

КУЗНЕЦОВА ДАРЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

РОЛЬ СИДЕРОФОРА ПЕРСИННАХЕЛИНА В ФИЗИОЛОГИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

1.5.11- микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

кандидат химических наук

Подладчикова Ольга Николаевна

Официальные оппоненты:

Харсеева Галина Георгиевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии № 2, заведующий

Дентовская Светлана Владимировна – доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория микробиологии чумы, главный научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 20__ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Пименова Алена Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Железо – один из необходимых для жизни микроэлементов, который играет важную роль в процессах метаболизма, роста и пролиферации клеток. Оно является важным элементом и для патогенных бактерий, но в организме млекопитающих его доступность ограничена прочной связью с белками, которые выполняют функции неспецифической защиты хозяина от инфекций (Cassat J.E., Skaar E.P., 2013). Успешная колонизация патогенами макроорганизма и способность вызывать заболевание в значительной мере зависят от возможности ассимилировать железо (Ellermann M., Arthur J.C., 2017). Бактерии выработали различные способы получения железа, необходимого им для размножения в организме хозяина и реализации своих патогенных свойств. Одним из первых механизмов, включаемых бактериями на начальных этапах инфекции, является синтез и секреция в среду низкомолекулярных хелаторов железа – сидерофоров, извлекающих металл из комплексов с белками и доставляющих его бактериям с помощью специфичных для каждого сидерофора рецепторов на поверхности бактериальной клетки (Hider R.C., Kong X., 2010; Sah S., Singh R., 2015).

Понимание важности сидерофоров для патогенеза инфекционных заболеваний сделало их одним из активно изучаемых объектов в микробиологии патогенных микроорганизмов (Wilson B.R. et al., 2016; Khan A. et al., 2018; Kramer J. et al., 2020). За последние десятилетия получено огромное количество данных о структуре и путях метаболизма сидерофоров бактерий и грибов. Экспериментально доказано, что сидерофоры вносят существенный вклад в развитие инфекционного процесса и являются признанными факторами вирулентности, которые, помимо обеспечения бактерий железом, могут выполнять множество других функций. У разных сидерофоров обнаружена способность к поглощению других металлов, защите бактерий от тяжелых металлов и прооксидантов, а также к регуляции экспрессии генов. Они могут способствовать выживанию бактерий в сыворотке крови, препятствовать ассимиляции железа фагоцитами, стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов и даже служить секретлируемым токсином, разрушающим митохондрии фагоцитов (Arnold E., 2024). Многие патогены продуцируют несколько сидерофоров, которые выполняют разные функции, активны в отношении разных источников железа в организме хозяина и на разных этапах инфекции (McRose D.L. et al., 2018). В литературе накапливается все больше данных о том, что способность патогенных бактерий продуцировать несколько сидерофоров коррелирует с тяжестью вызываемого патогенами заболевания. Предполагается, что комбинация различных сидерофоров определяет «репликативные ниши» патогена и модулирует реакцию хозяина на инфекцию (Holden V., Bachman M.A., 2015).

Степень разработанности темы исследования

Значимость сидерофоров для вирулентности бактерий была подтверждена, в том числе, на модели возбудителя чумы. Известно, что патогенные штаммы *Yersinia pestis* способны синтезировать сидерофор иерсиниабактин (Ybt), который кодируется островом высокой

патогенности, расположенным в нестабильном хромосомном *pgm*-локусе (Perry R.D., 2011). Доказано, что иерсиниабактин не только участвует в процессах усвоения железа бактериями при 37°C, но и играет важную роль в их устойчивости к защитным механизмам организма млекопитающих.

Долгое время считалось, что иерсиниабактин является единственным сидерофором *Y. pestis* (Forman et al., 2010). Однако данные секвенирования геномов *Y. pestis* выявили наличие генов, отвечающих за биосинтез других сидерофоров. Анализ транскриптомных данных подтвердил, что эти гены экспрессируются как *in vitro*, так и *in vivo* (Rakin et al., 2012). Вместе с тем, сами сидерофоры не были выделены и охарактеризованы.

Исследования, проведенные в нашем институте (Podladchikova et al., 2011; 2012), выявили, что помимо иерсиниабактина, *Y. pestis* синтезирует еще один сидерофор — иерсиниахелин (Ych), который кодируется генами хромосомного *usu* локуса. До настоящего исследования не было известно, является ли иерсиниахелин специфичным для *Y. pestis* и какую функцию он выполняет в физиологии возбудителя чумы: участвует ли в поглощении железа или выполняет иную роль, характерную для сидерофоров.

Таким образом, имеющиеся данные о иерсиниахелине демонстрируют, что изучение этого сидерофора является актуальным и перспективным.

Цель исследования

Изучение специфичности и роли сидерофора иерсиниахелина в физиологии возбудителя чумы.

Задачи исследования

1. Биоинформационный анализ генов *usu* локуса, кодирующих биосинтез и транспорт иерсиниахелина у разных штаммов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*.
2. Анализ возможности использования различий в структуре *usu* локуса *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* и конструирование праймеров для дифференциации иерсиний методом ПЦР *in silico* и *in vitro*.
3. Сравнение экспрессии иерсиниахелина рекомбинантными штаммами кишечной палочки, содержащими опероны биосинтеза этого сидерофора из *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.
4. Получение рекомбинантных штаммов кишечной палочки и изогенных вариантов чумного микроба, различающихся по уровню продукции иерсиниахелина. Анализ функциональной роли иерсиниахелина в бактериях кишечной палочки и возбудителя чумы.
5. Изучение действия изогенных вариантов штамма *Y. pestis* EV76, различающихся по продукции иерсиниахелина, на организм животных.

Научная новизна

Впервые проведен детальный сравнительный анализ генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина, расположенных в хромосомном *usu* локусе, показана их

специфичность для бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* и выявлены структурные отличия в терминаторах транскрипции оперонов, отвечающих за биосинтез иерсиниахелина у разных штаммов двух видов иерсиний.

На основе нуклеотидных последовательностей генов *usu* локуса предложены праймеры, позволяющие проводить внутривидовую дифференциацию штаммов *Y. pseudotuberculosis* методом ПЦР *in silico* и *in vitro*. С помощью этих праймеров штаммы возбудителя псевдотуберкулеза можно разделить на четыре геногруппы по длине ампликона: 292-257-239-204 п.н. Установлено, что фрагмент 204 п.н. характерен для всех исследованных в работе штаммов *Y. pseudotuberculosis* O:1b серотипа, выделенных во время 7 вспышек псевдотуберкулеза в разных регионах нашей страны на протяжении 40 лет (с 1981 по 2021 г.).

Разработана и зарегистрирована компьютерная программа «SiderophoreAnalyzer – программа для выявления генов, отвечающих за синтез сидерофоров, в полногеномных нуклеотидных последовательностях энтеробактерий» (свидетельство о регистрации от 03.11.2022 г.).

Впервые с помощью методов молекулярного клонирования доказано, что сидерофор иерсиниахелин кодируется функционально активными генами *usu* локуса бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Сконструированы три рекомбинантные плазмиды, содержащие гены биосинтеза иерсиниахелина (pSC-A-KIM, pSC-A-YPIII, pSC-A-5EV), и с их помощью продемонстрирована экспрессия этого сидерофора в гетерологичном хозяине *E. coli* H1884ΔentDF, не синтезирующем собственные сидерофоры (Патент № 2670949 от 25.10.2018 г.).

Установлено, что структура терминатора транскрипции *usu* локуса влияет на экспрессию иерсиниахелина. Для этого штамм *E. coli* H1884ΔentDF трансформирован рекомбинантными плазмидами pSC-A-KIM и pSC-A-YPIII, содержащими ПЦР-копии оперонов биосинтеза иерсиниахелина штаммов *Y. pestis* KIM и *Y. pseudotuberculosis* YPIII, и на индикаторной среде показаны различия в экспрессии сидерофора.

