Е.К. Псарева¹, Н.Ф. Тимченко¹, С.А. Ермолаева², Н.А. Терентьева³, Г.Г. Компанец¹

РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО НЕКРОТИЗИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ИЗ ШТАММА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, ВЫДЕЛЕННОГО НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»; 690087, Владивосток, РФ;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, 123098, Москва, РФ;

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690022, Владивосток, РФ.

Цитотоксический некротизирующий фактор (CNF) является одним из токсинов *Yersinia pseudotuberculosis*, модифицирующих семейство Rho-белков. В настоящей работе представлены данные об обнаружении у *Y. pseudotuberculosis*, возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, 2 аллелей гена *cnfY*, дана молекулярно-генетическая характеристика этого гена в штаммах, изолированных в Российской Федерации от больных людей, грызунов и из объектов внешней среды в 1973-2015 годах. Проведено клонирование полноразмерного гена токсина, выделен рекомбинантный белок CNFY и показано влияние этого токсина на эукариотические клетки Hep-2 и Vero E6.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, ген, цитотоксический некротизирующий фактор, белок.

Для цитирования: Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф., Ермолаева С.А., Терентьева Н.А., Компанец Г.Г. Рекомбинантный белок цитотоксического некротизирующего фактора из штамма *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенного на территории Российской Федерации. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2016; 2(65): 40–43. DOI: 10.18411/hmes.d-2016-075

Для корреспонденции: Псарева Е.К., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии; e-mail: ekaterinapsareva@gmail.com

Поступила 22.05.16

Е.К. Psareva¹, N.F. Timchenko¹, S.A. Ermolaeva²,
N.A. Terentieva³, G.G. Kompanets¹

DOI: 10.18411/hmes.d-2016-075

THE RECOMBINANT PROTEIN CYTOTOXIC NECROTIZING FACTOR FROM STRAIN *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, ISOLATED IN THE RUSSIAN FEDERATION

¹ The Somov Institute of Epidemiology and Microbiology; 690087, Vladivostok, Russia;

² The Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology; 123098, Moscow, Russia;

³ The G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences; 690022, Vladivostok, Russia

The cytotoxic necrotizing factor (CNF) of *Yersinia pseudotuberculosis* belongs to a family of protein toxins that constitutively activate small GTPases of the Rho family. There are 2 alleles *cnfY* gene of the strains which isolated from the patient's stool with clinical signs of Far East scarlet-like fever, from the vegetables and rodents presented in study. All strains were isolated in Russia (Siberia, Far East, Europe) in 1973–2015 and their molecular genetic characteristics were describe. We carried out the cloning of full-length toxin gene, isolated recombinant protein CNFY and showed the effect of the toxin on the eukaryotic cells Hep-2 and Vero E6.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, gene, cytotoxic necrotizing factor, protein toxin.

For citation: Psareva E.K., Timchenko N.F., Ermolaeva S.A. et al. The recombinant protein cytotoxic necrotizing factor from strain *Yersinia pseudotuberculosis*, isolated in the Russian Federation. *Health. Medical ecology. Science* (in Russia). 2016; 2: 40–43. DOI: 10.18411/hmes.d-2016-075

For correspondence: Psareva E.K. – junior researcher Laboratory of Molecular Epidemiology and Microbiology, e-mail: ekaterinapsareva@gmail.com

Conflict of interests. The authors are declaring absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 22.05.16

Accepted 27.05.16

Введение

Известно, что *Y. pseudotuberculosis* является факультативным внутриклеточным паразитом и характеризуется высоким адаптационным потенциалом [4]. Эти микроорганизмы выделены от людей, многих видов экто- и эндотермных животных, в том числе диких грызунов, из растений, объектов внешней среды (почва, вода) и продуктов питания. Патогенность *Y. pseudotuberculosis* является полидетерминантным признаком, который обеспечивает бактерии способностью вызывать инфекционный процесс, проникая в организм. К настоящему времени известно, что *Y. pseudotuberculosis* продуцирует разные токсины, кодируемые генами хромосомы и плазмиды вирулентности [2, 5].

