

Изучение протективных свойств химерного белка OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* на моделях синегнойной инфекции у мышей

В.С.Тимофеев, Т.Б.Кравченко, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Ю.О.Гончарова,
А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова

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

Pseudomonas aeruginosa – синегнойная палочка – является одним из наиболее опасных оппортунистических патогенов и причиной внутрибольничных пневмоний, раневых и ожоговых инфекций и ко-инфекций при COVID-19. *P. aeruginosa* обладает большим количеством факторов вирулентности и способна быстро приспосабливаться к новым условиям. Выявляется большое количество штаммов с множественной устойчивостью к антибиотикам. Помочь решить проблему возникновения синегнойной инфекции может вакцинация, однако в настоящее время не зарегистрировано ни одной доступной вакцины.

Целью данного исследования является разработка кандидатной субъединичной вакцины против *P. aeruginosa* на основе химерного рекомбинантного белка OprF/OprL, состоящего из двух слитых мембранных белков. Полноразмерные гены *oprF* и *oprL* были слиты и клонированы в экспрессионный вектор с получением плазмиды pLATE51-*oprF/oprL*. Химерный белок OprF/OprL получен путем экспрессии и очищен методом аффинной металл-хелатирующей хроматографии. Моделирование синегнойной инфекции осуществлено на двух животных моделях мышей линии Swiss Webster с индуцированным иммунодефицитом, иммунизированных белком OprF/OprL: модели летального синегнойного сепсиса и модели синегнойной инфекции мягких тканей бедра. У всех иммунизированных животных иммуноферментный анализ показал высокий титр специфических антител к OprF/OprL, который составлял ~1:100000. Достоверной разницы при оценке обсемененности крови между иммунными и контрольными животными как с перитонитом, так и с инфекцией бедра не было выявлено. Оценка протективности OprF/OprL иммунизированных мышей при заражении штаммом *P. aeruginosa* PAO-1 дозой 5 LD₅₀ показала, что иммунизация предохраняла от гибели 33% животных и при синегнойном сепсисе, и при инфекции бедра. Таким образом, мы предлагаем кандидатную субъединичную вакцину, основой которой является гибридный белок OprF/OprL, состоящий из полноразмерных слитых иммуногенных белков OprF и OprL *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, синегнойная инфекция, животные модели, субъединичная вакцина, OprF, OprL

Для цитирования: Тимофеев В.С., Кравченко Т.Б., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Гончарова Ю.О., Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И. Изучение протективных свойств химерного белка OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* на моделях синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2024; 9(4): 100–106. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-100-106

The study of the protective properties of the chimeric protein OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* on mice models

V.S.Timofeev, T.B.Kravchenko, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, Yu.O.Goncharova,
A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova

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

Pseudomonas aeruginosa – is one of the most dangerous opportunistic pathogens and the cause of nosocomial pneumonia, wound and burn infections and coinfections in COVID-19. *P. aeruginosa* has a large number of virulence factors and is able to quickly adapt to new conditions. A large number of strains with multiple antibiotic resistance are being identified. Vaccination can help solve the problem of *P. aeruginosa* infection, but currently no available vaccine has been registered.

The aim of this study is to develop a candidate subunit vaccine against *P. aeruginosa* based on the chimeric recombinant protein OprF/OprL, consisting of two fused membrane proteins. The full-size genes *oprF* and *oprL* were fused and cloned into an expression vector to produce the pLATE51-*oprF/oprL* plasmid. The chimeric OprF/OprL protein was obtained by expression and purified by affinity metal chelating chromatography. *P. aeruginosa* infection was modeled on two animal models of mice Swiss Webster with induced immunodeficiency immunized with OprF/OprL protein: model of lethal sepsis and model of infection

Для корреспонденции:

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, заместитель директора по аналитической работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24

Статья поступила 11.10.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Vitaly S. Timofeev, PhD (Biological Sciences), Deputy Director for Analytical Work, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation

The article was received 11.10.2024, accepted for publication 25.12.2024

of the thigh soft tissues. In all immunized animals enzyme immunoassay showed a high titer of specific antibodies to OprF/OprL, which was ~1/100000. There was no significant difference in the assessment of blood contamination between immune and control animals with both peritonitis and thigh infection. Evaluation of the OprF/OprL protectivity of immunized mice infected with the *P. aeruginosa* PAO-1 at a dose of 5 LD₅₀ showed that immunization prevented 33% of animals with both peritonitis and thigh infection from dying. Thus, we propose a candidate subunit vaccine based on the hybrid protein OprF/OprL, consisting of full-size fused immunogenic proteins OprF and OprL of *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, animal models, subunit vaccine, OprF, OprL

For citation: Timofeev V.S., Kravchenko T.B., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Goncharova Yu.O., Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I. The study of the protective properties of the chimeric protein OprF/OprL *Pseudomonas aeruginosa* on mice models. Bacteriology. 2024; 9(4): 100–106. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-100-106

Pseudomonas aeruginosa – синегнойная палочка, грамотрицательный аэробный микроорганизм, обитающий в воде и почве, являющийся условно-патогенным из-за способности вызывать оппортунистические инфекции. Свое название он получил из-за характерного сине-зеленого цвета гнойных выделений и окрашивания перевязочного материала ожоговых ран при внутрибольничных заражениях.