Впервые проведен анализ функциональной активности иерсиниахелина в бактериях чумного микроба путем сравнения трех вариантов вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1), различающихся по продукции иерсиниахелина: родительского штамма *Y. pestis* EV76, его мутанта, не продуцирующего этот сидерофор, а также мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина. На модели этих штаммов показано участие иерсиниахелина в процессах ассимиляции железа и защите бактерий от токсического действия реактивных форм кислорода. При температуре 26°C в условиях дефицита железа иерсиниахелин секретируется в окружающую среду, способствуя усвоению железа бактериями, при температуре 37°C он остается внутри клеток, защищая их от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. У иерсиниахелина выявлено новое для сидерофоров свойство – способность стимулировать образование геморрагий в организме хозяина, которое не было обнаружено у других сидерофоров.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведенного исследования расширяют представление о роли бактериальных сидерофоров и представляют фундаментальную основу для дальнейшего изучения роли иерсиниахелина в патогенезе чумы и псевдотуберкулеза как одного из факторов вирулентности.

Получение препаративных количеств и расшифровка структуры иерсиниахелина открывают перспективы создания конъюгатов этого сидерофора с различными антибиотиками. Конструирование подобных противомикробных препаратов нового поколения, избирательное действие которых обусловлено специфичностью рецепторов сидерофоров на поверхности бактерий, на сегодняшний день является одним из направлений борьбы с антибиотикорезистентными микробами.

Сконструированная плаزمида pSC-A-5EV, содержащая гены биосинтеза иерсиниахелина штамма *Y. pestis* EV76 без промоторной области и Fur-боксов, ответственных за регуляцию биосинтеза иерсиниахелина железом, может быть использована для получения чистого препарата этого сидерофора из гетерологичных рекомбинантных штаммов и изучения его структуры и физико-химических свойств.

Получены два рекомбинантных штамма *Y. pestis* EV76, один из которых содержит делецию генов биосинтеза иерсиниахелина (*Y. pestis* KM1933), а другой (*Y. pestis* KM1986) – плазмиду с генами его биосинтеза под контролем векторного промотора. Оба штамма депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и могут быть использованы с целью дальнейшего изучения функциональных свойств иерсиниахелина в бактериях чумного микроба.

Разработанные праймеры, позволяющие проводить внутривидовую дифференциацию штаммов *Y. pseudotuberculosis*, предлагается использовать в эпидемиологическом надзоре для отслеживания популяционной структуры возбудителя псевдотуберкулеза на территории Российской Федерации.

Компьютерная программа «SiderophoreAnalyzer – программа для выявления генов, отвечающих за синтез сидерофоров, в полногеномных нуклеотидных последовательностях энтеробактерий» дает возможность оценить наличие и разнообразие в геномах бактерий сидерофор-зависимых систем ассимиляции железа. Программа внедрена в оперативную работу ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 10.10.2024 г.) и ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» (акт внедрения от 10.10.2024 г.).

Материалы диссертации используются в педагогическом процессе в отделе профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в программе профессиональной переподготовки для врачей и биологов «Бактериология. Основы безопасной работы с ПБА I-II групп

патогенности» и циклах повышения квалификации «Природно-очаговые и другие опасные зоонозные инфекционные болезни», «Выявление и типирование возбудителей инфекционных болезней с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)» (акт внедрения от 25.09.2024 г.).

Методология и методы исследования

Методология исследования спланирована согласно поставленной цели. В качестве методологической основы диссертационной работы выступали общепринятые протоколы и методики, описанные в специализированных источниках информации. В исследовании использованы бактериологические, молекулярно-генетические, биоинформационные, биохимические и биологические методы. При работе с лабораторными животными соблюдались все международные и институциональные принципы ухода и использования животных, о чем свидетельствует протокол от 02.04.2019 г. № 8А заседания комиссии по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Материалы исследования

В работе использованы 55 штаммов *Y. pestis* (36 - основного подвида, 19 - неосновных подвигов) и 100 штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Все штаммы были выделены на различных территориях в разное время и получены из музейных коллекций лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, ФБУН Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Мюнхенского института гигиены и медицинской микробиологии им. Макса фон Петтенкофера.

Молекулярное клонирование генов биосинтеза иерсиниахелина и отбор клонов, содержащих рекомбинатные плазмиды, проведены в штамме *E. coli* Strata. Для экспрессии рекомбинантного иерсиниахелина и анализа его свойств использован штамм *E. coli* H1884*ΔentDF* (получен от д-ра А. Ракина, Германия). Данный штамм генетически модифицирован таким образом, что не способен синтезировать энтеробактин – собственный сидерофор *E. coli* – ввиду делеции генов *entD* и *entF*.

Для получения ПЦР-копии генов биосинтеза иерсиниахелина чумного и псевдотуберкулезного микробов использовали хромосомную ДНК, выделенную из штаммов *Y. pestis* KIM и *Y. pseudotuberculosis* YPIII.

Методы исследования

Бактериологические методы

Штаммы иерсиний и кишечной палочки культивировали при температурах 26° и 37°C на плотных и жидких питательных средах: LB (DIFCO, США), NB (DIFCO, США), TA (DIFCO, США), среде Хоттингера (рН 7,2, производство ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) и минимальной среде M9 (Miller J. H., 1976). Анализ сидерофорной активности

проводили на универсальной индикаторной среде, разработанной для выявления продукции сидерофоров разными видами бактерий (Schwyn B. et al., 1987).

Биоинформационные методы

Биоинформационный анализ *usi* локуса иерсиний проводили при использовании полных нуклеотидных последовательностей 583 штаммов *Y. pestis* и 303 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Геномы бактерий анализировали с помощью компьютерной программы BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также авторского скрипта. Выявление генетических кластеров, кодирующих разные сидерофоры, проводили при использовании программы «SiderophoreAnalyzer», которая была разработана в настоящем исследовании. Конструирование олигонуклеотидных праймеров, комплементарных различным участкам *usi* локуса, проводилось на основе нуклеотидной последовательности *usi* кластера штамма *Y. pestis* CO92 с помощью компьютерной программы BLAST.

Молекулярно-генетические методы

Получение ПЦР-копий оперонов биосинтеза иерсиниахелина, включающих промоторные и терминаторные последовательности из штаммов *Y. pestis* KIM и *Y. pseudotuberculosis* YPIII, осуществлялось с использованием праймеров *usu F/R*, хромосомной ДНК, выделенной из этих штаммов, и ДНК-полимеразы Pfu (Promega Corporation, США), которая совершает минимальное количество ошибок при амплификации.

На матрице хромосомной ДНК, выделенной из штамма *Y. pestis* EV76, была получена ПЦР-копия четырех генов биосинтеза иерсиниахелина (аналогов *upo1529-upo1532*). Фрагменты ДНК, содержащие ПЦР копии генов биосинтеза иерсиниахелина, визуализировали в 0,8% агарозном геле и экстрагировали из геля с помощью набора для выделения и очистки ДНК AXYPrep (AXYGEN BIOSCIENCES, США).

Конструирование рекомбинантных плазмид проводили при использовании ПЦР-копий генов биосинтеза иерсиниахелина, полученных на матрице хромосомной ДНК штаммов *Y. pestis* KIM, *Y. pseudotuberculosis* YPIII и *Y. pestis* EV76. Очищенные фрагменты ДНК, содержащие эти копии, были лигированы с плазмидным вектором в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя набора для клонирования ПЦР-продуктов StrataClone (Stratagene, США). Плазмида pSC-A-amp/kan, используемая в этом наборе в качестве вектора, содержит ген α -пептида β -галактозидазы (*lacZ*) и участки для клонирования фрагментов ДНК. Полученными рекомбинантными плазмидами, а также векторной ДНК, трансформировали штаммы *E. coli* H1884 Δ entDF, *Y. pestis* EV76 и его мутант, не продуцирующий иерсиниахелин. Для работы со штаммом кишечной палочки был выбран метод химической трансформации с использованием 0,1 М раствора CaCl₂, а штаммы *Y. pestis* трансформировали методом электропорации.

