

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО
ЗНАМЕНИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ
ИНСТИТУТ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Кузнецова Дарья Александровна

**РОЛЬ СИДЕРОФОРА ИЕРСИНИАХЕЛИНА В ФИЗИОЛОГИИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ**

1.5.11- микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
О.Н. Подладчикова

Ростов-на-Дону

2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	7
Цель исследования	7
Задачи исследования	8
Научная новизна исследования.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы	10
Методология и методы исследования	11
Материалы исследования	12
Методы исследования	14
Бактериологические методы исследования	14
Биоинформационные методы исследования	15
Молекулярно-генетические методы исследования	18
Биохимические методы исследования	20
Биологические методы исследования	21
Методы статистической обработки результатов	21
Личное участие автора в получении результатов.....	22
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	22
Степень достоверности и апробация результатов.....	22
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	24
1.1. Структура, функции и роль сидерофоров в патогенезе инфекций	24
1.1.1. Роль железа в физиологии бактерий	24
1.1.2. Источники железа для бактерий в организме хозяина	25
1.1.3. Ассимиляция железа патогенными бактериями в организме хозяина	27
1.1.4. Использование сидерофоров бактериями для ассимиляции железа	30
1.1.5. Биосинтез и регуляция экспрессии сидерофоров	31
1.1.6. Влияние сидерофоров на вирулентность бактерий	33
1.1.7. Множественные сидерофорные системы бактерий	36

1.2. Системы ассимиляции железа возбудителя чумы	37
1.2.1. Иерсиниабактин- первый сидерофор, обнаруженный у возбудителя чумы	39
1.2.2. Иерсиниахелин- второй сидерофор возбудителя чумы.....	41
1.3. Практическое применение сидерофоров	43
1.3.1. Использование сидерофоров в биотехнологии и медицине	43
1.3.2. Использование сидерофоров для профилактики инфекций	44
1.3.3. Использование сидерофоров для лечения инфекционных заболеваний.....	45
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	49
ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТОВ СИДЕРОФОРА ИЕРСИНИАХЕЛИНА	49
2.1. Биоинформационный анализ <i>usi</i> локуса иерсиний	49
2.2. Анализ специфичности генетических детерминантов иерсиниахелина	52
2.3. Клонирование генов биосинтеза иерсиниахелина из штаммов <i>Y. pestis</i> KIM и <i>Y. pseudotuberculosis</i> YPIII в клетках кишечной палочки	54
2.4. Генотипирование иерсиний с помощью VNTR-маркеров, расположенных в <i>usi</i> -терминаторе.....	56
ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ИЕРСИНИАХЕЛИНА..	61
3.1. Конструирование рекомбинантной плазмиды, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина из штамма <i>Y. pestis</i> EV76	61
3.2. Анализ экспрессии иерсиниахелина в рекомбинантном штамме <i>E. coli</i>	64
3.3. Исследование функциональной активности иерсиниахелина в клетках <i>E. coli</i>	67
3.4. Изучение функциональных свойств иерсиниахелина в клетках <i>Y. pestis</i>	72
3.4.1. Сравнение родительского штамма <i>Y. pestis</i> EV76 с его мутантом, не продуцирующим иерсиниахелин.....	72
3.4.2. Исследование роли иерсиниахелина в ассимиляции железа чумным микробом.....	74
3.4.3. Анализ антиоксидантной активности иерсиниахелина в клетках <i>Y. pestis</i> ...	77
3.4.4. Изучение роли иерсиниахелина в патогенезе инфекции	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81

ВЫВОДЫ	86
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	87
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90
Приложение №1.....	114
Приложение №2.....	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Железо – необходимый для жизни микроэлемент, который играет ключевую роль в процессах метаболизма, роста и пролиферации клеток. В жизнедеятельности патогенных бактерий оно также является одним из ключевых элементов, поэтому в организме млекопитающих его доступность ограничена [49].

Патогенные микроорганизмы разработали разнообразные стратегии для получения железа, являющегося для них незаменимым элементом в процессе размножения в организме хозяина и реализации своих патогенных свойств. Установлено, что способность вызывать заболевания у млекопитающих в значительной степени определяется возможностью бактерий усваивать железо. [71]. Низкая концентрация железа в окружающей среде является для них сигналом присутствия в организме млекопитающего [185]. В ходе адаптации патогенов к новым условиям среды происходит перенастройка метаболизма. На начальном этапе этого процесса наблюдается секреция сидерофоров - низкомолекулярных соединений, способных извлекать металлы из комплексов с белками. Затем эти металлы транспортируются бактериальным клеткам и поглощаются посредством специфических рецепторов, расположенных на их поверхности и комплементарных каждому типу сидерофора [95, 106, 114, 174].

Важность сидерофоров для патогенеза инфекционных заболеваний сложно переоценить. Именно поэтому в настоящее время они активно изучаются в микробиологии патогенных микроорганизмов [5, 71, 105, 114, 201]. В последние десятилетия было проведено значительное количество исследований, посвященных генетическим факторам, структуре и метаболизму сидерофоров у бактерий и грибов. Экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о ключевой роли сидерофоров в патогенезе инфекционных заболеваний. Помимо обеспечения бактерий железом, сидерофоры выполняют разнообразные биологические функции [21]. Они обладают антиоксидантными свойствами [14], выполняют регуляторную функцию [121], а также участвуют в поглощении других биологически значимых металлов [176].

Сидерофоры, находясь в организме млекопитающих, обладают широким спектром биологических эффектов. Они способны индуцировать выработку цитокинов [195], подавлять рост нормальной микрофлоры организма-хозяина [77], обеспечивать бактериям защиту от факторов сыворотки крови и препятствовать фагоцитарной активности [42, 96]. Кроме того, сидерофоры могут оказывать токсическое воздействие на ткани хозяина [162] и функционировать как секретируемые токсины, вызывающие повреждение митохондрий в клетках иммунной системы [108]. Многочисленные фундаментальные исследования сидерофоров позволили не только выявить их важную роль в вирулентности микроорганизмов и патогенезе инфекций, но и способствовали развитию различных направлений их практического применения для диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней [55, 64].

Известно, что многие патогенные микроорганизмы обладают способностью синтезировать разнообразные сидерофоры – молекулы, отвечающие за захват железа из организма хозяина. Эти сидерофоры отличаются по своей структуре и свойствам, что позволяет им эффективно связывать железо из различных источников на разных стадиях инфекционного процесса [127]. Исследования демонстрируют прямую корреляцию между количеством типов сидерофоров, производимых патогеном, и тяжестью протекания заболевания. Это объясняется широким спектром функций сидерофоров и вариабельностью их сродства к сидерокалину-2 – белку врожденного иммунитета, секретируемому эпителиальными клетками и нейтрофилами [182]. Сидерокалин-2 способен нейтрализовать лишь часть сидерофоров, что позволяет патогенам с большим разнообразием сидерофоров уклоняться от иммунного ответа. Предполагается, что специфический набор сидерофоров, продуцируемых бактерией, определяет ее "репликативные ниши" - места локализации и размножения в организме хозяина – и, следовательно, влияет на характер реакции организма на инфекцию [98].

Степень разработанности темы исследования

Исследования подтвердили важную роль сидерофоров в вирулентности бактерий, в частности, на примере возбудителя чумы. Установлено, что патогенные штаммы *Yersinia pestis* обладают способностью к синтезу сидерофора иерсиниабактина (Ybt), который кодируется «островом высокой патогенности», локализованным в нестабильном хромосомном *pgm*-локусе [150]. 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* [80]. 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* [163]. Вместе с тем сами сидерофоры не были выделены и охарактеризованы.

Исследования, проведенные в нашем институте [157, 158], выявили, что помимо иерсиниабактина, *Y. pestis* синтезирует еще один сидерофор — иерсиниахелин (Ych), который кодируется генами хромосомного *usi* 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 *usi* локуса, кодирующих биосинтез и транспорт иерсиниахелина у разных штаммов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*.
2. Анализ возможности использования различий в структуре *usi* 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 *usi* 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 *usi* 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 *usi* 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* H1884 Δ entDF, не синтезирующем собственные сидерофоры (Патент № 2670949 от 25.10.2018 г.).

Установлено, что структура терминатора транскрипции *usi* локуса влияет на экспрессию иерсиниахелина. Для этого штамм *E. coli* H1884 Δ entDF 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 геморагий 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 плазмида pSC-A-5EV, содержащая гены биосинтеза иерсиниахелина штамма *Y. pestis* EV76 без промоторной области и F_{ur}-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

Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

В работе использованы 55 штаммов *Y. pestis* (36 – основного подвида, 19 – неосновных подвидов) (Приложение 1) и 100 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на различных территориях и полученных из музейных коллекций лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский 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 (Приложение 2). Для определения соответствия штаммов паспортным характеристикам использовался комплекс дифференциально-диагностических тестов [4]. Данные тесты служат основой для идентификации и внутривидовой классификации иерсиний. Серопринадлежность использованных в работе штаммов *Y. pseudotuberculosis* была определена с помощью гено-серотипирования в ПЦР с праймерами, которые были разработаны для определения серотипов псевдотуберкулезного микроба путем анализа хромосомных генов, кодирующих синтез липополисахарида [35]. В соответствии со структурой праймеров (fcl, prt, manB, abe, wbyL, wbyH, ddhAB, wbyK, wzx) они были синтезированы в ООО НПФ «СИНТОЛ» и использованы для гено-серотипирования штаммов в ПЦР *in vitro*.

Для ПЦР-анализа разных штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью сконструированных в настоящем исследовании праймеров в работе использованы:

- коллекция из 22 типовых штаммов;
- 4 штамма Дальневосточной группы, выделенных от больных дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой;
- 8 штаммов, выделенных от детей во время вспышки в г. Томске в 2021 г.;

- 9 штаммов, выделенных от школьников г. Красноярск во время вспышки 2021 г.;

- 4 и 8 штаммов, выделенных во время вспышек в г. Санкт-Петербурге в 1981 г. и 2000 г. соответственно;

- 9 штаммов из г. Новый Уренгой от 2007 г.;

- 10 и 9 штаммов из г. Зима от 1998-1999 и 2000 гг., соответственно;

- 17 штаммов, выделенных при мониторинговых исследованиях.

Молекулярное клонирование генов биосинтеза иерсиниахелина и отбор клонов, содержащих рекомбинатные плазмиды, проведены в штамме *E. coli* Strata. Данный штамм демонстрирует устойчивость к стрептомицину и характеризуется наличием мутации в гене β -галактозидазы *lacZ*ΔM15. Помимо этого, штамм характеризуется наличием мутаций в генах эндонуклеазы (*endA*) и рекомбиназы (*recA*), в результате чего он утрачивает способность к рестрикции фрагментов чужеродной ДНК. Отбор рекомбинантных плазмид, содержащих гены биосинтеза иерсиниахелина в составе вектора pSC-A-amp/kan, проводили по окраске колоний на среде LB, содержащей 2% X-gal и 50 мкг/мл ампициллина. Для экспрессии рекомбинантного иерсиниахелина и анализа его свойств использован штамм *E. coli* H1884Δ*entD*DF (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.

Биологические модели млекопитающих

В работе использовано 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.