Синегнойная палочка входит в число наиболее актуальных возбудителей оппортунистических инфекций. Свое место она по праву заняла в эру множественной антибиотикорезистентности. Этим микроорганизмом обусловлено 16% случаев внутрибольничных пневмоний, от 8 до 12% внутрибольничных инфекций и инфекций хирургических ран [1], также отмечаются вспышки в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных [2]. Используя свой арсенал факторов вирулентности и способность адаптироваться к новым условиям, *P. aeruginosa* вызывает ряд трудно поддающихся лечению острых и хронических инфекций у лиц с ослабленным иммунитетом. Синегнойная палочка может инфицировать и колонизировать почти все системы органов человека. Заболевания варьируют от легких местных инфекций до опасных для жизни инфекций ожоговых ран, бактериемии и пневмонии. Кроме того, вызываемые *P. aeruginosa* заболевания являются второй наиболее распространенной бактериальной ко-инфекцией у пациентов с COVID-19 [3].

Всемирная организация здравоохранения определила *P. aeruginosa* как один из патогенов, требующих срочных поисков новых методов лечения [4]. Главная проблема заключается в том, что, наряду с *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* является одним из видов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), объединенных в группу ESKAPE-патогенов [5]. Сложность терапии, в особенности антибиотикотерапии, и высокая летальность определяют актуальность разработки альтернативных методов предотвращения и лечения инфекций *P. aeruginosa*. В связи со все более частым обнаружением штаммов *P. aeruginosa*, обладающих МЛУ, мы приближаемся ко времени, когда не останется никаких методов лечения этой инфекции. Таким образом, необходимы новые профилактические и терапевтические стратегии. Вакцины являются многообещающей альтернативой антибиотикам, помогающей предотвратить инфицирование *P. aeruginosa* восприимчивыми людьми. К сожалению, несмотря на обширные исследования, в настоящее время нет доступных лицензированных

вакцин против инфекций, вызываемых этим патогеном [3]. Однако клиническая значимость *P. aeruginosa* обусловила большое количество научных изысканий по разработке вакцинных препаратов для специфической профилактики. Ряд исследований посвящен изучению иммунологической активности целого ряда белков *P. aeruginosa*, в т.ч. OprL (outer membrane protein L – пептидогликан-ассоциированный липопротеин) и OprF (outer membrane protein F – порин внешней мембраны), рассматриваемые в качестве компонентов потенциальной субъединичной псевдомонадной вакцины [6].

Целью данного исследования является разработка кандидатной субъединичной вакцины против *P. aeruginosa* на основе химерного рекомбинантного белка OprF/OprL, состоящего из двух слитых мембранных белков.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов и условия культивирования. Термолизат культуры штамма *P. aeruginosa* PAO-1 (кат. № В-168 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск») использовали как источник ДНК при амплификации целевых генов методом полимеразной цепной реакции. Этот же штамм использовали для моделирования синегнойной инфекции. Для клонирования генов использовали штамм *Escherichia coli* DH5α, для экспрессии рекомбинантного белка – *E. coli* BL21(DE3). Для культивирования *P. aeruginosa* использовали ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), для *E. coli* – агар Хоттингера и бульон Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), для рекомбинантных штаммов *E. coli* добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, для высевов из органов животных была использована селективная среда для *P. aeruginosa* – цетримидный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Лабораторные животные. В качестве модельных животных использовали аутбредных мышей Swiss Webster (самцы/самки, 28–32 г), выращенных в питомнике ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши имели свободный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм», Россия). Животных размещали в клетках группами не более шести особей и проводили ежедневное ветеринарное наблюдение.