Полногеномное секвенирование

Нуклеотидные последовательности штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* были определены с помощью метода высокопроизводительного секвенирования при использовании технологической платформы MiSeq (Illumina, www.illumina.com). Для приготовления библиотек использовали коммерческий набор Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina). Полногеномное секвенирование штаммов проводили на платформе MiSeq (Illumina) и MiniIon (Oxford Nanopore) по технологиям, описанным в протоколах фирм-производителей. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades (github.com).

Биохимические методы

Для доказательства продукции иерсиниахелина клетками *E. coli* было проведено сравнение препаратов, выделенных из контрольного и рекомбинантного штаммов с помощью методики выделения сидерофоров гидроксаматного типа (Payne S. M., 1994). Препараты анализировали с помощью восходящей тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах силикагеля с пришитой фазой СЗ (Плазмохром RP3, МПО “Манометр”, Россия). В качестве мобильной фазы использовали 60% этанол. Хроматограммы проявляли с помощью паров йода.

Биологические методы

В работе использованы 120 беспородных белых мышей обоих полов (весом 18 – 20 г в возрасте 6 недель), которые были получены из питомника ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и содержались согласно ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». На все эксперименты получено положительное заключение Комиссии по биомедицинской этике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов проводили с применением программных пакетов Biostatistica и Statistica 7.0. Для визуализации полученных данных использовали Microsoft Office Excel.

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора состоит в анализе отечественной и зарубежной литературы и выполнении основного объема экспериментальной работы (бактериологические, молекулярно-генетические, биологические и биохимические исследования). Секвенирование и биоинформационный анализ штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* проводили совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций А.С. Водопьяновым, ведущим научным сотрудником лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций А.Л. Трухачевым. Конструирование плазмид, получение

рекомбинантных штаммов и изучение свойств иерсиниахелина выполняли совместно с научным сотрудником лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций В.А. Рыковой.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оперон биосинтеза иерсиниахелина имеет высоко консервативную структуру у штаммов возбудителя чумы, принадлежащих к разным подвидам и биоварам и выделенных в разные годы в различных очагах чумы, но различается по структуре терминатора транскрипции у разных штаммов псевдотуберкулезного микроба, что может быть использовано для внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis* с помощью ПЦР.

2. Иерсиниахелин обладает функциональной активностью в клетках возбудителя чумы: при 26°C в условиях дефицита железа он выделяется в среду и участвует в ассимиляции бактериями этого микроэлемента, а при 37°C, накапливаясь внутри бактериальных клеток, проявляет антиоксидантные свойства.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в рамках плановых научных тем: № 191-3-17 «Изучение неизвестных механизмов и факторов, участвующих в реализации патогенных свойств возбудителя чумы», № 210-3-19 «Генотипирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* с применением INDEL-маркеров», № 225-3-21 «Внутривидовое генотипирование штаммов возбудителей чумы и туляремии».

Диссертация апробирована на заседании ученого совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 11 от 18.10.2024 г.).

Материалы диссертации представлены на следующих конференциях различного уровня: 16th Medical Biodefense Conference (г. Мюнхен, 28-31 октября 2018 г.), II Региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы медицинской микробиологии на современном этапе» (г. Ростов-на-Дону, 22 декабря 2018 г.), XII Ежегодном Всероссийском интернет-конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (7-9 сентября 2020 г.), XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (г. Ростов-на-Дону, 21–22 октября 2020 г.), Межучрежденческих онлайн конференциях «Совершенствование молекулярно-генетических методов индикации и идентификации возбудителей природно-очаговых и зоонозных инфекций, актуальных для юга европейской части России» (30 марта 2021г., 21 февраля 2023 г.), Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения» (г. Ростов-на-Дону, 9-10 сентября 2021 г.), Международном симпозиуме «*Yersinia 14*» (г. Санкт-Петербург, 26-28 сентября 2022 г.), XV Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (г. Москва, 27-29 февраля 2023 г.).

Публикация результатов исследований

Материалы исследований отражены в 11 научных работах, из них 3 в рецензируемых научных изданиях, 2 – в других изданиях и 4 в материалах конференций (тезисы), 1 патент на изобретение, 1 программа для ЭВМ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах, состоит из введения, главы обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения и выводов, иллюстрирована 7 таблицами и 20 рисунками. Библиография содержит ссылки на 210 публикаций (в том числе 12 работ отечественных и 198 зарубежных авторов).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина

Биоинформационный анализ *usi* локуса

Биоинформационный анализ *usi* локуса *Y. pestis* CO92 показал наличие в нем двух оперонов (Рисунок 1). В одном находится ген ферриредуктазы (*upo1528*), а также четыре гена (*upo1529-1532*), которые кодируют белки, участвующие в синтезе иерсиниахелина. Второй оперон (*upo1533-1537*) содержит гены, отвечающие за транспорт внутрь бактерий этого сидерофора, нагруженного железом. Структурным генам, отвечающим за биосинтез Ych , предшествует некодирующая область, содержащая регуляторные последовательности: промотор, включающий сайты узнавания и связывания РНК-полимеразы, и три сайта узнавания Fur белка (Fur box), отвечающего за регуляцию биосинтеза иерсиниахелина железом.

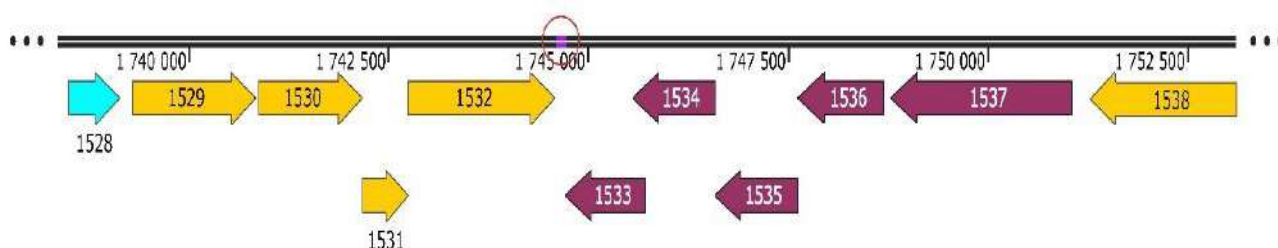


Рисунок 1 – Структура *usi* локуса, содержащего гены, которые кодируют синтез и транспорт Ych в штамме *Y. pestis* CO92

Примечание:

Желтым цветом обозначены гены биосинтеза Ych , бордовым цветом – гены, кодирующие транспорт Ych , голубым – ген ферриредуктазы

Опероны биосинтеза и транспорта иерсиниахелина разделены некодирующей межгенной областью, которая содержит терминатор транскрипции обоих оперонов. Анализ участков генома в данной области, которая может соответствовать терминатору транскрипции (Peters J.M. et al., 2011; Ray-Soni A. et al., 2016), не выявил признаков, характерных для Rho-независимых терминаторов. Отсутствуют GC-богатые палиндромные последовательности, способные образовывать шпильчатые структуры, а также поли-Т и поли-С кластеры, которые могут быть узнаны Rho-фактором

терминации транскрипции (*rut*-сайты). О том, что Rho-зависимые терминаторы могут не содержать типичных *rut*-сайтов, свидетельствуют экспериментальные данные, которые показали, что в этом случае Rho может осуществлять терминацию транскрипции с помощью дополнительных белковых факторов, таких как NusA и NusG.