Цель исследования

Целью настоящей работы является определение наличия гена цитотоксического некротизирующего фактора *Y. pseudotuberculosis* (*cnfY*) в штаммах, изолированных в РФ, изучение его гетерогенности и получение рекомбинантного белка.

Материалы и методы

В работе изучено 100 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных от больных людей, грызунов и овощей в РФ (Дальний Восток, Сибирь, Европейская часть РФ) в 1973–2015 гг. (коллекция НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова). Бактерии выращивали на питательном агаре в течение 18–24 ч при температуре 20–22°C. Для получения ДНК, микроорганизмы суспендировали в 50 мкл деионизированной воды и кипятили 8 минут на водяной бане. Ген *cnfY* был амплифицирован, с помощью праймеров: 5'-GCAGGTGGGAGCAACAAGAT-3' и 3'-ACGGCGAACTTGATAATTGCTT-5' в термодинамическом цикле «Терцикл», по программе [6]. Полученные ампликоны анализировали в электрофорезе в 1% геле агарозы, содержащем бромистый этидий.

Для клонирования и получения рекомбинантной плазмиды, способной продуцировать рекомбинантный белок CNFY, использовали штамм *Y. pseudotuberculosis* 2517 III серовара (получен от Н. Mollaret, Франция). ПЦР-продукт клонировали в вектор pCR 8GW-TOPO, несущий ген устойчивости к спектомицину, лигазную смесь трансформировали в штамм *E. coli* JM 109. Отбор проводили на среде LB, содержащей 100 мкг/мл спектиномицина. Клоны, содержащие вставку 3045 п.н., определяли с помощью ПЦР. Выделенную рекомбинантную плазмиду секвенировали в ЦКП «Геном» для оценки

верного положения и сохранения полного гена *cnfY* [2]. Далее, методом рестрикционного анализа, была вырезана вставка гена *cnfY* по сайту рестрикции EcoRI из вектора pCR 8 GW TOPO и лигирована в вектор pT28a, по тому же сайту рестрикции, который содержит активный промотор для дальнейшей экспрессии рекомбинантного белка CNFY. Лигазная смесь была трансформирована в компетентные клетки *E. coli* BL 21.

Для выделения рекомбинантного белка бактерии компетентных клеток выращивали в жидкой среде LB, содержащей 100 мг/мл канамицина в течение 3–4 часов до OD₆₀₀ 1–1,5 и далее индуцировали 1 mM Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) в течение 2 часов при 37°C с шуттелированием при 180 об/мин. Полученную бактериальную массу осаждали центрифугированием при 7000 об/мин в течение 10 мин, лизировали с использованием ультразвука и далее проводили выделение белка с помощью ионообменной и гель-фильтрационной хроматографии по описанному ранее методу [1].

Цитотоксическое действие рекомбинантного белка исследовано на моделях эукариотических клеток Hep-2 и Vero E6. Клетки выращивали в среде DMEM, с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота в течение 18–20 часов при 37°C в инкубаторе содержащем 5% CO₂. Токсин добавляли в концентрации 1,0–0,1 мг/мл и инкубировали в течение 48–72 часов.

Результаты исследования

Ген *cnfY* обнаружен у 100% штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Из них 98% имели 1 аллель гена токсина и 2% – 2 аллель. Пробы аллелей гена *cnfY* были секвенированы. При определении полной последовательности гена *cnfY* аллеля в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, установлено, что он имеет размер 1791 п.н. Аллель 2 гена *cnfY* является полноразмерным и состоит из 3045 п.н. Получена молекулярно-генетическая характеристика обоих аллелей гена токсина, информация об аллелях гена *cnfY* зарегистрирована в базе данных GenBank. KR028010-KR028011 [3].