Получение генетических конструкций. Для получения генетических конструкций нами были сконструированы праймеры и синтезированы ООО «НПФ СИНТОЛ» (Россия). Гены *oprF* и *oprL*, кодирующие белки OprF и OprL *P. aeruginosa*, были амплифицированы с использованием праймеров

OprFF1 5'-GATGACAAGATGAACTGAAGAACACCTT-3' и
OprFR1 5'-CATTTCCATCTTGGCTTCAGCTTCTAC-3';
OprLF1 5'-GAAGCCAAGATGGAAATGCTGAAATTC-3' и
OprLR1 5'-AAGTCATTATTACTTCTTCAGCTCGACGC-3' соответственно. Слияние амплифицированных фрагментов осуществляли с использованием набора Gibson Assembly Cloning Kit (New England Biolabs, США). Гибридный фрагмент клонировали в вектор pJET1.2/blunt с использованием набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Конструкцию pJET1.2/blunt-oprF/oprL трансформировали в штамм *E. coli* DH5 α путем электропорации. Затем проводили амплификацию гибридного фрагмента oprF/oprL с использованием праймеров

OprFF2 5'-GGTGATGATGATGACAAGATGAACTGAAG-3' и
OprLR2 5'-GGAGATGGGAAGTCATTATTACTTCTTCAGC-3'.

В качестве источника матрицы ДНК была использована плаزمида pJET1.2/blunt-oprF/oprL. Полученный фрагмент клонировали в экспрессионный вектор pLATE51 с использованием набора aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System (Thermo Fisher Scientific, США). Конструкцию pLATE51-oprF/oprL трансформировали в штамм *E. coli* DH5 α путем электропорации. Плазмида была выделена с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген», Россия) и трансформирована в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3).

Получение и очистка рекомбинантного белка. Синтез целевого белка штаммом *E. coli* BL21(DE3) pLATE51-oprF/oprL индуцировали внесением индуктора изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид в конечной концентрации 2 мМ с последующей инкубацией в течение 3,5 ч при 37°C. Целевой белок выделяли из телец включения солюбилизацией буфером (5 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 20 мМ Трис, pH 7,9) с добавлением мочевины до конечной концентрации 6 М с последующей аффинной хроматографией на колонке с 5 мл хелатирующего сорбента Ni⁺⁺-NTA-Сефароза (GE Healthcare, Швеция). Белок элюировали возрастающими концентрациями имидазола в диапазоне 20–500 мМ. После электрофоретического анализа в 10%-м ПААГ-SDS фракции, содержащие целевой белок, объединяли и диализовали при температуре 6°C против буфера (20 мМ Трис, pH 7,4). Концентрацию белка определяли при $\lambda = 280$ нм на спектрофотометре Ultrospec 3100 pro (Pharmacia Biotech, США).

Адсорбция белка на гидроокиси алюминия. Препарат очищенного белка OprF/OprL диализовали против забуференного физиологического раствора (10 мМ Na₃PO₄, 137 мМ NaCl, pH 7,2–7,4) (ЗФР) и стерилизовали через мембранный фильтр 0,20 мкм Filtropur S 0.2 (Sarstedt Ag&Co.KG, Германия). Взвесь, содержащую 50% Al(OH)₃ в ЗФР, стерилизовали и осаждали центрифугированием при 6000 об./мин в течение 15 мин. После удаления жидкой фазы вносили препарат белка в соотношении 1 мг белка на 200 мг Al(OH)₃. Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре на роторном шейкере Multi Bio RS-24 (BioSan, Латвия) в течение 2 ч, далее без перемешивания в течение 16 ч при температуре +4°C. Не связавшийся с Al(OH)₃ белок отделяли центрифугированием и проводили контроль адсорбции спектрофотометрическим и электрофоретическим анализом в 10%-м ПААГ-SDS. Взвесь Al(OH)₃ с адсорбиро-

ванным белком дважды промывали ЗФР. На последнем этапе осадок суспендировали в рассчитанном количестве ЗФР, с добавлением консерванта мертиолята натрия до конечной концентрации 100 мкг/мл.

Иммунизация. Мыши ($n = 30$) были иммунизированы белком OprF/OprL, сорбированным на Al(OH)₃. Иммунизация проводилась подкожно в дозе 50 мкг/мышь двукратно с интервалом 21 день. В контрольную группу ($n = 16$) вошли неиммунные мыши той же партии животных. Через 14 дней после последней иммунизации мыши были заражены штаммом PAO-1.

Определение титра антител в крови животных проводили иммуноферментным анализом согласно руководству Т.Т.Нго и др. [7]. В качестве антигена использовали OprF/OprL, сорбированный в концентрации 1 мкг/мл. Адсорбцию проводили в течение ночи при температуре 4°C, инактивацию свободных центров связывания – при температуре 37°C в течение 30 мин раствором 1% БСА. Забор крови у иммунизированных животных осуществляли прижизненно через 14 дней после второй иммунизации. Полученные из проб крови сыворотки использовали в исходном разведении 1:20, титровали далее с шагом 1:2 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C. После отмывки в лунки вносили раствор конъюгата антимышиных антител с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в рабочем разведении 1:12 000 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C. Окрашивание проводили раствором ортофенилендиамина. Оптическую плотность (ОП) в лунках измеряли при $\lambda = 492$ нм на спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США). За конечный титр принимали разведение, ОП которого в 2 раза превышала ОП в контрольной лунке. За контрольные принимали лунки с сывороткой интактных животных в исходном разведении 1:20.