Хотя в межгенной области *usu* локуса двух видов иерсиний отсутствуют *rut*-сайты, она содержит сигналы, характерные для Rho-зависимых терминаторов транскрипции. Так, она не содержит палиндромов, которые образуют шпильчатые структуры, и в ней располагаются два А-Т-богатых восьмичленных повтора сразу за стоп-кодоном последнего гена (*upo* 1532) оперона биосинтеза иерсиниахелина. Более того, в ней имеются равномерно распределенные динуклеотидные повторы пиримидиновых нуклеотидов (5'CC/UC), которые на основе анализа транскриптов большого числа различных оперонов предложено использовать в качестве структурных дискриминаторов, позволяющих выявлять Rho-зависимые терминаторы транскрипции (Nadiras C. et al., 2018). Наличие вышеописанных структурных характеристик межгенной области, разделяющей опероны биосинтеза и транспорта иерсиниахелина, позволяет заключить, что она является Rho-зависимым терминатором транскрипции обоих оперонов *usu* кластера (*usu*-терминатором).

Анализ специфичности генетических детерминантов иерсиниахелина

Поиск аналогов *usu* локуса в базе данных NCBI среди гетерологичных бактерий с помощью программы BLAST показал, что частичную гомологию с ним имеют только гены биосинтеза сидерофора алкалигина бордетелл. Генетические детерминанты иерсиниахелина выявлялись абсолютно во всех проанализированных геномах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Также гены *Ych* определялись в геномах двух видов иерсиний и при использовании компьютерной программы «SiderophoreAnalyzer». Эта программа позволяет проводить быстрый анализ результатов полногеномного секвенирования бактерий и выявлять в них гены биосинтеза и рецепторов различных сидерофоров, в том числе и тех, которые встречаются у иерсиний (аэробактин, иерсиниабактин, иерсиниахелин, пестибактин/псевдохелин). Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности кластеров, кодирующих биосинтез и транспорт *Ych* в разных штаммах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, показал, что все гены этих кластеров имеют высокую степень гомологии (98-99%), что может свидетельствовать об эволюционной стабильности генов и важности *Ych* для этих двух видов иерсиний.

Несмотря на значительное сходство структурных генов, отвечающих за синтез иерсиниахелина, нуклеотидные последовательности *usu*-терминатора имеют различия у двух видов иерсиний. Как выяснилось, структура *usu*-терминатора идентична у всех исследованных штаммов *Y. pestis*, а у разных штаммов *Y. pseudotuberculosis* она содержит тандемные повторы нуклеотидов, различающиеся по количеству копий (Рисунок 2).

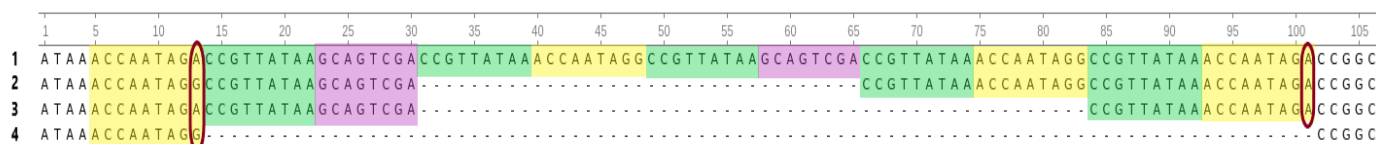


Рисунок 2 – Фрагмент *usi*-терминатора оперона биосинтеза иерсиниахелина

Таким образом, было установлено наличие вариабельных тандемных повторов (VNTR - variable number tandem repeats) в терминаторной области *usi* локуса.

Клонирование генов биосинтеза иерсиниахелина из штаммов Y. pestis KIM и Y. pseudotuberculosis YPIII в клетках кишечной палочки

Структурные вариации терминатора транскрипции в *usi* локусе иерсиний могут оказывать влияние на эффективность экспрессии генов, отвечающих за биосинтез иерсиниахелина. Это, в свою очередь, может определять уровень продукции этого сидерофора у возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. Для того, чтобы экспериментально подтвердить или опровергнуть это предположение, были сконструированы две рекомбинантные плазмиды. Каждая из них содержала копии оперонов биосинтеза иерсиниахелина. В состав первой рекомбинантной плазмиды входили гены биосинтеза этого сидерофора штамма *Y. pestis* KIM, вторая содержала аналогичные гены из штамма *Y. pseudotuberculosis* YPIII. Амплифицированные копии оперонов биосинтеза иерсиниахелина двух исследуемых штаммов помимо структурных генов (аналоги *upo1528-1532* у штамма *Y. pestis* CO92) включали промоторные и терминаторные области, регулирующие экспрессию этих оперонов. Длина фрагментов составила 6757 п.н. для штамма KIM и 6775 п.н. для YPIII, причём различие обусловлено длиной терминаторной области, которая отличалась на 18 п.н.

Копии оперонов биосинтеза иерсиниахелина иерсиний были клонированы в клетках кишечной палочки при использовании набора для клонирования фрагментов ДНК, полученных с помощью ПЦР (Stratagene, США), в составе плазмидного вектора pSC-A-amp/kan. Рекомбинантные плазмиды (pSC-A-KIM и pSC-A-YPIII), содержащие целевые фрагменты, выделяли из клеток *E. coli* Strata. Введение плазмид pSC-A-KIM и pSC-A-YPIII в экспериментальный штамм *E. coli* H1884ΔentDF, утративший способность к синтезу собственного сидерофора энтеробактина, позволило выявить существенную разницу в экспрессии иерсиниахелина. Анализ роста обоих штаммов на индикаторной среде, предназначенной для обнаружения сидерофоров, показал, что оперон штамма YPIII обуславливает значительно более высокую экспрессию иерсиниахелина по сравнению с опероном штамма KIM (Рисунок 3). Полученные данные свидетельствуют о влиянии различий в структуре терминатора *usi* локуса двух видов иерсиний на экспрессию генов, входящих в оперон биосинтеза иерсиниахелина.

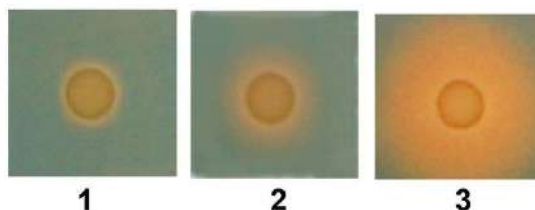


Рисунок 3 – Сидерофорная активность трех вариантов штамма *E. coli* H1884 Δ entDF

Примечание:

1. Штамм, трансформированный векторной плазмидой pSC-A-amp/kan
2. Штамм, трансформированный рекомбинантной плазмидой pSC-A-KIM
3. Штамм, трансформированный рекомбинантной плазмидой pSC-A-YPIII

Хотя до недавнего времени молекулярные механизмы, лежащие в основе различной эффективности терминаторов транскрипции, не были известны, уже начинают появляться сведения о влиянии структуры терминаторов на транскрипцию контролируемых ими генов. О влиянии структуры Rho-зависимых терминаторов на уровень синтеза мРНК свидетельствуют недавние данные (Chhakchhuak P.I.R., Sen R., 2022), которые показали, что для эффективной терминации транскрипции необходимо перемещение Rho-фактора по 3'-концевой области мРНК (которая и представляет собой терминатор). И в этом случае длина *usu*-терминатора, которая больше у *Y. pseudotuberculosis* по сравнению с *Y. pestis*, может влиять на уровень экспрессии *Ych*. Однако нельзя исключить, что большее количество VNTR, роль которых в функционировании терминаторов в настоящее время неизвестна, также могут вносить определенный вклад в повышенную экспрессию *Ych* бактериями *Y. pseudotuberculosis*. Вероятно, активная продукция *Ych* возбудителем псевдотуберкулеза может иметь важное значение для микроба, большинство штаммов которого не продуцирует *Ybt* или имеет его сниженную экспрессию по сравнению с возбудителем чумы (Ракин А., 2017).