Методы исследования

Бактериологические методы исследования

Культивирование микроорганизмов

Штаммы рода *Yersinia* и кишечной палочки инкубировали при температурах 26° и 37°C на плотных и жидких средах: LB (DIFCO, США), NB (DIFCO, США), ТА (DIFCO, США), среде Хоттингера (рН 7,2, производство ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) и минимальной среде М9 [6]. Для обеспечения полноценного роста аттенуированного штамма *Y. pestis* EV76 в М9 дополнительно вносили L-метионин, L-треонин, L-цистеин и L-фенилаланин (20 мкг/мл каждого). При проведении экспериментов с использованием бактериальных культур, трансформированных векторными и рекомбинантными плазмидами, в состав всех питательных сред добавляли антибиотики: ампициллин (50 мкг/мл) и канамицин (25 мкг/мл). Содержание железа регулировали путём добавления 100 мкМ FeCl₃, либо 50–100 мкМ хелатора 2,2'-дипиридила (железодефицитные условия).

Анализ сидерофорной активности штаммов

Для определения сидерофорной активности использовали индикаторный CAS агар с хромазуолом S. При 30% насыщении железом хромазуол S приобретает синевато-зеленый оттенок, который меняется на желтый после связывания Fe³⁺ сидерофором [179]. Для стимуляции продукции сидерофоров, штаммы до посева на индикаторную среду культивировали при температуре 26°C на железодефицитной среде NB, содержащей 50 мкМ 2-2'-дипиридила. Бактериальные суспензии готовили в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) по стандарту мутности (ООО «Ормет», Екатеринбург). Количество содержащихся в каждой пробе бактерий определяли путем измерения оптической плотности и высева культур на плотную питательную среду LB для подсчета выросших колоний. На поверхность CAS-агара наносили по 10 мкл суспензии (5×10^9 кл./мл) и инкубировали 24–48 ч при 26°C или 37°C. Появление желтого ореола вокруг посева расценивали как свидетельство секреции сидерофоров.

Определение скорости роста бактерий

Жидкие питательные среды LB, M9 и M9 с 2,2'-дипиридилем были использованы для регистрации кривых роста анализируемых штаммов. Для этого культуры выращивали при 26 °C на агаре LB с ампициллином в течение 48 ч, затем центрифугировали и ресуспендировали в холодном стерильном ЗФР дважды. Стартовой была выбрана концентрация 10^7 клеток/мл в 150 мл свежей среды. Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 550$ нм. Бактерии выращивали в колбах при 26°C в условиях аэрации на шуттеле (150 *rpm*). С фиксированными интервалами отбирали 2 мл культуры для измерения оптической плотности и параллельного количественного посева (10^3 кл.) на среду LB или Хоттингера (контроль чистоты культуры и подсчет колоний).

Анализ чувствительности исследуемых штаммов к H₂O₂

Чувствительность штаммов к H₂O₂ определяли с помощью двух видов тестов.

Диско-диффузионный тест. На агар LB, Хоттингера или ТА наносили суспензию 10^9 клеток/мл (ЗФР), полученную после 24-часового (*E. coli*) или 48-часового (*Y. pestis*) культивирования при 37°C. Спустя 3–6 ч инкубации при 37°C на центр пластины помещали бумажный диск, пропитанный 3 % H₂O₂. Диаметр зоны подавления роста фиксировали через 24–48 ч.

Тест на выживаемость в растворе. Клетки, собранные с поверхности плотной среды LB (37°C, 24–48 ч), разводили до 10^5 клеток/мл в ЗФР, после чего добавляли H₂O₂ (0,01 % финальная концентрация). В качестве контроля вместо раствора перекиси добавляли дистиллированную воду в том же объеме. По прошествии 30 минут инкубации при 37°C суспензии разбавляли в 100 раз и высевали по 0,1 мл (≈ 100 клеток) на агар LB (три чашки на образец). Подсчет колоний производился через 48-72 часа культивирования при 26°C, процент выживших рассчитывался относительно контроля.

Биоинформационные методы исследования

Биоинформационный анализ *usi* локуса иерсиний проводили при использовании генома штамма *Y. pestis* CO92. Для визуализации генов, входящих

в состав локуса, его анализировали с помощью приложения SnapGene [103]. Выравнивание и анализ участков межгенной области *usu* локуса проводили с помощью программы UGENE [172].

Анализ генов биосинтеза иерсиниахелина в полных нуклеотидных последовательностях 583 штаммов *Yersinia pestis* и 303 штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* проводился с помощью специально разработанного скрипта. Для выявления гомологов генов *usu* локуса в геномах различных бактерий была использована программа BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Данные для анализа были получены из базы данных NCBI.

Выявление генетических кластеров, кодирующих разные сидерофоры, проводили при использовании программы «SiderophoreAnalyzer», которая была разработана в настоящей работе. Данная программа предназначена для анализа результатов полногеномного секвенирования энтеробактерий с целью идентификации генов, отвечающих за синтез сидерофоров. Для этого в память программы внесены специфические праймеры, комплементарные одному из генов биосинтеза и гену рецептора каждого из таких широко распространенных среди энтеробактерий сидерофоров, как энтеробактин, аэробактин, сальмохелин и иерсиниабактин. Праймеры к генам *entB*, *entD*, *iucA*, *iroB*, *iroN* сконструированы на основе структуры этих генов в штамме *E. coli* CU 568-3, праймеры к генам *iroB*, *iroN* – *Salmonella enterica*, *irp2*, *fyuA* – *Yersinia pestis* CO92. Праймеры для выявления специфичных сидерофорных кластеров иерсиний сконструированы на основе геномов *Yersinia pestis* CO92 и *Yersinia pseudotuberculosis* YPIII. Для выявления генов, кодирующих псевдохелин в программу заложены праймеры *ilp1*-F/R и *pbtR*-F/R, пестибактин – *ilp1*-F-*is100*-R *pbtR*-F/R и иерсиниахелин – *alcA*-F/R и *usuR*-F/R. В таблице 1 приведена структура всех праймеров, использованных в программе для выявления соответствующих генов.

Таблица 1 – Структура праймеров, использованных в программе «SiderophoreAnalyzer»

Сидерофоры и их рецепторы	Праймеры	Структура праймеров
Энтеробактин	<i>entB-F</i> <i>entB-R</i>	CGTTTATGGTGGCGGATGCG ATGCGCACCGAATCCAGACC
Энтеробактин	<i>entD-F</i> <i>entD-R</i>	CAGACTGCGGTTTAGCCTTT CGATGAATGATGACCTGCTG
Рецептор энтеробактина	<i>fepA-F</i> <i>fepA-R</i>	GGGCGCGAAGGGGTGATCAACAAA CCCAGTTGCTGGTGGTCACA
Аэробактин	<i>iucA1-F</i> <i>iucA1-R</i>	TGCTTCCTGAATGCACTGAT TTTATCCACCGAAAACCACC
Аэробактин	<i>iucA2-F</i> <i>iucA2-R</i>	GGGCTGATTAAAGACTTAGGTGAG AAGCGGACCTGTAGCATCTG
Аэробактин	<i>iucA3-F</i> <i>iucA3-R</i>	ACCTCTTCCCGTTCCCTCTA TAGTCTGGCTTTTCGGCTGA
Аэробактин у иерсиний	<i>iucA4-F</i> <i>iucA4-R</i>	ATGACTATCCCAGTAGAAACCTT GCTTGCTGAGTATTATCATGACT
Рецептор аэробактина у энтеробактерий	<i>iutA1-F</i> <i>iutA1-R</i>	GACAGTGATTTCTCTGGGACA TACTGGTCGGTATCCTGCTG
Рецептор аэробактина у иерсиний	<i>iutA2-F</i> <i>iutA2-R</i>	CTAACCACTCAGTATTTCAACAGC CCAGAAATCCGTGTTGGAGT
Сальмохелин	<i>iroB-F</i> <i>iroB-R</i>	GTGATGCAAACCGTCGGCTT GACGCTTGCGATCAGGTGTA
Рецептор сальмохелина	<i>iroN-F</i> <i>iroN-R</i>	GCCGACAGCTGGGATATTAA TGTATCCCGCTTCAAAATCA
Иерсиниабактин	<i>irp2-F</i> <i>irp2-R</i>	AAGGATTTCGCTGTTACCGGACATT CGTCGGGCAGCGTTTCTTCT
Рецептор иерсиниабактина	<i>fyuA-F</i> <i>fyuA-R</i>	ACTGACAGCCAGACCCTGAG ATATCAACGGTACGCGCATC
Псевдохелин	<i>ilp1-F</i> <i>ilp1-R</i>	TCAATGCTTTTAGCTTTACCGGAAC GATAGCCAGGTTGTTGATGCAACT
Пестибактин	<i>ilp1-F</i> <i>is100-R</i>	TCAATGCTTTTAGCTTTACCGGAAC TTTTGCCTGCAAATAACGTTTAACG
Рецептор псевдохелина/ и пестибактина	<i>pbtR-F</i> <i>pbtR-R</i>	AGTGCTTATGTAGACGAAAGAAAAG ATTAAATGGCCCGCTGTATT
Иерсиниахелин	<i>alcA-F</i> <i>alcA-R</i>	TTAACCCAACCACTAAATGATGTTT CACTGGCAATACTGGTTATATTCCT
Рецептор иерсиниахелина	<i>ysuR-F</i> <i>ysuR-R</i>	CGTTTGCGCACAAGGTTAAT CGTTTCGGTTTTACCTCTCG

Конструирование олигонуклеотидных праймеров, комплементарных различным участкам *ysu* локуса, проводилось на основе нуклеотидной последовательности *ysu* кластера штамма *Y. pestis* CO92 с помощью компьютерной программы BLAST. Синтез праймеров осуществлялся в ООО НПФ «Синтол» (Москва, Россия) и «Евроген» (Москва, Россия).

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение хромосомной и плазмидной ДНК

Бактериальные взвеси разных штаммов иерсиний (10^8 клеток /мл) обеззараживали добавлением мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10000 с последующим прогреванием при 56°C в течение 30 минут.

Выделение тотальной клеточной ДНК для проведения ПЦР осуществляли с помощью набора реактивов «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия) в соответствии с инструкцией.

Плазмидную ДНК из клеток *Y. pestis* и *E. coli* выделяли с помощью коммерческого набора реагентов GeneJet™ Midiprep (Fermentas, EU) согласно инструкции.

Использование полимеразной цепной реакции для получения ДНК-копий оперонов биосинтеза иерсиниахелина, анализа рекомбинантных плазмид и штаммов иерсиний

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. Постановку ПЦР проводили по следующей программе: 95°C – 4 мин (1 цикл); 94°C – 20 сек./ 55°C – 30 сек./72°C – 4 мин. (30 циклов); 72°C – 10 мин.

На матрице хромосомной ДНК, выделенной из штамма *Y. pestis* EV76, была получена ПЦР-копия четырех генов биосинтеза иерсиниахелина (аналогов *uro1529-uro1532*). ПЦР проводили по следующей программе: 94°C – 4 мин (1 цикл); 94°C – 20 сек./ 55°C – 30 сек./72°C – 4 мин. (30 циклов); 72°C – 4 мин. 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).

Анализ рекомбинантных плазмид, проводили методом ПЦР с использованием праймеров *usuF/R* и *p1529F/p1532R*, с помощью которых

выявлялась встройка в векторную плазмиду рекомбинантного фрагмента ДНК. Дополнительно использовали праймер *pM13rev*, который предложен фирмой Stratagene (США), комплементарен векторной ДНК и позволяет определять ориентацию встройки по отношению к векторному промотору. Правильность сборки кодирующих генов подтверждали секвенированием рекомбинантных плазмид.