Моделирование синегнойной инфекции проводили на мышах с индуцированным иммунодефицитом на моделях летального синегнойного сепсиса и синегнойной инфекции мягких тканей бедра, как описано ранее в [8]. В экспериментальных группах было по 15 иммунизированных мышей, в контрольных – по 8 неиммунных. Для моделирования летального синегнойного сепсиса у мышей индуцировали перитонит. В качестве иммунодепрессанта использовали муцин. Для этого ночную культуру PAO-1 суспендировали в ЗФР с 2,5%-м муцином. Заражение проводили внутрибрюшинно в дозе 5 LD₅₀ (10⁶ КОЕ/мышь). Бедренную синегнойную инфекцию воспроизводили на мышах с индуцированным иммунодефицитом, вызванным циклофосфамидом: животным дважды (за 4 суток и за сутки до заражения) внутрибрюшинно вводили циклофосфамид в дозе 100 мг/кг. Ночную культуру PAO-1, суспендированную в ЗФР, вводили внутримышечно в дозе 10⁶ КОЕ/мышь.

Бактериологический анализ биологических образцов. Через 12 ч после заражения часть животных гуманно эвтазировали ингаляцией CO₂ и получали у них селезенку и образцы крови пункцией сердца. Образцы крови смешивали с 3,7%-м цитратом натрия в соотношении 3:1, селезенку гомогенизировали в 1 мл ЗФР. Количество высеваемых бактерий оценивали путем высевов цельных образцов и их десятикратных разведений, которые инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч.

Результаты исследования и их обсуждение

Как известно, синегнойная инфекция является значимой проблемой здравоохранения из-за все большего количества штаммов, обладающих МЛУ, и одним из основных видов микроорганизмов, обуславливающих внутрибольничные заражения. Кроме внутрибольничных пневмоний, инфекций новорожденных, эндофтальмитов, синдрома «зеленого ногтя» и заражений людей с ослабленным иммунитетом, актуальность опасений по поводу *P. aeruginosa* возрастает из-за того, что он зачастую вызывает вторичную бактериальную инфекцию у больных с COVID-19 [3] и крайне опасен при раневых заражениях и ожогах. В связи с появлением у штаммов *P. aeruginosa* устойчивости ко все большему количеству антибактериальных препаратов требуются новые средства борьбы с ним. К таким средствам относится вакцинопрофилактика. Однако в настоящее время не существует доступных вакцин против инфекций, вызываемых этим патогеном, в т.ч. и отечественного производства.

В рамках федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» мы занялись поиском кандидата потенциальной субъединичной псевдомонадной вакцины. На первом этапе осуществили поиск белков-кандидатов. В поле нашего внимания попали белки OprF и OprL. OprF – это порин внешней мембраны *P. aeruginosa*, высококонсервативный среди различных штаммов. Он является одним основных антигенов и играет важную роль в вирулентности: участвует в определении кворума, секреции токсинов и клеточной адгезии [9, 10]. OprF имеет N-концевой пориновый домен и C-концевой пептидогликан-связывающий домен [11]. Ранее этот белок уже стал популярным кандидатом-антигеном для вакцин против синегнойной палочки, однако авторы работ зачастую предлагают использовать только C- либо N-концевой домен белка [10]. OprL – пептидогликан-ассоциированный липопротеин внешней мембраны [12]. Известно, что рекомбинантный OprL способен вызывать сильный Th17-ответ, который обеспечивает Th17-зависимую и серотип-независимую защиту от острой легочной инфекции *P. aeruginosa* у мышей [13]. Именно поэтому эти белки были выбраны нами в качестве целевых. А чтобы увеличить количество иммуногенных эпитопов и упростить процесс оптимизации получения кандидатной вакцины, мы решили получить химерный белок путем слияния генов *oprF* и *oprL* с помощью стандартных генно-инженерных процедур.

Полноразмерные последовательности *oprF* и *oprL* были объединены нами по методу Гибсона и клонированы в экспрессионный вектор pLATE51, в результате чего была получена целевая генетическая конструкция pLATE51-*oprF/oprL*. Согласно расчетам, *in silico* размер последовательности слитых генов составил 1557 п.н., а размер экспрессируемого гибридного белка OprF/OprL в совокупности с сигнальным пептидом плазмиды pLATE51 – 548 а.о. Плазмида pLATE51-*oprF/oprL* была трансформирована в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3).