Полученные результаты указывают на то, что вариации числа VNTR в области *usu*-терминатора могут не только оказывать влияние на эффективность экспрессии иерсиниахелина различными штаммами *Y. pseudotuberculosis*, но и представлять собой потенциальные маркеры для генотипирования псевдотуберкулезного микроба.

Генотипирование иерсиний с помощью VNTR-маркеров, расположенных в usu-терминаторе

С целью выявления VNTR-маркеров у разных штаммов иерсиний сконструированы праймеры (*usu-interF/R*), которые комплементарны константным областям, обрамляющим переменные участки терминаторной области. Эти праймеры позволяли различать штаммы по величине образующегося при проведении ПЦР ампликона. Для анализа геномов иерсиний с помощью ПЦР *in silico* применяли авторский скрипт, определяющий величину виртуального ампликона, полученного на матрице ДНК иерсиний при использовании праймеров *usu-interF/R*. Исследование геномов 583 штаммов *Y. pestis*, доступных в базе данных NCBI, показало, что все штаммы, выделенные в разные годы в разных регионах мира, несмотря на принадлежность к разным

подвидам и биоварам, давали одинаковую длину ампликона (239 п.н.). Более того, полученные ампликоны не отличались и по нуклеотидной последовательности, что, наряду с консервативностью генов, кодирующих биосинтез и транспорт *Ych*, указывает на эволюционную стабильность структуры *usu* локуса чумного микроба, даже в области, содержащей VNTR. Эти результаты позволяют предположить, что стабильность *usu*-терминатора чумного микроба имеет какую-то функциональную нагрузку.

В то же время использование праймеров *usu-interF/R* для анализа 303 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI с помощью ПЦР *in silico* показало, что штаммы различались по длине ампликона (292-257-239-204 п.н.). Для того чтобы определить, связаны ли различия в величине ампликонов, полученных с разными штаммами *Y. pseudotuberculosis*, с их серопринадлежностью, был проведен анализ серотипов исследованных штаммов. Поскольку сведения о серотипах большинства этих штаммов в базе данных отсутствуют, серотип штаммов был определен на основе их геномов в ПЦР *in silico* с помощью метода гено-серотипирования (Bogdanovich T. et al., 2003). При таком анализе геномов серотип удалось определить только у 154 штаммов, большинство из которых принадлежат к серотипам O:1a и O:1b, но в небольшом количестве в базе представлены и штаммы O:2-O:5 серотипов.

Исследованные нуклеотидные последовательности штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью праймеров *usu-interF/R in silico* разделились на 4 группы по длине ампликона. Первая группа давала фрагмент 292 п.н. и была представлена 22 штаммами, у шести из которых с помощью гено-серотипирования определена принадлежность к серотипу O:1a. Вторая группа оказалась самой многочисленной, 221 штамм из 303 имел одинаковый размер (257 п.н.) ампликона. Семь штаммов *Y. pseudotuberculosis* O:2b серотипа образовывали ампликон 239 п.н. и вошли в третью группу. Любопытно, что ампликон идентичного размера был обнаружен у всех использованных в работе штаммов *Y. pestis*, принадлежащих к различным подвидам и биоварам. Четвертая группа представлена 26 штаммами *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b, имеющими длину ампликона 204 п.н.

Праймеры *usu-interF/R* были синтезированы, и с их помощью проведено генотипирование методом ПЦР *in vitro* штаммов двух видов иерсиний, имеющихся в нашем распоряжении: 55 шт. *Y. pestis* и 100 шт. *Y. pseudotuberculosis* (Таблица 1).

Результаты исследования подтвердили, что все использованные в работе штаммы псевдотуберкулезного микроба делятся по размеру ампликона на четыре большие геногруппы: 292-257-239-204 п.н. Соответствие длины ампликона, определенной в ПЦР *in vitro*, результатам, полученным в ПЦР *in silico*, было подтверждено после секвенирования 52 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, имеющихся в нашем распоряжении.

Таблица 1 – Результаты анализа штаммов иерсиний в ПЦР с праймерами *usu-interF/R*, комплементарными фланкирующим последовательностям терминаторной области *usu* локуса

Распределение штаммов по группам	Количество штаммов для анализа <i>in silico</i>	Количество штаммов для анализа <i>in vitro</i>	Длина ампликона
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>			
Серотип неизвестен	154	11	292-257-239-204
Серотип O:1a	6	3	292
	29	1	257
Серотип O:1b	47	3	257
	26	63	204
Серотип O:2a	11	2	257
Серотип O:2b	7	2	239
	-	1	204
Серотип O:2c	-	1	204
Серотип O:3	14	4	257
Серотип O:4a	3	5	257
Серотип O:4b	4	1	257
Серотип O:5a	2	3	257
<i>Yersinia pestis</i>			
Основной подвид	583	36	239
Неосновные подвиды		19	239

Обращает на себя внимание тот факт, что 63 штамма *Y. pseudotuberculosis* O:1b серотипа, выделенных во время 7 вспышек псевдотуберкулеза в разных регионах нашей страны на протяжении 40 лет и исследованных *in vitro*, имеют фрагмент 204 п.н. Аналогичный размер ампликона имеют штаммы «дальневосточной группы», выделенные от людей в Иркутской области и в Приморском крае. Такие штаммы обладают наибольшим эпидемическим потенциалом среди всех известных штаммов *Y. pseudotuberculosis* и являются этиологическими агентами Дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (Somova L.M. et al., 2020).

Таким образом, проведенное исследование показало, что VNTR-маркеры, выявленные в структуре *usu*-терминатора, могут быть использованы для внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis* с помощью ПЦР *in vitro* и *in silico*.

Анализ функциональных свойств иерсиниахелина

Изучение функциональных свойств иерсиниахелина было проведено как на модели кишечной палочки, так и чумного микроба, при использовании рекомбинантной плазмиды, содержащей гены биосинтеза этого сидерофора и обеспечивающей его экспрессию.

Изучение функциональных свойств иерсиниахелина в клетках кишечной палочки

Для создания рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей экспрессию иерсиниахелина, использован набор для клонирования ПЦР-продуктов StrataClone (Stratagene, США). ПЦР-

амплифицированная копия четырех генов, участвующих в биосинтезе иерсиниахелина (гомологи *upo1529-1532*) была лигирована с плазмидным вектором pSC-A-amp/kan(4,3 тыс. п.н.) (Рисунок 4 А, В).

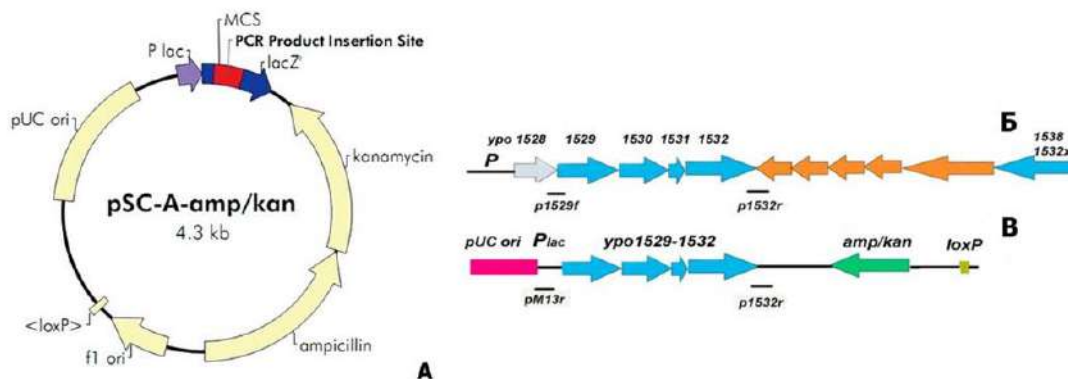


Рисунок 4 – Клонирование генов биосинтеза иерсиниахелина в плазмидном векторе pSC-A-amp/kan