В результате клонирования получена рекомбинантная плаزمид, содержащая вставку 3045 п.н., которая на 99,9% идентична последовательности гена *cnfY* штамма YPIII, представленному в базе данных GenBank, которая содержит 3 точечные мутации A578G, A914G, G1183A и способствует продукции рекомбинантного белка CNFY.

Полноразмерный ген токсина был обнаружен в штамме *Y. pseudotuberculosis* 696 серовара 01b, выделенного из объекта окружающей среды (смыв с капусты) на территории Приморского края в 1981 г., который на 100% идентичен клонированному гену *cnfY* штамма 2517.

Выделен и очищен рекомбинантный белок CNFY. При исследовании биологической активности этого белка выявлено его воздействие на эукариотические клет-

ки Hep-2 и Vero E6. Белок вызывал репликацию клеток без клеточного деления, в результате чего появились в культуре крупные многоядерные клетки (рис.).

Рис. А – контроль, клетки Hep-2; Б – опыт, клетки Hep-2 при действии CNFY (указаны стрелками); В – контроль, клетки Vero E6; Г – опыт, клетки Vero E6 при действии CNFY (указаны стрелками)

Заключение

В настоящем исследовании представлены данные о влиянии белка, кодируемого в полноразмерном гене токсина цитотоксического некротизирующего фактора *Y. pseudotuberculosis*. Однако, у 98% штаммов обнаружен ген *cnfY*, содержащий две делетированные области и некоторые другие мутации, которые способны влиять на продукцию белка. Поэтому в дальнейших исследованиях планируется выявление различий изогенных штаммов с функциональным и нефункциональным *cnfY* при взаимодействии с культурами клеток. В результате будут получены результаты, проливающие свет на специфическое отсутствие функционального *cnfY* в бактериях *Y. pseudotuberculosis*, связанных с развитием синдрома ДСЛ.

Конфликт интересов отсутствует.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Персиянова Е.В., Адгамов Р.Р., Сурин А.К., Псарева Е.К., Ермолаева С.А., Тимченко Н.Ф. Цитотоксический некротизирующий фактор *Yersinia pseudotuberculosis*, возбудителя ДСЛ. *Бюлл. СО РАМН*. 2013; 33(2): 16–20.
2. Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф., Собынин К.А., Смирнова Н.В., Ермолаева С.А. Клонирование, секвенирование и анализ последовательностей гена цитотоксического некротизирующего фактора *Yersinia pseudotuberculosis*. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 87.
3. Псарева Е.К., Собынин К.А., Ермолаева С.А., Тимченко Н.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика цитотоксического некротизирующего фактора *Yersinia pseudotuberculosis*. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(18): 602–3.
4. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н. и др. *Псевдотуберкулез*. – М.: Медицина, 2001.
5. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia*

pseudotuberculosis. – Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004.

6. Тимченко Н.Ф., Попов А.Ф., Андрияков Б.Г. Актуальные вопросы микробиологии, клиники и диагностики дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, вызванной *Yersinia pseudotuberculosis* *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2015; 60(2): 94–100.

7. Lockman H.A., Gillespie R.A., Baker B.D. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. *Infect. Immun.* 2002; 70(5): 2708–14.

REFERENCES

1. Persiyanova E.V., Adgamov R.R., Surin A.K., Psareva E.K., Ermolaeva S.A., Timchenko N.F. The cytotoxic necrotizing factor *Yersinia pseudotuberculosis*, the causative agent of Far East Scarletiform fever. *Bull. SB RAMS*. 2013; 33 (2): 16–20.
2. Psareva E.K., Timchenko N.F., Sobyenin K.A., Smirnova N.V., Ermolaeva S.A. Cloning, sequencing and analysis of the gene sequences of the cytotoxic necrotizing factor *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity*. 2014; 87.
3. Psareva E.K., Sobyenin K.A., Ermolaeva S.A., Timchenko N.F. Molecular genetic characterization of cytotoxic necrotizing factor *Yersinia pseudotuberculosis*. *Russian immunological journal*. 2015; 9 (18): 602–3.
4. Somov G.P., Pokrovsky V.I., Besednova N.N. et al. *Pseudotuberculosis*. – M.: Medicine, 2001.
5. Timchenko N.F., Nedashkovskaya E.P., Dolmatova L.S., Somov-Isachkova L.M. Toxins *Yersinia pseudotuberculosis*. – Vladivostok: Primpoligrafkombinat 2004.
6. Timchenko N.F., Popov A.F., Andryukov B.G. Topical issues of microbiology, clinical diagnosis and the Far East Scarletiform fever, caused by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Health. Environmental health. Science*. 2015; 60 (2): 94–100.
7. Lockman H.A., Gillespie R.A., Baker B.D. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. *Infect. Immun.* 2002; 70(5): 2708–14.