В результате индукции синтеза белка из телец включения штамма *E. coli* BL21(DE3) pLATE51-*oprF/oprL* был получен препарат частично очищенного рекомбинантного химерного белка OprF/OprL. Отдельные этапы аффинной металл-хела-

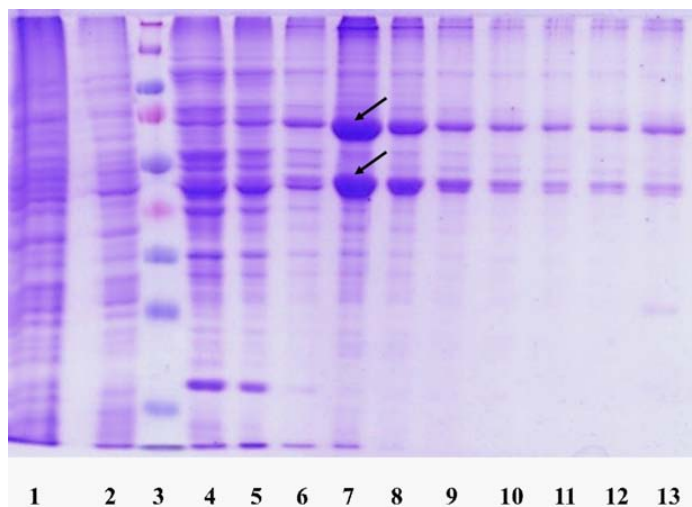


Рис. 1. Электрофореграмма хроматографических фракций, полученных при выделении химерного белка OprF/OprL из клеток *E. coli* BL21(DE3) pLATE51-*oprF/oprL* аффинной хроматографией на Ni⁺⁺-NTA-Сефарозе (GE Healthcare, Швеция): 1 – клеточный осадок, солюбилизованный в 6 М мочеvine; 2 – фракция, элюированная промывкой колонки стартовым буфером; 3 – маркер молекулярных масс Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); 4–6 – фракции, элюированные 20 мМ имидазола; 7–12 – фракции, элюированные промывкой колонки 60 мМ имидазола; 13 – фракция, элюированная промывкой колонки 500 мМ имидазола. Целевой белок показан стрелкой.

Fig. 1. Electropherogram of chromatographic fractions obtained during isolation of OprF/OprL chimeric protein from *E. coli* BL21(DE3) pLATE51-*oprF/oprL* cells by affinity chromatography on Ni⁺⁺-NTA-Sepharose (GE Healthcare, Sweden): 1 – cell pellet solubilized in 6 M urea; 2 – fraction eluted by washing the column with starting buffer; 3 – molecular weight marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA); 4–6 – fractions eluted with 20 mM imidazole; 7–12 – fractions eluted by washing the column with 60 mM imidazole; 13 – fraction eluted by washing the column with 500 mM imidazole. The target protein is shown by an arrow.

тирующей хроматографии в денатурирующих условия отражены на рис. 1, где представлены результаты электрофоретического анализа различных фракций, элюированных с сорбента (целевой белок показан стрелкой).

Элюция белка проходила в широком диапазоне концентраций имидазола (20–500 мМ). Поскольку во фракциях элюции присутствовали две мажорных полосы: одна с кажущейся молекулярной массой $65,6 \pm 0,23$ кДа, превышающей значение рассчитанной молекулярной массы химерного белка OprF/OprL, равной 58,7 кДа (548 а.о., pI 5,53), и вторая с кажущейся молекулярной массой $45,7 \pm 0,07$ кДа, то для проведения дальнейших этапов очистки объединенная фракция была ренатурирована диализом против буфера (5 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 20 мМ Трис, pH 7,9) для проведения повторного хроматографического разделения на сорбенте Ni⁺⁺-NTA-Сефарозе в неденатурирующих условиях. Элюированный препарат также содержал две мажорные белковые полосы, аналогичные по параметрам электрофоретической подвижности первоначальной фракции, что свидетельствует о наличии в белке с меньшей молекулярной массой последовательности из шести остатков гистидина. Примечательно, что молекулярная масса меньшей формы белка отличается от исходной на ~20 кДа, а молекулярная масса второго в последова-



Рис. 2. Электрофореграмма объединенной фракции очищенного белка OprF/OprL: 1 – маркер молекулярных масс Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); 2 – препарат очищенного ренатурированного OprF/OprL.

Fig. 2. Electropherogram of the combined fraction of purified OprF/OprL protein: 1 – molecular weight marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA); 2 – preparation of purified renatured OprF/OprL.