Примечание:

А. Генетическая карта плазмидного вектора

Б. Генетическая карта *ysi* локуса

В. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pSC-A-5EV

Амплификация целевой последовательности была осуществлена с применением специфических праймеров *p1529F* и *p1532R*. В качестве матрицы была использована хромосомная ДНК вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 (Рисунок 4 Б). Полученный фрагмент ДНК длиной 5,63 тыс. п.н. не включал в себя регуляторные элементы, такие как промотор и оператор, взаимодействующий с репрессором Fur, который отвечает за подавление биосинтеза иерсиниахелина при избытке железа. Кроме того, в амплифицированном фрагменте отсутствовали гены, кодирующие белки, участвующие в поглощении и транспорте комплекса иерсиниахелина с железом в бактериальную клетку, а также ген ферри-редуктазы (*upo1528*), осуществляющей высвобождение железа из сидерофора внутри клетки. В результате клонирования ПЦР-фрагмента в векторе pSC-A-amp/kan сконструирована рекомбинантная плазмида pSC-A-5EV, трансформация которой штамма *E. coli* H1884Δ*entDF* позволила получить штамм-продуцент иерсиниахелина, а в результате трансформации векторной плазмидой – контрольный штамм. Рекомбинантная плазмида, содержащая гены биосинтеза Ych под контролем векторного промотора P_{lac}, активность которого не зависит от наличия в среде железа, была использована в дальнейшей работе для экспрессии Ych в клетках кишечной палочки.

Анализ двух штаммов *E. coli*, выращенных при разных температурах (26°C и 37°C) на среде LB, выявил значительные различия между ними по морфологии колоний (Рисунок 5). Так, в отличие от контрольного штамма, рекомбинантный штамм образовывал колонии, внутри которых наблюдался коричневый преципитат, наиболее выраженный при 37°C. Можно предположить, что эта особенность является следствием накопления внутри клеток сидерофора, связанного с железом.

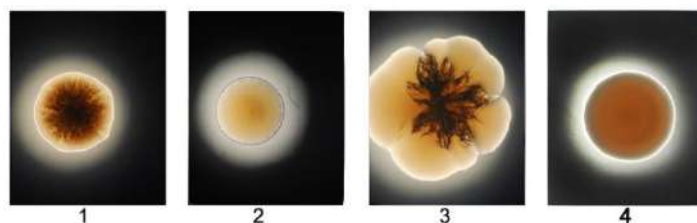


Рисунок 5 - Морфология колоний штамма *E. coli* H1884 Δ entDF, содержащего рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1,3) и векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (2, 4)

Примечание:

Бактерии выращивали в течение 48 ч на плотной питательной среде LB при температуре 26°C (1, 2) и 37°C (3, 4). (Микроскоп Nikon E200-F с регистрацией изображения, увеличение 4x0,10)

Бактерии выращивали в течение 48 ч на плотной среде LB при температуре 26°C (1, 2) и 37°C (3, 4)

Продукция Ych рекомбинантным штаммом подтверждалась и при его сравнении с контрольным штаммом на универсальной индикаторной среде (CAS-агаре) для выявления сидерофоров (Рисунок 6). 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, что свидетельствует о задержке сидерофора внутри клеток. В то же время при 26°C рекомбинантный штамм образовывал большую зону просветления CAS-реагента вокруг посева за счет выделения Ych в среду.

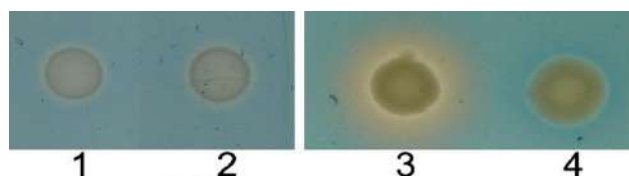


Рисунок 6 - Сидерофорная активность штамма *E. coli* H1884 Δ entDF, содержащего рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1,3) и векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (2, 4)

Примечание:

Бактерии выращивали в течение 48 ч на CAS-агаре при температуре 37°C (1, 2) и 26°C (3, 4)

Секреция Ych рекомбинантным штаммом при 26°C была подтверждена и при анализе культуральной среды двух штаммов *E. coli*, выращенных в жидкой среде M9, содержащей 100 мкМ трехвалентного железа. Сравнение двух препаратов, полученных из культуральной среды контрольного и рекомбинантного штаммов, выявило их значительные различия. Только препарат из рекомбинантного штамма при восходящей ТСХ содержал окрашивающийся парами йода компонент с Rf 0,7 и проявлял сидерофорную активность на индикаторной среде. Вышеописанные результаты свидетельствуют о функциональности генов биосинтеза Ych, полученных не только из штамма *Y. pestis* KIM, но и из вакцинного штамма *Y. pestis* EV76.

Анализ способности Ych участвовать в ассимиляции железа в гетерологичных клетках кишечной палочки был проведен при выращивании контрольного и рекомбинантного штаммов в жидкой и на плотной минимальной среде M9 при 26°C и 37°C. При обеих температурах Ych не

обеспечивал ассимиляцию бактериями железа в железодефицитных условиях, поскольку в рекомбинантной плазмиде имеются гены биосинтеза, но отсутствуют гены рецептора и белков, необходимых для транспорта нагруженного железом сидерофора внутрь бактерий. Стимуляции роста обоих штаммов способствовало добавление в среду M9 солей трехвалентного железа в концентрации 100 мкМ. По-видимому, в такой концентрации железо может способствовать росту бактерий за счет включения низкоаффинных систем транспорта железа.

Значительные различия между штаммами были выявлены при их выращивании в средах с достаточным содержанием железа (LB, M9+ 100 мкМ Fe^{3+}) в условиях аэрации. В этих условиях контрольный штамм отставал от рекомбинантного по скорости роста. Особенно наглядно различия проявлялись при выращивании штаммов при 37°C с аэрацией, и не наблюдались в микроаэрофильных условиях (без аэрации). Эти данные позволяли предположить, что экспрессия Ych рекомбинантным штаммом защищает бактерии от реактивных соединений кислорода. Чтобы в этом убедиться, мы провели сравнение чувствительности двух штаммов к перекиси водорода диско-диффузионным методом на среде LB. Оказалось, что рекомбинантный штамм, синтезирующий Ych, был значительно менее чувствительным к действию перекиси, особенно при 37°C. 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 судить и по результатам действия двухвалентного железа на посевы двух штаммов на агар M9. В этих экспериментах выяснилось, что Fe^{2+} стимулировал рост только рекомбинантного штамма, но не способствовал росту контрольного штамма. Как известно, двухвалентное железо обладает более высокой, чем трехвалентное железо, прооксидантной активностью, поскольку в присутствии кислорода образует наиболее активные гидроксил-радикалы в реакции Фентона. Поэтому Fe^{2+} токсично для бактерий, не обладающих мощными антиоксидантными механизмами. По-видимому, снижение токсичности двухвалентного железа в присутствии Ych дает возможность рекомбинантному штамму *E. coli*, в отличие от контрольного, поглощать железо с помощью имеющихся у кишечной палочки сидерофор-независимых систем ассимиляции двухвалентного железа.

Таким образом, анализ функциональных свойств Ych в кишечной палочке показал, что сидерофор синтезируется рекомбинантным штаммом как при 26°C, так и 37°C. При этом при 37°C он остается внутри бактерий, а при 26°C – выделяется в среду. В то же время при 37°C, когда Ych находится главным образом внутри клеток, он проявляет антиоксидантную активность, стимулируя рост штаммов в присутствии таких прооксидантов, как аэрация, перекись водорода и соли двухвалентного железа.