Анализ терминаторной области *usu* локуса в различных штаммах иерсиний проводили с помощью ПЦР с праймерами *usu-interF/R*. Продукты амплификации анализировали в 8-% полиакриламидном геле (ПААГ). Размер амплифицированных фрагментов определяли по стандартам молекулярных масс GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas, EU), а также с помощью программы Quantity One (Bio-rad.com).

Конструирование рекомбинантных плазмид, содержащих копии оперонов биосинтеза иерсиниахелина

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.

При интеграции рекомбинантой ДНК в вектор синтез α -пептида прекращается. Это свойство используется для селекции рекомбинантных клонов. Отбор осуществляется на питательной среде с индикатором X-gal (2%), где рекомбинантные клоны, не продуцирующие β -галактозидазу, будут визуально отличаться от нерекомбинантных.

Лигирование вектора с фрагментами и трансформация лигазной смесью компетентных клеток штамма *E. coli* Strata позволило получить плазмиды pSC-A-amp/kan, pSC-A-5EV. Полученными рекомбинантными плазмидами, а также

векторной ДНК, трансформировали штаммы *E. coli* H1884 Δ entDF, *Y. pestis* EV76 и его мутант, не продуцирующий иерсиниахелин. Штаммы трансформировали с помощью различных методов [206]. В работе со штаммом кишечной палочки был выбран метод химической трансформации с использованием 0,1 М раствора CaCl₂. 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 MinION (Oxford Nanopore) по технологиям, описанным в протоколах фирм-производителей. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades (github.com).

Биохимические методы исследования

Выделение и анализ иерсиниахелина из рекомбинантного штамма *E. coli*

Выделение иерсиниахелина из рекомбинантного штамма *E. coli* H1884 Δ entDF, содержащего плазмиду pSC-A-5EV, проводили с помощью методики, разработанной для сидерофоров гидроксаматного типа [146]. В качестве отрицательного контроля использовали этот же штамм, трансформированный векторной плазмидой pSC-A-amp/kan.

Суспензии рекомбинантного и контрольного штамма в объеме 10 мл (10⁹ клеток/мл), выращенного на среде LB (26°C), переносили в 250 мл свежей среды М9 и культивировали 72 ч при 26°C на шуттеле (150 *rpm*). Клетки отделяли центрифугированием (8000 *rpm*, 15 мин), супернатанты фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (0,22-мкм). Фильтраты трижды экстрагировали 10 мл бензилового спирта. Органические фазы объединяли, затем смешивали с 150 мл

диэтилового эфира и 2 мл воды. После этого водная фракция была отделена, высушена в вакуумном роторном испарителе и растворена в 50% этаноле.

Для проведения тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовались пластины С₃-силикагеля производства «Плазмохром RP3» (Россия). В качестве подвижной фазы применялся раствор этанола с концентрацией 60%. Визуализация хроматограмм осуществлялась с помощью паров йода.

Сидерофорную активность исследуемых образцов выявляли на CAS-агаре, для чего по 5 мкл растворов наносили на пластины агара и инкубировали при температуре 26°C. Появление через 1-3 ч желтой зоны на месте нанесения препаратов свидетельствовало о присутствии в них сидерофора.

Биологические методы исследования

Беспородные белые мыши 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».

Перед началом эксперимента лабораторных животных, которые были обеспечены достаточным количеством чистой воды и сертифицированных кормов, выдерживали в карантине в течение недели. Затем их заражали подкожно, внутрибрюшинно или внутривенно в хвостовую вену по 0,1 мл суспензии, содержащей по 10^6 - 10^8 КОЕ трех штаммов *Y. pestis*, различающихся по продукции иерсиниахелина. Через 1-3 дня животных усыпляли хлороформом и вскрывали для визуального анализа патологоанатомической картины. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Методы статистической обработки результатов

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 конференциях различного уровня: 16th Medical Biodefense Conference (г. Мюнхен, 28-31 октября 2018 г.), II Региональная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы медицинской микробиологии на современном этапе» (г. Ростов-на-Дону, 22 декабря 2018 г.), XII Ежегодный Всероссийский интернет-конгресс по инфекционным болезням с международным участием (7-9 сентября 2020 г.), XII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Ростов-на-Дону, 21–22 октября 2020 г.), Межучрежденческие онлайн конференции «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.), Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения» (г. Ростов-на-Дону, 9-10 сентября 2021 г.), Международный симпозиум «Yersinia 14» (Санкт-Петербург, 26-28 сентября 2022 г.), XV Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием (г. Москва, 27-29 февраля 2023 г.).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура, функции и роль сидерофоров в патогенезе инфекций

1.1.1. Роль железа в физиологии бактерий

Среди всех микроэлементов, необходимых для жизнедеятельности бактерий, железо стоит на первом месте. Оно служит необходимым кофактором для множества бактериальных ферментов — от цитохромов дыхательной цепи и антиоксидантной каталазы до ряда катализаторов цикла трикарбоновых кислот, без него клетки не могут нормально делиться, поддерживать энергетический обмен и работу важнейших ферментативных систем. Любопытно, что в геномах *Borrelia burgdorferi* и *Treponema pallidum* не обнаружены типичные гены, кодирующие железосодержащие белки. Эти спирохеты обладают сильно редуцированными геномами и существуют как облигатные внутриклеточные патогены, полагаясь, по-видимому, на железозависимые метаболические пути хозяина для получения энергии [159].

Железо существует в двух состояниях, в восстановленной двухвалентной форме (Fe^{2+}) и окисленной трехвалентной форме (Fe^{3+}), которое преобладает в физиологических условиях при нейтральном pH и в присутствии кислорода. Благодаря окислительно-восстановительным свойствам, железо участвует в важнейших биохимических процессах, таких как перенос кислорода, выработка энергии, синтез дезоксирибонуклеотидов, репликация и репарация ДНК [30]. Эти свойства делают железо универсальным компонентом простетических групп различных ферментов и участником в переносе электронов.

Дефицит и избыток железа негативно сказываются на клеточных процессах. Высокая реакционная способность железа, обусловленная его способностью принимать и отдавать электроны, делает его потенциально токсичным. В аэробных условиях в присутствии кислорода ионы Fe^{2+} в реакции Фентона и Fe^{3+} в реакции Хабер-Вайса способны генерировать токсичные свободные радикалы [82]. Эти радикалы вызывают повреждения биомолекул: денатурацию белков, деполимеризацию полисахаридов, разрывы цепей ДНК и перекисное окисление

липидов. Для эффективного гомеостаза железа микроорганизмы должны сбалансировать свою потребность в этом металле. При этом необходим тщательный контроль уровня свободного железа в клетках для защиты от его потенциальной токсичности [19]. Чтобы удовлетворить свою потребность в этом элементе, бактерии используют различные источники железа.

1.1.2. Источники железа для бактерий в организме хозяина

Железо необходимо для поддержания функционирования органов и клеток млекопитающих и поступает в организм из различных источников [196]. Из пищи железо всасывается в эпителиальном слое дуоденального отдела тонкого кишечника. Другим возможным источником железа являются стареющие и поврежденные эритроциты, фагоцитированные макрофагами. При необходимости железо может мобилизоваться из внутриклеточных запасов, которые хранятся в нерастворимой форме в комплексе с белком ферритином [22, 25] в макрофагах и в клетках печени. При потребности организма в железе, оно транспортируется из резервуаров в плазму крови посредством белка-переносчика ферропортина [68]. Регуляция количества ферропортина осуществляется пептидным гормоном гепсидином, секретируемым клетками печени (гепатоцитами). Гепсидин представляет собой 25-аминокислотный пептид, обладающий четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. Функция гепсидина заключается в стимулировании деградации ферропортина и последующем снижении эффлюкса железа в кровоток. В плазме крови железо связывается с транспортным белком трансферрином, в комплексе с которым оно доставляется к клеткам организма.

Избыточное содержание железа в организме хозяина (гиперферримия), наблюдаемое при некоторых наследственных заболеваниях (например, талассемия, гемохроматоз и др.), благоприятствует развитию многих инфекционных заболеваний [8]. Пациенты данной категории характеризуются повышенной восприимчивостью к инфекционным агентам, в том числе и к ослабленным (аттенуированным) штаммам бактерий.

Механизм, регулирующий поступление железа с пищей, координируется индуцируемым гипоксией транскрипционным фактором 1 α (HIF1 α), количество которого зависит от уровня кислорода и железа [125, 178]. Снижение концентрации железа в энтероцитах приводит к усилению транскрипции переносчиков двухвалентных катионов, цитохрома В и ферропортина, экспрессия которых в этом типе клеток регулируется HIF2 α [18]. Этот механизм противодействует дефициту железа в организме млекопитающих за счет увеличения усвоения железа из пищи.

Токсичность железа при его избытке в организме обуславливает строгий контроль его распределения на клеточном, системном и тканевом уровнях для предотвращения как его дефицита, так и перегрузки [22, 112, 184]. У людей перегрузка железом вызывает повреждение клеток и тканей, что может привести к отказу органов и даже смерти в наиболее тяжелых случаях. Поддержание гомеостаза железа у млекопитающих требует слаженной работы механизмов потребления и мобилизации этого металла из запасов, а также наличия сообщения между потребляющими и депонирующими клетками [7, 11, 97, 143]. В этом процессе участвует множество факторов [60].

Печень играет центральную роль в гомеостазе железа, благодаря гепсидину, который секретируется гепатоцитами. Гепсидин, продуцируемый именно этими клетками, осуществляет системный контроль уровня железа в организме [32, 67, 124, 203, 209], хотя гепсидин также экспрессируется другими типами клеток, такими как воспалительные макрофаги, клетки эпидермиса, дендритные клетки и некоторые раковые клетки. Связывая и блокируя ферропортин, гепсидин снижает поступление металла в кровь из кишечника, макрофагов и высвобождение его из запасов [23, 131]. В ситуации дефицита железа в организме происходит подавление экспрессии гепсидина. Напротив, при избытке железа наблюдается увеличение его экспрессии [2, 115, 134, 144]. Поскольку гепсидин является белком острой фазы, в условиях инфекции/воспаления его экспрессия повышается за счет провоспалительных цитокинов, в основном IL6 и IL1 β [131, 132, 133]. Повышенный синтез гепсидина приводит к снижению концентрации железа и является для организма млекопитающих сигналом опасности, запускающим

активацию антимикробных механизмов. Следовательно, повышение уровня гепсидина представляет собой первый этап защиты от вторгающихся внеклеточных патогенов. Когда инфекция/воспаление сохраняется, гипоферремия из-за длительного повышения уровня гепсидина вызывает анемию хронических заболеваний или анемию воспаления [85]. Эволюционно стратегия организма хозяина в лишении микроорганизмов железа необходима для сдерживания вирулентного потенциала условно-патогенных представителей микробиоты.

1.1.3. Ассимиляция железа патогенными бактериями в организме хозяина

Процессы ассимиляции железа особенно актуальны для патогенных бактерий, которым этот металл необходим не только для размножения в хозяине, но и для реализации своих патогенных свойств. Исследования широкого спектра патогенных бактерий свидетельствуют о том, что экспрессия многих генов, отвечающих за вирулентность и персистенцию, регулируется ионами железа [3].