тельности белка OprL близка по значению к разнице между формами и составляет ~17 кДа. Это может свидетельствовать о вероятном протеолитическом отщеплении OprL от молекулы OprF/OprL и существовании в препарате белковой формы OprF с лидерной последовательностью pLATE51 с кажущейся молекулярной массой 45,7 кДа, близкой к расчетной 51 кДа.

После ренатурации степень чистоты суммарного белка с учетом присутствия двух молекулярных форм составила ~80% (рис. 2), а полученный белок был сорбирован на $Al(OH)_3$.

Очищенный и сорбированный на $Al(OH)_3$ белок был использован для двукратной иммунизации аутбредных мышей Swiss Webster. Через 14 дней после второй иммунизации у мышей проводили прижизненный забор крови для определения титра антител. Было показано, что у всех иммунизированных животных был индуцирован высокий титр специфических антител к химерному белку OprF/OprL, который составлял ~1/100 000.

Главная задача работы заключалась в том, чтобы показать, что полученный нами белок, являющийся основой предлагаемой нами кандидатной вакцины против синегнойной инфекции, способен оказывать протективное действие.

Ввиду невозможности моделирования инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, на иммунокомпетентных животных мы использовали модели летального синегнойного сепсиса (перитонита) и синегнойной инфекции мягких тканей бедра у мышей с индуцированным иммунодефицитом, предваритель-

но иммунизированных белком OprF/OprL, как описано в ранее [4]. После двукратной иммунизации OprF/OprL, введения иммунодепрессанта и заражения штаммом PAO-1 ($5 LD_{50}$) за животными осуществлялось тщательное ветеринарное наблюдение в течение нескольких дней. Бактериологический анализ крови у зараженных PAO-1 иммунизированных и контрольных мышей проводили через 12 ч, при этом все животные к этому сроку были живы. Анализ показал, что обсемененность крови у животных с перитонитом составляла ($M \pm SD$): $7,3 \pm 7$ КОЕ/мл у иммунных и $56,7 \pm 57,1$ КОЕ/мл у контрольных, а у животных с синегнойной инфекцией бедра – $200,8 \pm 186,4$ КОЕ/мл и $366,7 \pm 230,9$ КОЕ/мл соответственно. Однако достоверной разницы между группами иммунных и контрольных животных не было выявлено.

Однако важно подчеркнуть, что иммунизация предохраняла от гибели при последующем заражении по 5 животных из 15 в обеих экспериментальных группах (рис. 3). Таким образом, оценка протективных свойств гибридного белка OprF/OprL при заражении мышей штаммом *P. aeruginosa* PAO-1 дозой $5 LD_{50}$ показала, что иммунизация предохраняла от гибели 33% животных как при синегнойном сепсисе, так и при синегнойной инфекции мягких тканей бедра. При расчете достоверности в программе GraphPad Prism с использованием непараметрического обобщенного теста Гехана–Бреслоу–Вилкоксона уровень значимости различий между опытными и контрольными группами мышей p был равен 0,06 и 0,03 при перитоните и инфекции бедра соответственно.

Заключение

Таким образом, в данной работе нами изучен протективный потенциал кандидатной субъединичной вакцины против инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, основой которой является гибридный белок, состоящий из слитых иммуногенных белков OprF и OprL. Мы можем констатировать, что субъединичные вакцинные препараты могут быть достаточно полезными для защиты от синегнойной инфекции, учитывая высокую степень МЛУ *P. aeruginosa*.