Изучение функциональных свойств Ych на модели чумного микроба проводили путем сравнения свойств трех штаммов, различающихся по продукции этого сидерофора. В качестве родительского штамма в этих экспериментах использован вакцинный штамм *Y. pestis* EV76, который не продуцирует сидерофор Ybt. Из этого штамма получен мутант (*Y. pestis* EV76 Ych⁻), не продуцирующий Ych из-за направленной делеции генов его биосинтеза. Мутант сконструирован путем генетического обмена (Datsenko K.A., Wanner B.L., 2000) с рекомбинантной плазмидой, содержащей делецию трех генов биосинтеза Ych из штамма EV76. В то же время у мутанта были сохранены гены (*ypj1533-1537*), необходимые для поглощения бактериями Ych, нагруженного железом. Наличие этих транспортных систем у родительского и мутантного штаммов позволяет оценить роль этого сидерофора в ассимиляции железа, что не удалось сделать на модели штамма *E. coli*, у которого эти гены отсутствуют. Мутант, очевидно, сохранил свои основные характеристики, свойственные вакцинному штамму *Y. pestis* EV76, поскольку не отличался от родительского штамма по протективной активности. Комплементация мутанта описанной выше плазмидой pSC-A-5EV, содержащей гены биосинтеза Ych, позволила получить штамм (*Y. pestis* EV76 Ych⁺), у которого способность продуцировать Ych была восстановлена. Для корректного сравнения штаммов в одинаковых условиях в присутствии ампициллина, необходимого для сохранения в бактериях рекомбинантной плазмиды pSC-A-5EV, родительский штамм и его мутант были трансформированы векторной плазмидой pSC-A-amp/kan.

Сравнительный анализ трех вышеописанных штаммов, выросших на плотной среде LB при 26 и 37°C, показал, что они не различались по морфологии колоний при 26°C, однако при 37°C комплементированный мутант, как и рекомбинантный штамм кишечной палочки, образовывал коричневые включения внутри колоний. По-видимому, при 37°C в клетках чумного микроба, также как в клетках кишечной палочки, Ych не выделяется в среду, а накапливается в бактериях в комплексе с железом. Отсутствие подобного эффекта при 26°C позволяло предположить, что при этой температуре сидерофор выделяется из клеток. Подтверждение этого предположения было получено при анализе сидерофорной активности трех штаммов на индикаторной среде (Рисунок 7). Сравнение сидерофорной активности трех штаммов было проведено при 26°C, поскольку при 37°C штамм *Y. pestis* EV76 не растет на железodefицитных средах, в том числе и на CAS-агаре. Известно, что для роста в этих условиях чумному микробу необходим Ybt (Perry R.D., Fetherston J.D., 2011), экспрессия которого активируется при 37°C. Как видно на рисунке 6 Б, ни родительский штамм, ни его мутант не обладают сидерофорной активностью при 26°C, в то время как комплементированный мутант давал обширную зону просветления CAS-реагента.

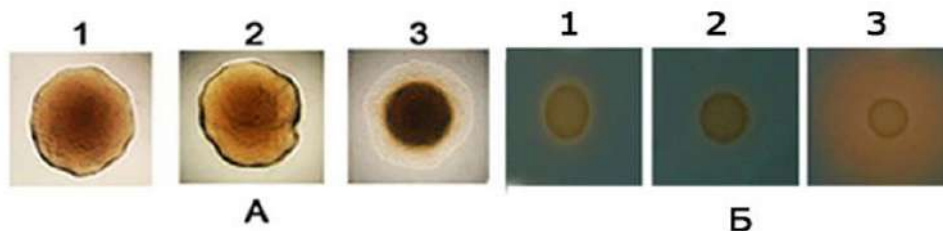


Рисунок 7 – Сравнительный анализ родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего иерсиниахелин (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3)

Примечание:

А. Морфология колоний исследуемых штаммов, выращенных на плотной питательной среде LB при 37°C в течение 48 ч

Б. Сидерофорная активность исследуемых штаммов, выращенных при 26°C на индикаторной среде (CAS-агаре) в течение 48 ч

Различия между тремя штаммами были выявлены и при сравнении скорости их роста при 26°C в жидкой питательной среде M9 в присутствии ампициллина (50 мкг/мл) и 50 мкМ хелатора железа 2-2'-дипиридила. В этих экспериментах *Y. pestis* EV76 Ych⁺ значительно обгонял в росте родительский штамм, а мутант, не продуцирующий сидерофор, отставал по росту от обоих штаммов. Полученные результаты свидетельствовали об участии иерсиниахелина в ассимиляции железа. Описанные выше различия в скорости роста между тремя штаммами были более выраженными в условиях интенсивной (250 rpm) аэрации и практически отсутствовали при выращивании бактерий в стационарных условиях. Эти результаты указывали на то, что Ych, помимо участия в ассимиляции бактериями *Y. pestis* железа в железodefицитных условиях, способствует защите бактерий от действия реактивных соединений кислорода.

Способность Ych защищать бактерии от реактивных соединений кислорода подтвердилась при анализе чувствительности штаммов к перекиси водорода при 37°C. Эти эксперименты показали, что мутант, не продуцирующий Ych, более чувствителен к действию перекиси, чем родительский штамм, и, тем более, *Y. pestis* EV76 Ych⁺, продуцирующий гораздо большие количества Ych, чем родительский штамм. Вышеописанные различия между тремя штаммами свидетельствуют о возможной роли Ych в качестве антиоксиданта, способствующего снижению чувствительности бактерий к бактерицидному действию реактивных соединений кислорода. Эти данные подтверждали результаты, полученные на модели *E. coli*, об антиоксидантной активности Ych.

Участие Ych в ассимиляции бактериями *Y. pestis* железа в железodefицитных условиях, а также его антиоксидантная активность позволяют предположить, что этот сидерофор может играть определенную роль в инфекционном процессе. Это предположение подтвердилось при анализе действия на организм лабораторных животных, в ходе которого были обнаружены существенные различия между тремя вышеописанными штаммами *Y. pestis*, различающимися по продукции Ych. Так, патологоанатомическая картина у мышей, вскрытых через 1-5 суток после внутривенного заражения родительским и мутантным штаммом, а также комплементированным мутантом, была

различной. Особенно выраженные отличия между штаммами наблюдались при анализе регионарных лимфоузлов животных (Рисунок 8).

В отличие от мутанта, родительский штамм вызывал образование геморрагий вокруг лимфоузлов. При этом мутант *Y. pestis* EV76 Ych⁺, продуцирующий большие количества Ych, обладал гораздо более выраженной способностью к образованию геморрагий, чем родительский штамм. Интересно, что после внутривенного введения родительского штамма диапедез эритроцитов наблюдался главным образом в области первичных и вторичных лимфоузлов, а при введении штамма *Y. pestis* EV76 Ych⁺ – и по ходу кровеносных сосудов. Полученные данные свидетельствуют о способности Ych прямо или опосредованно стимулировать проницаемость кровеносных сосудов. Механизм, лежащий в основе этой активности Ych, нуждается в дальнейшем углубленном исследовании.