В организме млекопитающих железо тесно связано с белками, которые играют ключевую роль в неспецифической защите от инфекций [29, 87]. При развитии инфекционного процесса синтез этих белков повышается, что приводит к еще большему снижению уровня свободного железа. Такой защитный механизм врожденного иммунитета получил название «пищевой иммунитет» [110, 135]. С первых минут после инфицирования или повреждения тканей активируются механизмы врожденного иммунитета, включающие ряд антимикробных стратегий [135].

Одним из первых защитных механизмов организма является ограничение доступа патогенных микроорганизмов к железу, поскольку его наличие напрямую влияет на их рост и способность вызывать заболевание. В зоне воспаления активно действуют нейтрофилы, выделяющие лактоферрин — белок с высокой аффинностью к железу, превосходящей аффинитет трансферрина. Лактоферрин препятствует образованию бактериальных биопленок, тем самым ограничивая их размножение [89]. Инфекция стимулирует усиленное производство гепсидина в

клетках печени. Гепсидин попадает в кровоток и подавляет всасывание железа в кишечнике, а также его высвобождение из ферритина. Важную роль в этом процессе играет ферропортин: его экспрессия на мембране макрофагов способствует снижению уровня внутриклеточного железа, что препятствует размножению внутриклеточных патогенов.

Успешность колонизации организма хозяина патогенными бактериями и последующее развитие инфекции в значительной степени обусловлено их способностью к эффективному поглощению железа. [19, 36, 71, 113]. Недостаток железа служит бактериям сигналом о нахождении в организме хозяина, что запускает перестройку их метаболизма с целью повышения конкуренции за этот микроэлемент. Таким образом, контроль за железом становится ключевым аспектом противостояния между патогеном и иммунной системой хозяина, определяя динамику и исход инфекции [142].

На ранних этапах развития инфекции патогенные бактерии могут утилизировать собственные резервы железа, связанные с белками хранения, к которым относятся ферритин, бактериоферритин и Dps-белки. Кроме того, доступность железа может быть обеспечена посредством использования различных органических соединений, обладающих способностью связывать ионы Fe^{3+} . Так, секрета бактериями цитрата, который, несмотря на слабую хелатирующую способность, способен выполнять функцию доставки железа в бактериальные клетки.

Бактерии выработали несколько механизмов ассимиляции железа в условиях его дефицита в организме хозяина, где преобладающей формой железа является связанное с белками Fe^{3+} [37, 50, 181]. Это позволяет им успешно конкурировать с хозяином и выживать в разных его органах, в которых ионы железа связаны с различными лигандами.

Известные в настоящее время механизмы включают следующие системы:

1. Импорт с помощью низкоаффинных транспортных систем свободных ионов Fe^{3+} , которые мало доступны в организме хозяина [19];

2. Поглощение с помощью системы Feo свободных ионов Fe^{2+} , также мало доступных в хозяине, в том числе из-за связывания с белком врожденного иммунитета кальпротектином [210];

3. Использование поверхностных ферриредуктаз для восстановления железа, после чего оно может транспортироваться в бактерии с помощью Feo-подобных систем [47];

4. Извлечение Fe^{3+} из трансферрина и лактоферрина и транспорт этих белков в бактерии с помощью TonB-зависимых рецепторов на поверхности клеток [59, 138];

5. Использование секретируемых белков-гемофоров для извлечения гема из гемопroteинов и его доставки специфическим рецепторам на поверхности бактерий [197].

Хотя все вышеперечисленные системы могут в разной степени применяться патогенными бактериями, одним из самых мощных механизмов, используемых бактериями для ассимиляции железа в организме хозяина, является секреция сидерофоров – высокоаффинных низкомолекулярных хелаторов железа, извлекающих Fe^{3+} из его комплексов с белками (таких как трансферрин и лактоферрин) и доставляющих его внутрь бактерий [95, 114]. Эти хелатирующие железо вторичные метаболиты обнаруживаются почти у всех исследованных патогенных и условно-патогенных бактерий. Однако некоторым микробам они требуются в гораздо меньшей степени. У внутриклеточных паразитов необходимость в собственном синтезе сидерофоров практически отсутствует. Находясь внутри клетки-хозяина, они получают Fe^{3+} из ферритина или гема. Так, мутанты *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, у которых делетированы гены биосинтеза сидерофов, не растут за пределами клеток хозяина, хотя успешно размножаются внутри них [190].

Тем не менее, синтез и секреция сидерофоров является наиболее распространенным механизмом, позволяющим патогенным бактериям преодолеть дефицит железа в организме хозяина.

1.1.4. Использование сидерофоров бактериями для ассимиляции железа

Сидерофоры очень разнообразны по структуре и содержанию различных функциональных групп, обеспечивающих высокоаффинное связывание трехвалентного железа. Анализ структуры сидерофоров, выделенных из разных бактерий, показал, что они являются небольшими молекулами, в состав которых входят гетероциклические соединения и аминокислоты, в том числе не входящие в состав белков, а также модифицированные аминокислоты, остатки жирных, α -кето- и α -гидроксикислот [95, 114]. В настоящее время известны четыре основные группы сидерофоров:

- Фенолятные/катехолатные сидерофоры содержат остатки салициловой кислоты или 2,3-дигидроксibenзойной кислоты;
- Гидроксаматные сидерофоры образованы N-гидроксiliрованными производными диаминов (например, N-гидроксикадаверина или N-гидроксипутресцина);
- Тиазолин/оксазолин-содержащие сидерофоры несут пятичленные гетероциклы, которые образуются при ферментативной циклизации боковых цепей цистеина, серина или треонина;
- Карбоксилатные и гидроксикарбоксилатные сидерофоры включают остатки карбоновых кислот (например, лимонной кислоты).

У многих бактерий структурные элементы сидерофоров разных типов комбинируются, что обеспечивает широкое разнообразие этих молекул.

Механизм ассимиляции железа патогенными грамотрицательными бактериями посредством сидерофоров в организме хозяина включает следующие этапы [50]:

1. Извлечение железа: сидерофоры извлекают трехвалентное железо из его соединений с белками-носителями.
2. Транспорт к бактериям: образованные комплексы железа с сидерофорами диффундируют к поверхности бактерий и связываются со специфическими для каждого сидерофора рецепторами, локализованными на наружной мембране.

3. Активный транспорт в периплазму: после образования комплекса железосидерофор – рецептор комплекс активно транспортируется через внешнюю мембрану в периплазму с использованием белкового комплекса TonB–ExbB–ExbD, функционирующего как источник энергии.

4. Передача в цитоплазму: в периплазме ферри-сидерофоры взаимодействуют с соответствующим связывающим белком (periplasmic binding protein, PBP), который направляет их к ABC-транспортеру внутренней мембраны для последующего транспорта в цитоплазму.

5. Освобождение железа: в цитоплазме ферриредуктаза восстанавливает трехвалентное железо до двухвалентной формы, после чего оно диссоциирует от сидерофора и используется бактерией для своих метаболических нужд или запасается в комплексе с ферритином.

Таким образом, сидерофоры являются сложными низкомолекулярными соединениями, биосинтез и утилизация которых являются многоэтапными процессами, который реализуется с помощью множества ферментов.

1.1.5. Биосинтез и регуляция экспрессии сидерофоров

Известно, что биосинтез, транспорт, а также регуляция экспрессии сидерофоров осуществляются при участии специализированных белковых систем, которые варьируют в зависимости от типа сидерофора. Так, нерибосомные пептид-синтетазы (NRPS) и поликетид-синтетазы (PKS) участвуют в образовании сидерофоров катехолятного и фенолятного типов. NRPS осуществляют синтез пептидов без участия матричной РНК, используя на модульный принцип. Суть данного механизма заключается в том, что порядок активации аминокислот и их включение в формируемую молекулу детерминирован последовательностью расположения модулей в структуре белка [90]. Несмотря на сходство аминокислотных последовательностей NRPS у различных бактерий, синтезируемые ими сидерофоры могут демонстрировать существенные различия. Эволюция этих молекул обусловлена модульной организацией NRPS и PKS, а также способностью к замене модулей и приобретению новых модифицирующих

ферментов посредством горизонтального переноса генов. Данный процесс приводит к формированию новых комбинаций и синтезу разнообразных сидерофоров. Среди сидерофоров, образуемых этим путем, известны иерсиниабактин, энтеробактин и вибриобактин.

Гидроксаматные и карбоксилатные сидерофоры синтезируются при участии ряда ферментов, таких как монооксигеназы, декарбоксилазы, аминотрансферазы и альдолазы. Этот путь, известный как NRPS-независимый синтез (NIS, NRPS-independent synthesis) [48, 139]. В настоящее время ведутся исследования субстратной специфичности и молекулярных механизмов работы ферментов, участвующих в этом процессе. Гены, ответственные за синтез конкретного сидерофора, обычно организованы в кластеры, что обеспечивает их координированную экспрессию. Состав таких кластеров у различных бактерий влияет на структурные характеристики производимых сидерофоров.

В окружающую среду сидерофоры выделяются с помощью специализированных транспортных систем. Сначала белки семейства MFS (Major Facilitator Subtype) переносят их из цитоплазмы в периплазму, а затем белок TolC и связанный с ним эффлюксный насос RND (Resistance-Nodulated-Cell Division) обеспечивают транспорт через наружную мембрану. Эффлюкс сидерофоров представлен и альтернативными путями. Так, в ряде исследований показано участие системы секреции VI типа, широко используемой грамотрицательными бактериями [54, 118].

Биосинтез и транспорт сидерофоров у бактерий подвержены строгому регулированию. Активация синтеза сидерофоров происходит при понижении концентрации железа внутри клетки. Одним из наиболее изученных факторов, оказывающих влияние на этот процесс, является репрессор Fur (Ferric uptake regulator) [193]. В комплексе с двухвалентным железом Fur связывается с консервативными участками промоторных областей генов, отвечающих за биосинтез и транспорт сидерофоров, подавляя их транскрипцию. В условиях дефицита железа репрессия снижается, что приводит к синтезу и экспорту сидерофоров и их рецепторов.

Менее изученным остается механизм регуляции продукции сидерофоров в ответ на концентрацию внеклеточного железа. Сигналы о концентрации железа в среде могут передавать трансмембранные двухкомпонентные регуляторные системы и внеклеточные сигма-факторы. Гены этих белков, как правило, расположены рядом с кластерами биосинтеза сидерофоров. Также сами сидерофоры способны служить сенсорными молекулами, передающими информацию о доступности железа [176]. Этот механизм, при котором ферри-сидерофоры связываются с транскрипционными активаторами, регулируя экспрессию генов их биосинтеза, был предложен как концепция «чувства ферримона» [40].

Система кворум-сенсинга (QS, quorum sensing) также обеспечивает дополнительную регуляцию биосинтеза сидерофоров [100]. Влияние QS на продукцию сидерофоров отмечено у *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Porphyromonas gingivalis* и *Burkholderia cepacia*. В процессе QS бактерии интерпретируют концентрацию сигнальных молекул как показатель плотности популяции, что влечет за собой регулирование синтеза сидерофоров. Важно отметить, что у некоторых видов бактерий накопление сигнальных молекул приводит к подавлению биосинтеза сидерофоров, в то время как у других оно стимулирует его. Вероятно, в случаях подавления сидерофоры необходимы для поглощения железа в фазе активного роста популяции. В противоположном случае, когда синтез сидерофоров активируется QS, эти молекулы могут выполнять иные функции, например, участвовать в межклеточной коммуникации или участвовать в вирулентности бактерий.