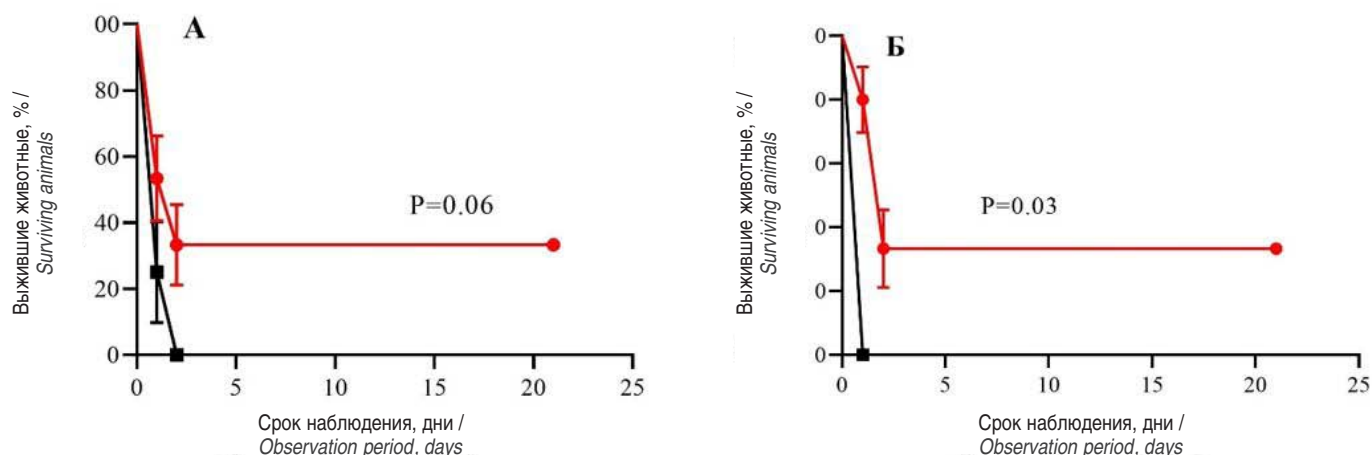


Рис. 3. Выживаемость мышей, иммунизированных химерным рекомбинантным белком OprF/OprL, после заражения штаммом *P. aeruginosa* PAO-1 при экспериментальной синегнойной инфекции. А – синегнойный перитонит; Б – бедренная синегнойная инфекция. ■ – контрольные мыши, ● – иммунные мыши.

Fig. 3. Survival of mice immunized with the chimeric recombinant protein OprF/OprL after infection with the *P. aeruginosa* strain PAO-1 during experimental *P. aeruginosa* infection. A – *P. aeruginosa* peritonitis; B – femoral *P. aeruginosa* infection. ■ – control mice, ● – immune mice.

Информация о финансировании

Работа поддержана проектом «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Financial support

The work is supported by the project “Sanitary shield of the country – safety for health (prevention, detection, response)”.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Егорова ОН, Брусина ЕБ, Григорьев ЕВ. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М.: Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (НП «НАСКИ»), 2014.
- Маркович НИ, Сергеев ВИ, Сарометов ЕВ, Кузнецова МВ, Карпунина ТИ, Авдеева НС, и др. Вспышка синегнойной инфекции среди новорожденных в отделении реанимации и интенсивной терапии. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010;52(3):5-10.
- Killough M, Rodgers AM, Ingram RJ. *Pseudomonas aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development. Vaccines. 2022;10:1100. DOI: 10.3390/vaccines10071100.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018 Mar;18(3):318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. Front Microbiol. 2019 Apr 1;10:539. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00539
- Калашин АА, Леонова ЕИ, Солдатенкова АВ, Михайлова НА. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016;71(1):5-10. DOI: 10.15690/vramn584
- Нго ТТ, Ленкхофф ГМ, Яклич А, и др. Иммуноферментный анализ: научное издание. Пер. с англ. Калугера СВ, Остермана АЛ. Под ред. Егорова АМ. М.: Изд-во Мир, 1988.
- Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВП, Вережкин ВВ, и др. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43
- Fito-Boncompagni L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. Infect Immun. 2011 Mar;79(3):1176-86. DOI: 10.1128/IAI.00850-10
- Bahey-El-Din M, Mohamed SA, Sheweita SA, Haroun M, Zaghloul TI. Recombinant N-terminal outer membrane porin (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* is a promising vaccine candidate against both *P. aeruginosa* and some strains of *Acinetobacter baumannii*. Int J Med Microbiol. 2020 Apr;310(3):151415. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151415
- Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. FEMS Microbiol Rev. 2017 Sep 1;41(5):698-722. DOI: 10.1093/femsre/fux020. PMID: 28981745
- Lim A, De Vos D, Brauns M, Mossialos D, Gaballa A, Qing D, et al. Molecular and immunological characterization of OprL, the 18 kDa outer-membrane peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology (Reading). 1997 May;143 (Pt 5):1709-1716. DOI: 10.1099/00221287-143-5-1709
- Gao C, Yang F, Wang Y, Liao Y, Zhang J, Zeng H, et al. Vaccination with a recombinant OprL fragment induces a Th17 response and confers serotype-independent protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. Clin Immunol. 2017 Oct;183:354-363. DOI: 10.1016/j.clim.2017.09.022
- Egorova ON, Brusina EB, Grigor'ev EV. Epidemiologiya i profilaktika sinegnoinoi infektsii. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. M.: Natsional'naya assotsiatsiya spetsialistov po kontrolyu infektsii, svyazannykh s okazaniem meditsinskoi pomoshchi (NP «NASKI»), 2014 (In Russian).
- Markovich NI, Sergeev VI, Sarmometov EV, Kuznetsova MV, Karpunina TI, Avdeeva NS, et al. Outbreak of Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa* in Intensive Care Department for Newborns. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2010;52(3):5-10. (In Russian).
- Killough M, Rodgers AM, Ingram RJ. *Pseudomonas aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development. Vaccines. 2022;10:1100. DOI: 10.3390/vaccines10071100.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018 Mar;18(3):318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. Front Microbiol. 2019 Apr 1;10:539. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00539
- Kaloshin AA, Leonova EI, Soldatenkova AV, Mihailova NA. Assessment Protective Properties of the Recombinant Complex of the Outer Membrane Protein F and the Toxoid of *Pseudomonas aeruginosa*. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2016;71(1):5-10. DOI: 10.15690/vramn584 (In Russian).
- Ngo TT, Lenkhoff GM, Yaklich A. i dr. Immuofermentnyi analiz: nauchnoe izdanie. Per. s angl. Kalugera SV, Ostermana AL. Pod red. Egorova AM. M.: Publ. Mir, 1988. (In Russian).
- Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. Bacteriology. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43 (In Russian).
- Fito-Boncompagni L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. Infect Immun. 2011 Mar;79(3):1176-86. DOI: 10.1128/IAI.00850-10
- Bahey-El-Din M, Mohamed SA, Sheweita SA, Haroun M, Zaghloul TI. Recombinant N-terminal outer membrane porin (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* is a promising vaccine candidate against both *P. aeruginosa* and some strains of *Acinetobacter baumannii*. Int J Med Microbiol. 2020 Apr;310(3):151415. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151415
- Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. FEMS Microbiol Rev. 2017 Sep 1;41(5):698-722. DOI: 10.1093/femsre/fux020. PMID: 28981745
- Lim A, De Vos D, Brauns M, Mossialos D, Gaballa A, Qing D, et al. Molecular and immunological characterization of OprL, the 18 kDa outer-membrane peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology (Reading). 1997 May;143 (Pt 5):1709-1716. DOI: 10.1099/00221287-143-5-1709
- Gao C, Yang F, Wang Y, Liao Y, Zhang J, Zeng H, et al. Vaccination with a recombinant OprL fragment induces a Th17 response and confers serotype-independent protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. Clin Immunol. 2017 Oct;183:354-363. DOI: 10.1016/j.clim.2017.09.022