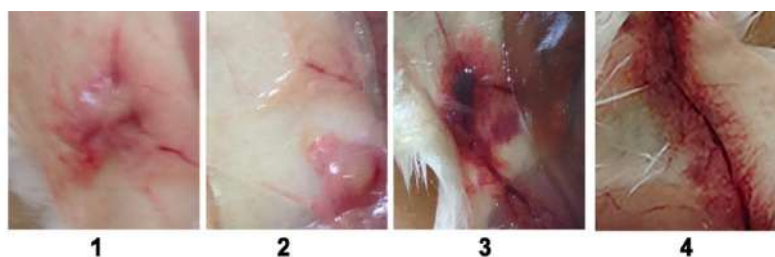


Рисунок 8 – Сравнительный анализ патологоанатомической картины у мышей, вскрытых через трое суток после внутривенного заражения родительским штаммом *Y. pestis* EV76 (1), его мутантом, не продуцирующим иерсиниахелин (2), и мутантом, комплементированным рекомбинантной плазмидой, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина (3, 4)

Таким образом, полученные в работе данные позволяют заключить, что *Y. pestis*, как и многие другие колонизирующие организм млекопитающих бактерии, имеет не одну сидерофор-зависимую систему ассимиляции железа. Экспериментально доказано, что штаммы *Y. pestis* продуцируют гидроксаматный сидерофор Ych, который экспрессируется клетками как при 26°C, так и 37°C, но при разных температурах его роль в физиологии возбудителя чумы различна. При 26°C в железодефицитных условиях, когда у чумного микроба отсутствует или сильно снижена экспрессия иерсиниабактина, ассимиляции бактериями железа способствует секретируемый в среду Ych. А при 37°C, когда Ybt играет ведущую роль в ассимиляции железа, Ych остается внутри бактерий и защищает их от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. Помимо этих двух видов активности, свойственных многим известным сидерофорам, у Ych выявлена уникальная способность стимулировать проницаемость сосудов. Выявленные свойства Ych позволяют предположить, что этот сидерофор может играть существенную роль в инфекционном процессе и вносить определенный вклад в патогенез чумы.

ВЫВОДЫ

1. Гены биосинтеза и транспорта иерсиниахелина (аналоги *upo1529-upo1538* из штамма *Y. pestis* CO92) присутствуют в геномах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* и обладают высоко консервативной структурой, что свидетельствует об эволюционной стабильности генов, отвечающих за экспрессию иерсиниахелина, и о важности этого сидерофора для двух видов иерсиний.
2. Структура терминаторной области оперона биосинтеза иерсиниахелина идентична у разных штаммов *Y. pestis*, но различается у разных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, что может быть использовано для внутривидовой дифференциации возбудителя псевдотуберкулеза с помощью ПЦР.
3. Гены (аналоги *upo1529-upo1532* из штамма *Y. pestis* CO92), кодирующие биосинтез иерсиниахелина, экспрессируются в рекомбинантных клетках *E. coli* и способствуют синтезу функционально активного сидерофора, обладающего антиоксидантной активностью.
4. Иерсиниахелин экспрессируется клетками возбудителя чумы как при 26°C, так и при 37°C: в железодефицитных условиях при 26°C он выделяется в среду, способствуя ассимиляции железа, а при 37°C остается внутри клеток, защищая их от действия реактивных соединений кислорода.
5. В организме мышей иерсиниахелин способствует проницаемости кровеносных сосудов и образованию геморрагий, особенно выраженных в области лимфоузлов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в работе материалы предлагаются к использованию специалистам Роспотребнадзора, которые занимаются диагностикой и изучением возбудителей чумы и псевдотуберкулеза:

1. Штамм *Y. pestis* KM1986, который является суперпродуцентом иерсиниахелина, может быть использован для получения препарата этого сидерофора с целью дальнейшего изучения его структуры, функций и роли в патогенезе чумы и псевдотуберкулеза.
2. Рекомбинантная плазмида, экспрессирующая клонированные гены биосинтеза иерсиниахелина возбудителя чумы, может быть использована для получения гетерологичных штаммов-суперпродуцентов этого сидерофора.
3. Разработанные праймеры рекомендуется использовать для совершенствования внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis*.
4. Компьютерная программа «SiderophoreAnalyzer» рекомендована для анализа данных полногеномного секвенирования таких представителей энтеробактерий, как бактерии рода *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*. Применение программы дает возможность оценить наличие и разнообразие в геномах бактерий кластеров генов, участвующих в процессе поглощения железа сидерофорами.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные в работе теоретические результаты представляют основу для изучения роли иерсиниахелина в патогенезе чумной и псевдотуберкулезной инфекций. Сконструированные рекомбинантные плазмиды и штаммы могут быть использованы в дальнейшей работе для таких целей, как:

1. Получение изогенных вариантов вирулентных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, различающихся по экспрессии иерсиниахелина, для доказательства роли этого сидерофора в патогенности возбудителей чумы и псевдотуберкулеза.
2. Выделение чистого препарата иерсиниахелина с целью дальнейшего изучения его структуры, функций и механизмов участия в патогенезе чумы и псевдотуберкулеза.
3. Изучение молекулярных механизмов регуляции экспрессии иерсиниахелина в бактериях *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кузнецова, Д.А.** Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli* / Д.А. Кузнецова, О.Н. Подладчикова // Бактериология. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 36–44.
2. **Кузнецова, Д.А.** Функциональные свойства сидерофора иерсиниахелина возбудителя чумы / Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, И.В. Морозова, О.Н. Подладчикова // Сборник трудов XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Под ред. В.И. Покровского, 7-9 сентября 2020 г., г. Москва. - Москва, 2020. - С. 115.
3. **Кузнецова, Д.А.** Множественные функции бактериальных сидерофоров / Д.А. Кузнецова, О.Н. Подладчикова // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены, 21–22 октября 2020 г., г. Ростов-на-Дону. – Ростов-на-Дону, 2020. - С. 355-358.
4. **Кузнецова, Д.А.** Использование структурного разнообразия генов биосинтеза сидерофоров для внутри и межвидовой дифференциации патогенных иерсиний / Д.А. Кузнецова, А.Л., Трухачев, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Санитарный врач. - 2021.- №8.- С.50-56.
5. **Кузнецова, Д.А.** Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций / Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. - № 3. – С. 14-22.
6. **Kuznetsova, D.A.** The analysis of the siderophore yersiniachelin genetic determinants in *Yersinia* / D.A. Kuznetsova, A.S. Vodopyanov, A.L. Trukhachev, V.A. Rykova, O. N. Podladchikova // Proceedings of International Symposium «Yersinia 14», 26-28 сентября 2022 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2022. - P. 85.

7. Podladchikova, O.N. Multiple siderophores of the plague agent / O.N. Podladchikova, D.A. Kuznetsova, V.A. Rykova, I.V. Morozova, I.A. Ivanova // Proceedings of International Symposium «Yersinia 14», 26-28 сентября 2022 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2022. - Р. 86.
8. Кузнецова, Д.А. Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии *Yersinia pestis* / Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. - № 4. – С. 75-81.
9. Кузнецова, Д.А. Анализ генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина иерсиний / Д.А. Кузнецова, А.С. Водопьянов, А.Л. Трухачев, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024. - № 3. – С. 126-132.
10. Патент на изобретение 2670949 Российская Федерация, СПК C12N 15/74, C07K 14/24. Рекомбинантная плазмида, экспрессирующая клонированные гены биосинтеза сидерофора иерсиниахелина возбудителя чумы, способ ее получения и штамм *Yersinia pestis* – суперпродуцент иерсиниахелина / Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А. заявитель и патентообладатель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). - № 2017131017; заявл. 01.09.2017; опубл. 25.10.2018, Бюл. № 30. – 2с.
11. Программа для ЭВМ 2022680676 Российская Федерация, Siderophore Analyzer – программа для выявления генов, отвечающих за синтез сидерофоров, в полногеномных нуклеотидных последовательностях энтеробактерий / Д.А. Кузнецова, А.С. Водопьянов, О.Н. Подладчикова, В.А. Рыкова, А.Л. Трухачев. Правообладатель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). - № 2022664662; заявл. 03.08.2022; опубл. 03.11.2022, Бюл. № 11. – 1с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР- полимеразная цепная реакция
ТСХ – тонкослойная хроматография
CAS – хромогенный хелатор железа хромазуrol S
NCBI- National Center for Biotechnology Information
pgm – хромосомный локус, обеспечивающий способность *Y. pestis* сорбировать пигменты
rpm- revolution per minute
VNTR- variable number tandem repeat
Ybt- сидерофор иерсиниабактин
Ych- сидерофор иерсиниахелин
ysu- yersiniachelin synthesis utalization