-67 (In Russian).
12. SanPiN 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Moscow, 2021. (In Russian).
13. Svensson K, Larsson P, Johansson D, Byström M, Forsman M, Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol.* 2005 Jun;187(11):3903-8. DOI: 10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005
14. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem.* 1997 Sep;69(3):1330-1. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69031330.x
15. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):1-18. DOI: 10.1128/CMR.10.1.1

Информация о соавторах:

Хлопова Ксения Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Вахрамеева Галина Михайловна, научный сотрудник лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кравченко Татьяна Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Павлов Виталий Михайлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Ksenia V. Khlopova, Junior Researcher of the Laboratory of microbiology of anthrax, Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Galina M. Vakhrameeva, Researcher of the Laboratory of Microbiology of Tularemia, Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Tatyana B. Kravchenko, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Laboratory of Microbiology of Anthrax, Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Vitaly M. Pavlov, PhD, DSc (Biological Sciences), Head of the Laboratory of Tularemia Microbiology, Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Нераскрытый потенциал бактериальных соединений и генов, связанных с токсином, вызывающим рак толстой кишки

In silico разработка генома обеспечивает легкий доступ к кластерам генов биосинтеза вторичных метаболитов (BGC), кодирующим биосинтез многих биологически активных соединений, которые являются основой для многих важных лекарств, используемых в медицине. Проанализировано 3889 геномов энтеробактерий и обнаружено 13 266 BGC, представленных 252 различными семействами BGC и 347 дополнительными одиночками. Анализ пангенома выявил 88 генов, предположительно связанных со специфическим BGC, кодирующим связанный с раком толстой кишки колибактин, который кодирует различные метаболические и регуляторные функции. Представленный рабочий процесс открывает возможность обнаружения новых вторичных метаболитов, лучшего понимания их физиологической роли и предоставляет руководство по идентификации и анализу наборов генов, связанных с BGC.



Mohite OS, et al.

Pangenome analysis of Enterobacteria reveals richness of secondary metabolite gene clusters and their associated gene sets. Synthetic and Systems Biotechnology. 2022;(7):900-10.