Сведения об авторах

Псарева Екатерина Константиновна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, телефоны: 8(423)246-78-14, 89046281858; 690078, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; e-mail: ekaterinapsareva@gmail.com

Тимченко Нэлли Федоровна – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, тел./факс: 8(423) 244-14-38; 690078, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; e-mail: ntimch@mail.ru.

Ермолаева Светлана Александровна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории экологии возбудителей ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, 8 (909) 939-96-12; 123098 г. Москва, ул. Гамалеи, д.18; e-mail: drermolaeva@mail.ru

Терентьева Наталья Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, 690022, г. Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159. тел.: 8(423) 231-07-03, e-mail nattere@mail.ru

Компанец Галина Геннадиевна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории хантавирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, тел./факс: 8 (423) 244-14-38; 690078, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; e-mail: kompanetc.galina@gmail.com

© Лубова В.А., Леонова Г.Н., 2016
УДК 579.834.114(571.63)

DOI: 10.18411/hmes.d-2016-076

В.А. Лубова, Г.Н. Леонова

ИКСОДОВЫЕ КЛЕЩЕВЫЕ БОРРЕЛИОЗЫ (ВОПРОСЫ ИСТОРИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, РФ

Открытие иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) стало одним из самых важных событий XX века в медицинской микробиологии и инфекционной патологии. В Российской Федерации практически повсеместно распространены возбудители ИКБ *B. garinii* и *B. afzelii*, которые имеют основное эпидемиологическое значение в патологии человека. В европейской части Российской Федерации изучению ИКБ уделяется пристальное внимание. На Дальнем Востоке эта актуальная проблема требует проведения широких комплексных исследований по заболеваемости и инфицированности иксодовых клещей – основных переносчиков инфекции. Отдельным вопросом стоит необходимость изучения сочетанного заражения человека различными видами боррелий, а также изучения сочетанных очагов ИКБ и других клещевых инфекций.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, история, эпидемиология, клиника, методы исследований.

Для цитирования: Лубова В.А., Леонова Г.Н. Иксодовые клещевые боррелиозы (вопросы истории). *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2016; 2(65): 43–49. DOI: 10.18411/hmes.d-2016-076

Для корреспонденции: Лубова В.А., младший научный сотрудник лаборатории флавовирусных инфекций; e-mail: valeri_priority@mail.ru

Поступила 13.05.16

V.A. Lubova, G.N. Leonova

DOI: 10.18411/hmes.d-2016-076

IXODES TICK-BORNE BORRELIOSIS (HISTORICAL QUESTIONS)

Federal State Scientific Institution «Research Institute of Epidemiology and Microbiology name's G.P. Somov», 690087, Vladivostok, Russia

Opening ixodes tick-borne borreliosis (TBB) has become one of the most important events of the twentieth century in the medical microbiology and infectious pathology. In the Russian Federation almost everywhere widespread pathogens TBB *B. garinii* and *B. afzelii*, which have basic epidemiological importance in human pathology. In the European part of the Russian Federation close attention is given to the study of the TBB. In the Far East it is an actual problem requires extensive comprehensive research of diseases and infected ticks - the main carriers of the infection. A separate question is the need to study the combined infection human different types of *Borrelia*, as well as studying the combined foci of the TBB and other tick-borne infections.