1.1.6. Влияние сидерофоров на вирулентность бактерий

В ходе эволюции микроорганизмы, освоившие механизмы извлечения железа из железосвязывающих белков с помощью сидерофоров, приобрели преимущество в колонизации организма млекопитающих, особенно в условиях ограниченной доступности железа [128, 166]. Для многих бактериальных сидерофоров экспериментально подтверждено их значительное влияние на вирулентность как

патогенных, так и условно-патогенных микроорганизмов [104, 106, 114, 141]. Долгое время их роль в патогенезе инфекций рассматривалась исключительно с точки зрения способности обеспечивать бактерии железом. Однако многочисленные данные свидетельствуют о том, что функции сидерофоров гораздо шире [98, 114]. Эти молекулы участвуют в ассимиляции других металлов, таких как медь и цинк, необходимых бактериям для работы многих ферментов. Вместе с тем они способны снижать токсическое действие не только избытка в клетке железа, но и детоксифицировать такие тяжелые металлы, как алюминий, кадмий, галлий, индий и свинец [176].

У многих сидерофоров обнаружена антиоксидантная активность. Это свойство особенно ярко выражено у катехолатных сидерофоров, таких как энтеробактин [14], но также наблюдается и у гидроксаматных сидерофоров [119].

Сидерофоры действуют как сигнальные и регуляторные молекулы, способные активировать как свой собственный синтез [40], так и продукцию других факторов вирулентности. Установлено, что пиовердин *Pseudomonas aeruginosa* стимулирует синтез экзотоксина А и протеазы PrlP, важных факторов вирулентности синегнойной палочки [102].

В формировании биопленок сидерофоры также играют важную роль. Это было экспериментально подтверждено на моделях *E. coli* с редуцированным геномом и мутантах *P. aeruginosa*, не способных продуцировать сидерофор пиовердин [126]. Процесс образования биопленок, особенно на начальных этапах, активирует синтез пиовердина, который способствует созреванию биопленки [104]. Исследования, проведенные на модели *Bacillus subtilis*, показали, что матрикс зрелой биопленки стимулирует более активное и эффективное использование сидерофоров бактериями [171].

В организме хозяина сидерофоры смещают баланс в пользу патогена. Они подавляют резидентную микробиоту, повышают устойчивость возбудителя к сыворотке, лишают фагоциты железа, необходимого для их бактерицидной активности, индуцируют секрецию провоспалительных цитокинов и могут

непосредственно повреждать ткани [162]. Для пиовердина показано, что он секретируется как токсин и нарушает работу митохондрий клеток хозяина [108].

Однако влияние сидерофоров не всегда носит негативный характер. Энтеробактин, например, связываясь с α -субъединицей АТФ-синтазы, облегчает усвоение железа самим организмом хозяина, что указывает на возможный вклад нормальной микрофлоры в поддержание гомеостаза железа [180].

Сидерофоры также играют важную роль в вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Например, *Francisella tularensis*, возбудитель туляремии, синтезирует поликарбоксилатный сидерофор ризоферрин, кодируемый кластером генов *fslA-F* (*Francisella siderophore locus*) [164, 165]. Интересно, что система транспорта сидерофоров через внутреннюю мембрану у *F. tularensis* отличается от классических механизмов, поскольку у микроба отсутствуют гены комплекса *TonB–ExbB–ExbD*. Функцию этого комплекса выполняет белок FupA, участвуя как в сидерофор-зависимых, так и в сидерофор-независимых механизмах ассимиляции железа [149].

На сегодняшний день известно, что возбудитель сибирской язвы, *Bacillus anthracis*, синтезирует два сидерофора: петробактин и бациллобактин [1]. Оба сидерофора необходимы для ассимиляции бактериями железа, хотя бациллобактин играет меньшую роль в этом процессе [99]. Петробактин не узнается белком врождённого иммунитета сидерокалином-2 и считается важным фактором вирулентности, при утрате которого штаммы теряют патогенность [51, 136]. Этот сидерофор синтезируется в лабораторных условиях даже в средах для спорообразования, богатых железом. При этом он накапливается внутри клеток, защищая их от окислительного стресса [91]. В отличие от петробактина, бациллобактин активируется в условиях дефицита железа [118] однако на ранних этапах инфекции его экспрессия подавляется различными факторами врожденного иммунитета млекопитающих. Тем не менее, на поздних стадиях этот сидерофор активно синтезируется и вместе с петробактином способствует спорообразованию, что необходимо для заражения животных [99].

Таким образом, различные сидерофоры играют важную роль в развитии инфекционного процесса, влияя на вирулентность бактерий.

1.1.7. Множественные сидерофорные системы бактерий

Способность бактерий продуцировать несколько сидерофоров, различающихся по структуре и свойствам, обеспечивает им преимущества в адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды [127]. Так, штаммы *K. pneumoniae*, обладающие повышенной вирулентностью (гипервирулентные штаммы – hvKp), синтезируют гораздо больше сидерофоров, чем штаммы классического типа (сKp) [13]. При этом из четырех продуцируемых клебсиеллами сидерофоров (энтеробактин, иерсиниабактин, сальмохелин и аэробактин) аэробактин и сальмохелин более важны для проявления патогенных свойств бактерий.

Интересно, что способностью продуцировать множественные сидерофоры характеризуются и непатогенные штаммы, способные к длительной персистенции в организме хозяина. Например, пробиотический штамм *E. coli Nissle1917* способен синтезировать четыре сидерофора. Среди них иерсиниабактин и сальмохелин демонстрируют повышенную активность в нейтральной и щелочной средах, в то время как энтеробактин и аэробактин более эффективны в кислых условиях [194]. Благодаря продукции этих сидерофоров, штамм *Nissle 1917* конкурирует с патогенами за железо и подавляет колонизацию кишечника сальмонеллами [65].

Некоторые бактерии не синтезируют собственные сидерофоры, но используют чужие, так называемые ксеносидерофоры [137]. Это явление, известное как «сидерофорное пиратство», распространено среди патогенов, которые либо полностью зависят от чужих сидерофоров, либо используют их наряду с собственными [46]. Например, *Bordetella pertussis* продуцирует гидроксаматный сидерофор алкалигин, но также способна поглощать энтеробактин, феррихром и десферриоксамин В [39, 88], благодаря наличию на поверхности клеток специализированных рецепторов этих сидерофоров. У *B. bronchiseptica* спектр дополнительных ксеносидерофоров еще шире – они могут

использовать аэробактин, феррихризин, феррикронин, феррирубин, протохелин, шизокинен, вицибактин и пиовердин [27, 63].

Ксеносидерофоры активно использует и возбудитель холеры, хотя *V. cholerae* синтезирует собственный катехолатный сидерофор вибриобактин, гены биосинтеза и транспорта которого объединены в два кластера на большой хромосоме [147]. Похоже, что вибриобактин-это единственный сидерофор, который синтезируется возбудителем холеры. Мутанты, у которых удалены гены, отвечающие за биосинтез вибриобактина, не проявляют сидерофорную активность на индикаторных средах. Однако в геноме *V. cholerae* имеются *irgA* и *vctA* гены, кодирующие рецепторы энтеробактина, который наиболее активно используется патогеном в момент колонизации тонкого кишечника [46].

Таким образом, способность к синтезу и/или поглощению различных сидерофоров является важным фактором, обеспечивающим адаптацию и выживание патогенных бактерий в организме млекопитающих. Установлено, что комбинация продуцируемых бактерией сидерофоров определяет ее «репликативные ниши» и модулирует иммунный ответ хозяина на инфекцию [98].

1.2 Системы ассимиляции железа возбудителя чумы

Бактерии *Y. pestis* способны ассимилировать двух- и трехвалентное свободное железо, а также извлекать железо из гема и из комплексов с белками [151]. Анализ большого числа геномов *Y. pestis* различных подвидов и биоваров, а также экспериментальные данные показали, что возбудитель чумы кодирует множество систем утилизации железа [80].

Y. pestis содержит системы поглощения железа из гема и гемопотеинов. В этом процессе участвуют транспортеры ABC-типа (HmuP^{RSTUV}), типичные для грамотрицательных бактерий, а также TonB-зависимый рецептор наружной мембраны HmuR [191]. При отсутствии этого белка бактерии теряют способность использовать гем-содержащие субстраты, но при этом не теряют вирулентность. Хотя *Y. pestis* кодирует другую систему утилизации гемового железа (hasRADEB и hasF), ее участие в ассимиляции гема подтвердить не удалось [173]. Более того,

мутанты, в которых отсутствуют обе системы утилизации гемового железа, сохраняли вирулентность при бубонной форме чумы.

Бактерии *Y. pestis* кодируют четыре системы (Yfe, Feo, Fet, Efe) транспорта двухвалентного железа [152]. Функциональность трех из них (Yfe, Feo и Fet) была продемонстрирована экспериментально *in vitro*. Установлено, что Yfe и Feo системы важны для вирулентности бактерий при бубонной, но не легочной форме чумы [74].

Геном *Y. pestis* кодирует три системы ABC-транспортеров трехвалентного железа (Yfe, Yfu и Yiu). Участие Yfu и Yiu транспортеров в ассимиляции металла *in vitro* было доказано [109], однако эти системы не важны для развития бубонной чумы. Очевидно, они могут действовать после попадания ионного железа в периплазму с помощью неких низкоаффинных систем транспорта свободного железа (например, поринов). Однако для поглощения железа из нерастворимых комплексов или из комплексов с белками в организме млекопитающих бактерии обычно используют сидерофоры.

В геноме *Y. pestis* имеются несколько кластеров, способных кодировать сидерофор-зависимые системы ассимиляции трехвалентного железа. Кластер биосинтеза аэробактина содержит ген *iucA*, который несет мутацию со сдвигом рамки считывания, что приводит к невозможности возбудителя чумы синтезировать этот сидерофор [79]. Однако бактерии сохраняют способность утилизировать аэробактин, очевидно, благодаря сохранению интактных генов его транспорта. У псевдотуберкулезного микроба аэробактиновый кластер сохраняет интактную структуру всех генов и способность синтезировать сидерофор [119].

Еще один кластер, *unp* локус *Y. pestis*, частично гомологичный генам биосинтеза и транспорта Ybt, в штаммах основного подвида *Y. pestis* содержит инсерцию IS100 в одном из генов биосинтеза потенциального сидерофора, однако в штаммах псевдотуберкулезного микроба *unp* локус не содержит этой мутации и способен кодировать сидерофор, получивший название псевдохелин [163].

Первым сидерофорным кластером, обнаруженным у возбудителя чумы и других иерсиний, явился *ybt* локус, кодирующий фенолятный сидерофор

иерсиниабктин, изучению которого посвящены многочисленные исследования, проводимые учеными разных стран мира на протяжении трех десятилетий.