References

Информация об соавторах:

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

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Гончарова Юлия Олеговна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Борзилов Александр Иосифович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Комабарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Tatiana B. Kravchenko, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Irina V. Bakhteeva, MD, PhD, Senior Researcher of Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Galina M. Titareva, MD, PhD, Senior Researcher of Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Yulia O. Goncharova, PhD in Biological Sciences, Researcher of Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Alexander I. Borzilov, MD, PhD, Leading Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Olga V. Korobova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Tatiana I. Kombarova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Псевдомонады противодействуют иммунитету, нарушая выработку энергии в макрофагах

Исследователи обнаружили, что бактерия *Pseudomonas aeruginosa* выделяют химическое вещество, которое подавляет выработку энергии в митохондриях макрофагов, тем самым ослабляя иммунный ответ.

2-аминоацетофенон (2-AA), является полезным биомаркером инфекций *Pseudomonas* в клинике, но макрофаги не поглощают и не утилизируют *P. aeruginosa* – энергоемкий процесс – в присутствии 2-AA. В опытах *in vitro* помощью флуоресцентного зонда было показано, что потребление кислорода снизилось в клетках, подвергшихся воздействию 2-AA, что показало, что более выгодный путь генерации энергии рухнул.

В опытах на мышах было показано, что штамм *P. aeruginosa*, у которого отсутствовал регулятор множественного фактора вирулентности (MvfR) – фактор транскрипции, необходимый для экспрессии ферментов, синтезирующих 2-AA, не вызывал падения уровня АТФ.

Поскольку бактерии *Pseudomonas* становятся все более устойчивыми к антибиотикам, исследователям необходимо разрабатывать различные типы терапевтических средств для их лечения. Микробиологи предположили, что 2-AA может служить новой мишенью для лекарств – препараты, блокирующие эффекты 2-AA, могут дать макрофагам импульс.

Помимо блокирования 2-AA для борьбы с бактериями, исследователи теоретически могли бы использовать его для предотвращения аутоиммунных заболеваний. При некоторых расстройствах, таких как ревматоидный артрит и волчанка, повышенная активность макрофагов усиливает воспаление. 2-AA – это молекула, которая по своей природе является противовоспалительной, и она может иметь потенциал в качестве иммунодепрессанта.



Pseudomonas Bacteria Escape Immunity by Disrupting Energy Production in Macrophages.
The Scientist Magazine® [Электронный ресурс].

URL: <https://www.the-scientist.com/pseudomonas-bacteria-escape-immunity-by-disrupting-energy-production-in-macrophages-72350> (дата обращения: 08.10.2024).