1.2.1. Иерсиниабктин – первый сидерофор, обнаруженный у возбудителя чумы

Изучение иерсиниабактина на модели чумного микроба показало, что он кодируется *ybt* опероном, расположенным в нестабильном хромосомном *pgm* локусе *Y. pestis*. Экспериментально доказано, что иерсиниабктин необходим для ассимиляции железа при 37°C и является важным фактором вирулентности возбудителя чумы [76]. Так, мутации генов, отвечающих за синтез этого сидерофора, приводят к неспособности штаммов вызывать летальный инфекционный процесс у экспериментальных животных при подкожном способе заражения [28].

Синтез иерсиниабактина осуществляется с помощью последовательного действия ряда белков *ybt* оперона [86]. Субстратами для биосинтеза сидерофора являются салицилат, три молекулы цистеина, малонат и три метильные группы. Начальные этапы синтеза обеспечиваются двумя полимодульными белками-ферментами, которые представляют собой нерибосомную пептид-синтетазу и поликетид-синтетазу. Помимо этих двух ферментов, в биосинтезе сидерофора участвуют еще пять белков (YbtD, YbtE, YbtS, YbtT и YbtU). Последовательное действие вышеперечисленных белков, приводит к образованию молекулы, включающей один остаток салициловой кислоты, два тиазолиновых и одно тиазолидиновое кольцо, которые образуют пять хиральных центров и обеспечивают связывание сидерофором трехвалентного железа в соотношении 1:1 [69].

После синтеза Ybt экспортируется из бактерий во внешнюю среду, однако молекулярный механизм этого процесса в течение многих лет не удавалось идентифицировать. Однако недавние исследования продемонстрировали участие в процессе секреции иерсиниабактина оперона, кодирующего белки эффлюксной системы AcrA-AcrB-TolC [161]. Хотя делеция генов, кодирующих эти белки, приводила к резкому снижению секретируемого Ybt, часть сидерофора все же

наблюдалась в среде бактерий, не подвергшихся спонтанному лизису. Эти данные привели авторов к заключению, что у чумного микроба имеются и другие системы экспорта Ybt, которые все еще необходимо обнаружить. Экспортированный бактериями Ybt в организме животных экстрагирует железо из его комплексов с белками (например, с трансферрином и/или лактоферрином), после чего Ybt-Fe транспортируется внутрь бактерий с помощью TonB-зависимого рецептора внешней мембраны Psn [73] и двух ABC-транспортеров внутренней мембраны YbtP и YbtQ [75]. Механизмы отделения железа от Ybt внутри клетки, а также его дальнейшая судьба (разрушение или рециклизация) пока не изучены.

Экспрессия белков-ферментов, участвующих в биосинтезе и транспорте Ybt, регулируется репрессором Fur, который после связывания с двухвалентным железом в цитоплазме бактерий тормозит транскрипцию генов *ybt* оперона. Повышение синтеза Ybt происходит при участии позитивного регулятора транскрипции YbtA, который после связывания с нагруженным железом сидерофором активирует транскрипцию генов его биосинтеза и транспорта [153]. Такой механизм обеспечивает обратную связь между наличием в среде источника железа, узнаваемого Ybt, и генетическим аппаратом, обеспечивающим синтез этого сидерофора.

Сидерофор иерсиниабактин обнаружен не только у высокопатогенных иерсиний, таких как *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* биотипа 1B, но и у других патогенных энтеробактерий, которым он также необходим для вирулентности. Хотя структура и генетические детерминанты этого сидерофора у возбудителя чумы и других микробов детально изучены, механизм его участия в патогенезе инфекций остается предметом исследования. На модели возбудителя чумы установлено, что Ybt, помимо участия в ассимиляции железа, выполняет и другие функции. У него выявлена антиоксидантная активность [52, 140], а также способность связывать ионы цинка [33] и меди [53].

1.2.2. Иерсиниахелин – второй сидерофор возбудителя чумы

Гипотеза о наличии у возбудителя чумы криптической системы ассимиляции железа, функционирующей при 26°C, была высказана еще в 1996 г. [122]. Однако до настоящего времени она не получила экспериментальных доказательств.

Впервые низкомолекулярный компонент, обладающий сидерофорной активностью, был обнаружен в препарате фактора аутоагглютинации (ФА), который был выделен с поверхности бактерий штамма *Y. pestis* EV76, выращенных при 26°C [157]. Характеристика ФА показала, что в его состав входит белок YPO0502, Hcp (hemolysin-coregulated protein) компонент внеклеточного аппарата системы секреции шестого типа (T6SS), охарактеризованной у многих грамотрицательных бактерий [84]. Известно [170], что этот компонент T6SS образован из мономерных субъединиц массой около 17 кДа, которые собираются на поверхности клеток в пилеобразные структуры, через которые бактерии впрыскивают различные токсичные эффекторы в клетки конкурирующих бактерий и эукариотов [83]. Сидерофор, связанный с ФА, был идентифицирован как новый сидерофор возбудителя чумы, поскольку он был выявлен в штамме *Y. pestis* EV76, который не имеет генов, кодирующих синтез Ybt [158]. Химический анализ этого сидерофора, получившего название иерсиниахелин (Ych), показал, что он содержит гидроксаматные группы.

Потенциальным локусом, способным кодировать гидроксаматный сидерофор в геноме чумного микроба, является *ysu* локус. Участие этого локуса в продукции сидерофора было подтверждено анализом нокаутного мутанта *Y. pestis* EV76, у которого были удалены три гена этого локуса (*ysu* 1530-1532). В отличие от родительского штамма, мутант не продуцировал Ych. В этой связи название *ysu* локуса можно расшифровать как *yersiniachelin synthesis utilization*. Поиск аналогов каждого из генов биосинтеза Ych среди гетерологичных бактерий [163] показал, что они имеют частичную гомологию с *alc* генами, которые кодируют биосинтез и транспорт гидроксаматного сидерофора алкалигина (Alc), важного фактора вирулентности бактерий рода *Bordetella*.

Сравнение локусов *usu* и *alc* выявило сходство последовательностей ДНК ряда генов и кодируемых ими белков (Рисунок 1). Гомология очевидна в четырех генах, участвующих в биосинтезе (*alcABC* и *upo1530-1532*) и рецепторах (*fauA* и *upo1537*) двух сидерофоров, а также в генах ферри-редуктазы (*alcD* и *upo1528*). Однако, в отличие от *alc* локуса, в *usu* локусе нет гомолога гена транспортного белка *alcS*, участвующего в экспорте синтезированного алкалигина клетками *Bordetella* [38]. Поэтому механизм экспорта иерсиниахелина клетками иерсиний остается неизвестным. В то же время связь этого сидерофора с компонентом T6SS [158] позволяет предположить участие этой системы секреции в экспорте Ych. О возможном участии этой системы секреции грамотрицательных бактерий в экспорте сидерофоров свидетельствуют данные, полученные на модели *Pseudomonas taiwanensis*. Мутации по компонентам T6SS приводили к неспособности бактерий выделять в среду пиовердин, основной сидерофор псевдомонад [54].

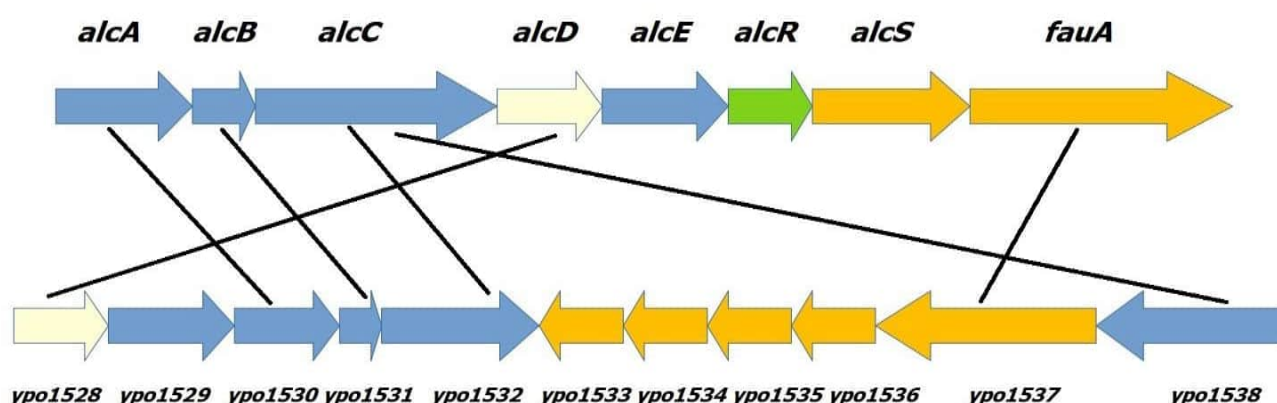


Рисунок 1 – Сравнение кластеров генов, кодирующих продукцию алкалигина в штамме *Bordetella pertussis* и иерсиниахелина – в штамме *Y. pestis* CO92

Примечание:

Гены биосинтеза сидерофоров показаны синим цветом, транспортные гены – оранжевым, регуляторные гены – зеленым, а гены ферри-редуктазы – светлым.

Рисунок модифицирован из статьи [163] с позволения авторов

Экспрессия *usu* генов подтверждается многочисленными исследованиями разных штаммов *Y. pestis*, выращенных в различных условиях *in vitro* и *ex vivo* в плазме человека и макрофагах, а также *in vivo* в инфицированных блохах и

млекопитающих. Анализ данных всех этих экспериментов [163] свидетельствует о повышении активности генов *usi* локуса не только в железодефицитных условиях, что характерно практически для всех сидерофоров, но и под влиянием осмотического стресса. Эти данные, а также связь иерсиниахелина с поверхностным компонентом T6SS в условиях избытка железа и усиление активности генов его биосинтеза под действием осмотического стресса позволяет предположить, что этот сидерофор может иметь специфические свойства и играть дополнительную роль в физиологии *Y. pestis*, помимо ассимиляции железа [158]. Выяснение специфичности Ych для возбудителя чумы и определение его функциональной роли явились предметом экспериментальных исследований в настоящей диссертационной работе.

Таким образом, анализ данных литературы, посвященных сидерофорам, свидетельствует о возрастающем интересе ученых к фундаментальным аспектам изучения этих молекул. Так, количество публикаций, посвященных изучению разнообразных функций сидерофоров и их роли в патогенезе инфекций, стремительно увеличивалось в течение последних двух десятилетий [204]. Многие из этих работ посвящены разработке различных направлений практического применения сидерофоров.

1.3 Практическое применение сидерофоров

1.3.1. Использование сидерофоров в биотехнологии и медицине

Многолетние фундаментальные исследования структуры и функций различных сидерофоров открыли перспективы их практического применения для самых различных целей [160]. Последние годы ученые активно исследуют сидерофоры на предмет их использования в биотехнологии. Исследования показали многообещающие перспективы применения данных хелаторов в различных сферах, включая сельское хозяйство, пищевую промышленность, а также в процессах биологической рекультивации почв и очистки водных растворов от тяжёлых металлов [17, 208]. Разработки, направленные на использование сидерофоров в биотехнологических целях, были проведены и на модели Ybt

чумного микроба, выделенного из рекомбинантного штамма кишечной палочки. Способность этого сидерофора связывать не только железо, но и медь открывает перспективы его использования для лечения болезни Вилсона, при которой избыток меди накапливается в тканях [16]. Достигнутые успехи вдохновили исследователей искать возможности использования этого сидерофора не только в биомедицинских, но и в технологических целях [15]. Как выяснилось, модификация структуры рекомбинантного Ybt с помощью методов генной инженерии приводит к появлению у него способности связывать золото [188].

Сидерофоры и их производные нашли широкое применение и в современной медицине для лечения самых разных заболеваний. Так, более 50 лет сидерофор десферриоксамин В (Десферал), продуцируемый *Streptomyces pilosu*, используется для лечения гиперферримии. Получен ряд данных, свидетельствующих о перспективности использования сидерофоров и их рецепторов для профилактики инфекций и создания химических вакцин.

1.3.2. Использование сидерофоров для профилактики инфекций

У ряда сидерофоров обнаружена протективная активность. Экспериментально показано, что конъюгаты сидерофоров и их комплексов с железом с белками способствуют выработке антител к сидерофорам. Так, синтетический аналог вибриобактина в комплексе с овальбумином или бычьим сывороточным альбумином способствовал выработке антител у мышей [31]. Поэтому сидерофоры стали рассматриваться как перспективные молекулы для разработки вакцин. Иммунизация животных конъюгатом сидерофора с белком носителем типа бычьего сывороточного альбумина или В-субъединицы холерного токсина приводила к выработке значительного количества антител к сидерофору и защите животных от инфекции *Salmonella* spp [175].

Протективная активность выявлена не только у самих сидерофоров, но и у их рецепторов, экспонированных на поверхности бактерий [198, 199]. В частности, рецептор сидерофора иерсиниабактина проявляет выраженную протективную активность в отношении уropатогенных кишечных палочек [43]. Иммунизация

домашних птиц рецептором сидерофоров, выделенным из *E. coli* 078 или *Salmonella* spp. приводила к выработке антител к этим бактериям, повышению их опсонизации и чувствительности к комплементу, а также торможению ассимиляции бактериями железа [205].

Эти результаты стали основой для будущих исследований сидерофоров и их рецепторов с целью разработки на их основе новых профилактических препаратов и химических вакцин. Однако в настоящее время максимальное количество данных о перспективах практического применения сидерофоров получено при их использовании для лечения инфекционных заболеваний [145].

1.3.3. Использование сидерофоров для лечения инфекционных заболеваний

Важность ассимиляции патогенными бактериями железа в организме хозяина сделала сидерофоры привлекательным объектом для разработки новых подходов к лечению инфекционных заболеваний. В настоящее время работа проводится в трех направлениях: применение гетерологичных, природных или синтетических, сидерофоров, которые не могут утилизироваться конкретным возбудителем и вследствие этого обладают антибактериальной активностью; конструирование сидеромицинов, представляющих собой конъюгаты сидерофоров с антибиотиком; создание ингибиторов, препятствующих биосинтезу эндогенных сидерофоров [192].

Использование гетерологичных сидерофоров. Исследование различных микробов показало, что сидерофоры, выделенные из одного вида бактерий, ингибируют рост клеток другого вида. Анализ механизмов этого явления позволил установить, что он связан с конкуренцией между сидерофорами двух видов бактерий за железо. Этот факт стимулировал поиск гетерологичных сидерофоров, обладающих антибактериальной активностью в отношении конкретных бактерий. Так, у сидерофоров *Azospirillum lipoferum* обнаружено бактерицидное действие на такие бактерии, как *Azotobacter*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus*

aureus и *Bacillus*. Сидерофор фузиген проявлял антимикробную активность в отношении *Vibrio anguillarum* и *Vibrio parahaemolyticus* [57, 78, 183, 200].

Антимикробную активность демонстрируют не только природные, но и искусственные сидерофоры, циклопирокс, деферипрон, деферасирокс, которые подавляют рост таких патогенных микроорганизмов, как *Plasmodium*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas* и *Staphylococcus*. Исследования показали, что ингибирующее действие на рост бактерий гетерологичных природных и синтетических сидерофоров усиливается при их сочетании с солями галлия [20, 26, 81].

Создание ингибиторов биосинтеза сидерофоров. С начала 1970 гг известно, что ассимиляция железа возбудителем туберкулеза может быть частично ингибирована парааминосалициловой кислотой. Молекулярные механизмы этого эффекта в то время установлены не были, но сейчас эти результаты могут быть объяснены торможением фермента, нерибосомной пептид-синтетазы, участвующей в синтезе сидерофора микобактина. Подобные ферменты привлекли внимание исследователей как мишень для ингибирования синтеза сидерофоров. После расшифровки кристаллических структур многих из этих ферментов, стало возможным целенаправленное конструирование ингибиторов их каталитического центра [117]. На протяжении ряда лет учеными проводился поиск мощных и селективных искусственных ингибиторов ферментов биосинтеза сидерофоров [45, 72, 123, 187]. Однако эти разработки пока не нашли практического применения. Интенсивное развитие получило другое направление исследований – использование сидерофоров в качестве «Троянского коня» для доставки антимикробных препаратов внутрь бактериальной клетки [141].

Конструирование сидеромицинов. Достаточно узкая специфичность отдельных сидерофоров дает возможность использования их конъюгатов с антибиотиками в отношении конкретного вида бактерий. При этом сидерофорная часть обеспечивает селективное действие конъюгата, который узнается на поверхности бактерий специфическим сидерофорным рецептором, транспортирующим молекулу внутрь бактерий, где действует уже антимикробная

часть молекулы [24, 66, 129]. Подобные конъюгаты, получившие название сидеромицинов и микроцинов, известны и в природе [177]. Примером природных сидеромицинов является альбомуцин, который представляет собой аддукт гидроксаматного сидерофора феррихрома с пептидилнуклеозидным антибиотиком [207]. Другими примерами являются микроцины, которые продуцируются энтеробактериями и представляют собой синтезируемые рибосомами антибактериальные пептиды, модифицированные посттрансляционно сидерофором [169]. Таким образом, сама природа была первым разработчиком технологии «Троянского коня», использующей сидерофоры для доставки антибиотиков внутрь бактерий.

Природные сидеромицины вдохновили исследователей на создание искусственных соединений для целенаправленного специфического уничтожения бактерий [101, 120, 129]. Различные антибиотики (β -лактамы, фторхинолоны, макролиды) были выбраны для соединения с разными природными сидерофорами, а также с искусственными молекулами, обладающими сидерофорными свойствами [34].

В настоящее время несколько сидерофоров, конъюгированных с β -лактамными антибиотиками, прошли доклинические и клинические испытания: MC-1 (monocarbam), BAL30072 (monosulfactam), GSK3342830 (cephalosporin) и оказались эффективными против полиантибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий. Конъюгат искусственного катехолатного сидерофора с цефалоспорином, Cefiderocol, является первым препаратом, одобренным ВОЗ [202], и применяется в США и Евросоюзе для внутривенного введения взрослым людям при лечении серьезных инфекций, вызванных полиантибиотикорезистентными грамотрицательными бактериями [189].

Таким образом, технология «Троянского коня», обладающая селективным действием и минимальными побочными эффектами в организме млекопитающих, продемонстрировала свою эффективность для преодоления антибиотикорезистентности патогенных бактерий [12, 61]. Тем не менее, исследования в данном направлении продолжают развиваться [167]. Помимо

получения новых сидеромицинов, ученые фокусируются на изучении механизмов их действия и на повышении их эффективности *in vivo* [107]. При этом активно используются методы химического синтеза, аналитической химии и структурной биологии, которые позволят поднять на новый уровень исследования в области, имеющей огромное влияние на здоровье людей [116]. Хотя для широкого использования конъюгатов сидерофоров с антибиотиками в клинике предстоит решить еще массу проблем, обнадеживающие доклинические исследования открывают блестящие перспективы использования этой инновационной технологии.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТОВ СИДЕРОФОРА ИЕРСИНИАХЕЛИНА

2.1. Биоинформационный анализ *usi* локуса иерсиний

Биоинформационный анализ *usi* локуса показал наличие в нем двух оперонов (Рисунок 2). В одном находится ген ферриредуктазы (*урo1528*), а также четыре гена (*урo1529-1532*), которые кодируют белки, участвующие в синтезе иерсиниахелина. Второй оперон (*урo1533-1537*) содержит гены, отвечающие за транспорт внутрь бактерий этого сидерофора, нагруженного железом.

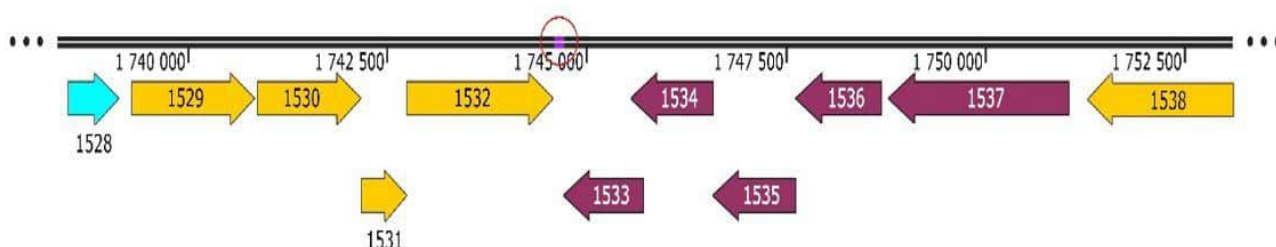


Рисунок 2 – Структура *usi* локуса в штамме *Y. pestis* CO92

Примечание:

Гены биосинтеза иерсиниахелина обозначены желтым цветом, бордовым цветом- транспортные гены, голубым- ген ферриредуктазы

Первый ген оперона биосинтеза иерсиниахелина, *урo1528*, который гомологичен гену *alcD* бордетелл, кодирует ферриредуктазу, необходимую для извлечения железа из комплекса с сидерофором внутри клетки. Однако ферриредуктазы могут выполнять и другую функцию. Известно, что некоторые патогенные бактерии используют ферриредуктазы для восстановления Fe^{3+} , связанного с белками, до Fe^{2+} . Не исключено, что продукт гена *урo1528* также может иметь дополнительную функцию, связанную с восстановлением внеклеточного железа, которое может транспортироваться в бактерии системами транспорта двухвалентного железа.

За геном ферриредуктазы расположены четыре гена *урo1529-1532*, которые кодируют ферменты, участвующие в биосинтезе иерсиниахелина. Ген *урo1529* гомологичен гену *odc*, кодирующему орнитин-декарбоксилазу, которая запускает

биосинтез алкалгина бордетелл путем декарбоксилирования орнитина [41]. Детальный анализ генов орнитин-лизин-декарбоксилаз разных бактерий показал, что *уро1529* кодирует не орнитин-, а лизин-декарбоксилазу [44], поэтому продуктом действия такого белка должен быть кадаверин. Следующий ген, *уро1530*, гомологичен гену *alcA*, который кодирует N-гидроксилазу. Ген *уро1531* гомологичен гену *alcB*, и его продукт осуществляет N-ацетилирование гидроксиламиновой группы. Ген *уро1532* гомологичен *alcC*, который осуществляет димеризацию и макроциклизацию синтезируемого сидерофора.

Оперон, который содержит гены, ответственные за транспорт сидерофора, представлен четырьмя генами *уро 1533-1537*, которые кодируют рецептор иерсиниахелина (*уро1537*), а также белки (*уро 1533-1536*), осуществляющие его транспорт через внешнюю и внутреннюю мембраны. При этом в опероне транспорта сидерофора нет гомолога гена *alcS*, который кодирует белок, участвующий в экспорте алкалгина клетками бордетелл. Поэтому механизм экспорта иерсиниахелина, синтезированного клетками иерсиний, в настоящее время неизвестен. Также в опероне транспорта сидерофора присутствует ген *уро 1538*, который гомологичен генам, кодирующим сидерофор-синтетазы у других видов бактерий. Исследование его нуклеотидной последовательности у штамма *Y. pestis* KIM выявило мутацию, обуславливающую сдвиг рамки считывания [80]. В совокупности с отсутствием сидерофорной активности на индикаторной среде у различных штаммов *Y. pestis*, не продуцирующих иерсиниабактин, это свидетельствует о неспособности *usu* локуса кодировать синтез сидерофора. Однако анализ гена *уро1538* показал, что он является копией гена *уро 1532*, не содержащего видимых мутаций [158]. Способность *usu* локуса обеспечивать синтез иерсиниахелина, несмотря на присутствие мутантного гена, подтвердилась экспериментально в наших дальнейших исследованиях. Структурным генам, отвечающим за биосинтез иерсиниахелина, предшествует некодирующая область (Рисунок 3), содержащая регуляторные последовательности: промотор, включающий сайты узнавания (-35) и связывания (-10) РНК-полимеразы, а также три сайта узнавания Fur белка (Fur box), являющиеся важными регуляторными

элементами. Наличие этих участков свидетельствует о регуляции биосинтеза иерсиниахелина концентрацией железа в среде.

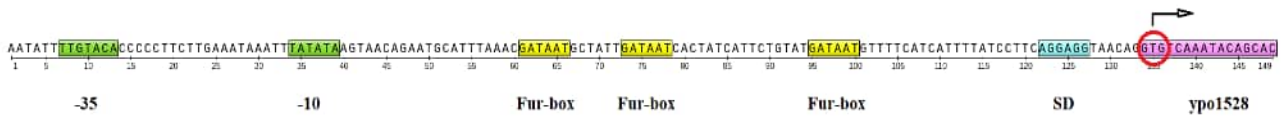


Рисунок 3 – Нуклеотидная последовательность промоторной области оперона биосинтеза иерсиниахелина

Примечание:

Зеленым цветом отмечены последовательности сайта узнавания (-35) и связывания (-10, Прибнов бокс) РНК-полимеразы. Желтым цветом выделены последовательности трех Fur-боксов. Синим цветом окрашена последовательность Шайна-Дальгарно (SD – сайт связывания рибосом на молекуле мРНК). Розовым цветом показан первый ген ферриредуктазы *yro1528*

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 [154, 168], 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 [94].

Хотя в межгенной области *usi* 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-кодом последнего гена (*уро* 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 [130]. 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).

2.2. Анализ специфичности генетических детерминантов иерсиниахелина

Генетические детерминанты, кодирующие биосинтез и транспорт иерсиниахелина, выявлялись абсолютно во всех проанализированных геномах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* с помощью компьютерной программы BLAST, а также при использовании программы «SiderophoreAnalyzer», которая была разработана в рамках настоящего исследования. Эта программа позволяет выявлять в геномах энтеробактерий гены биосинтеза и рецепторов таких широко распространенных сидерофоров, как энтеробактин, аэробактин, сальмохелин и иерсиниабактин, а также специфичные для иерсиний сидерофоры: псевдохелин, пестибактин и иерсиниахелин.

В настоящем исследовании программа «SiderophoreAnalyzer» была применена для поиска генов биосинтеза (аналогов *уро* 1530) и рецептора (аналогов *уро* 1537) сидерофора иерсиниахелина в геномах различных видов бактерий из базы данных NCBI. Этот поиск показал, что оба гена не выявляются в геномах гетерологичных видов энтеробактерий, что свидетельствует об отсутствии в их хромосоме кластеров, кодирующих иерсиниахелин. При этом анализ полногеномных последовательностей различных штаммов иерсиний показал, что оба исследуемых гена присутствуют в геномах всех проанализированных штаммов двух видов иерсиний (583 штаммах *Y. pestis* и 302 штаммах *Y. pseudotuberculosis*).

Ни одного штамма чумного или псевдотуберкулезного микроба, в которых анализируемые гены не выявлялись, нам обнаружить не удалось.

Сравнительный анализ с помощью программы BLAST, а также авторского скрипта, нуклеотидной последовательности отдельных генов *usu* локуса, кодирующих биосинтез и транспорт иерсиниахелина в разных штаммах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, показал, что все гены этого локуса имеют высокую степень гомологии (98-99%). Полученные данные свидетельствуют об эволюционной стабильности генов, кодирующих специфичный для *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* сидерофор иерсиниахелин, и о важности этого сидерофора для двух видов иерсиний.

Несмотря на значительное сходство структурных генов, отвечающих за синтез иерсиниахелина у двух видов иерсиний, установлены различия в нуклеотидных последовательностях *usu*-терминатора. Интересные результаты получены при сравнении *usu*-терминатора штамма *Y. pestis* CO92 с аналогичной областью других штаммов иерсиний. Оказалось, что 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. Таким образом, было показано наличие переменных тандемных повторов (VNTR - variable number tandem repeats) (Рисунок 4).

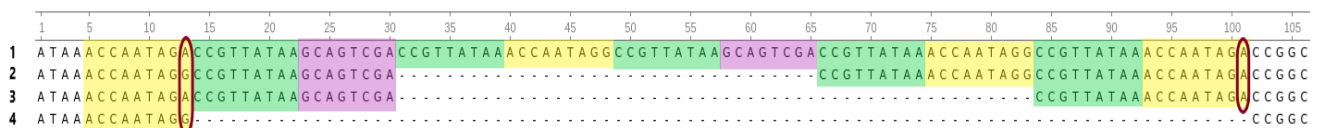


Рисунок 4 – Фрагмент *usu*-терминатора оперона биосинтеза иерсиниахелина

Для оценки влияния этих VNTR в структуре *usu*-терминатора на экспрессию иерсиниахелина опероны биосинтеза этого сидерофора, различающиеся по величине терминаторной области, были клонированы в клетках кишечной палочки.

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

Структурные вариации терминатора транскрипции в *usu* локусе 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. Для амплификации генов, участвующих в биосинтезе иерсиниахелина, посредством ПЦР были разработаны специфические праймеры *usuF* и *usuR*. Их дизайн был основан на анализе нуклеотидных последовательностей обоих штаммов, доступных в базе данных NCBI (Таблица 2).

Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности праймеров, комплементарных *usu* локусу иерсиний

Название	Нуклеотидная последовательность
<i>usuF</i>	5' CGTTGCCGGATCATTTACTGACCCTGAAT 3'
<i>usuR</i>	5' CGTTGCCGGATCATTTACTGACCCTGAAT 3'

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. Для того, чтобы убедиться в верности конструкции плазмид использовали метод ПЦР с несколькими вариантами праймеров: M13rev, который комплементарен участку векторной плазмиды, и пара праймеров, использованная для получения ПЦР-копии *usu* локуса (Таблица 2). Сохранение интактной структуры обоих оперонов после клонирования дополнительно было подтверждено с помощью секвенирования двух рекомбинантных плазмид.

Введение плазмид pSC-A-KIM и pSC-A-YPIII в экспериментальный штамм *E. coli* H1884 Δ entDF, 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 5). Полученные данные свидетельствуют о влиянии различий в структуре терминатора *usu* локуса двух видов иерсиний на экспрессию генов, входящих в оперон биосинтеза иерсиниахелина.

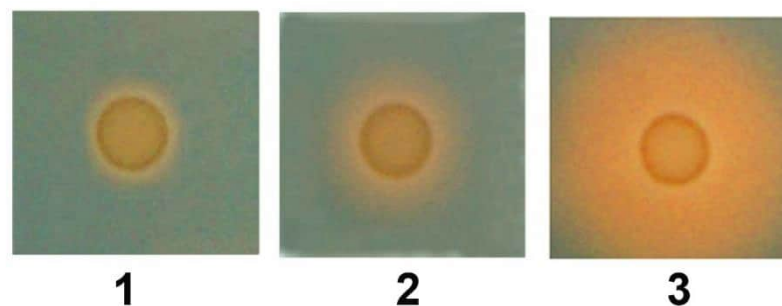


Рисунок 5 – Сидерофорная активность трех вариантов штамма *E. coli* H1884 Δ entDF

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 разных 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 [56], 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 псевдотуберкулезного по сравнению с чумным микробом, может иметь важное значение для повышенного уровня экспрессии иерсиниахелина. Однако нельзя исключить, что большее количество VNTR, роль которых в функционировании терминаторов в настоящее время неизвестна, также могут вносить определенный вклад в повышенную экспрессию оперона биосинтеза иерсиниахелина псевдотуберкулезного микроба. Вероятно, способность оперона биосинтеза иерсиниахелина возбудителя псевдотуберкулеза обеспечивать повышенную продукцию сидерофора по сравнению с чумным микробом может компенсировать отсутствие иерсиниабактина у большинства штаммов *Y. pseudotuberculosis* [10, 58].

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.

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

В настоящем исследовании для идентификации VNTR-маркеров у различных штаммов иерсиний были разработаны праймеры *usu-interF/R* (Таблица 3). Эти праймеры комплементарны консервативным областям, фланкирующим переменные участки *usu*-терминатора, и обеспечивают дифференциацию штаммов по размеру ампликона, получаемого в ходе ПЦР.

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности праймеров, комплементарных константным областям, обрамляющим вариабельные участки *usu*-терминатора

Название	Нуклеотидная последовательность
<i>usu-interF</i>	5' AGCACATGCTGGATTTAGCTGAC 3'
<i>usu-interR</i>	5' AAGCCTTTGGTGATACCCCG 3'

Для анализа геномов иерсиний *in silico* был создан скрипт, позволяющий определить размер виртуального ампликона, формирующегося при применении указанных праймеров. Исследование геномов 583 штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI выявило единообразие размеров ампликонов (239 п.н.) у всех исследованных штаммов, независимо от периода выделения, географического местонахождения, подвида или биовара. Кроме того, анализ нуклеотидных последовательностей полученных ампликонов показал их полную идентичность, даже в области, содержащей VNTR. Полученные данные позволяют предположить наличие определенного функционального значения межгенной области *usu* локуса у чумного микроба.

В то же время анализ в ПЦР *in silico* с помощью сконструированных праймеров 303 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI выявил вариацию длины ампликона (292-257-239-204 п.н.). Важно отметить, что большинство исследованных штаммов (221 из 303) давали фрагмент длиной 257 п.н. Для установления возможной корреляции между различиями в размере ампликонов и серопринадлежностью штаммов *Y. pseudotuberculosis* был проведен анализ серотипов всех 303 исследованных штаммов. Ввиду отсутствия сведений о серотипах большинства анализируемых штаммов в имеющихся базах данных, их определение было проведено посредством геномного анализа методом ПЦР *in silico* с использованием метода гено-серотипирования [35]. При таком анализе 303 геномов удалось установить серотип лишь у 154 штаммов, большинство из которых принадлежат к серотипам O:1a и O:1b, но в небольшом количестве в базе данных представлены и штаммы O:2-O:5 серотипов.

Исследованные нуклеотидные последовательности штаммов *Y. pseudotuberculosis* с помощью праймеров *ysu-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*, независимо от принадлежности к различным подвидам и биоварам. Четвертая группа представлена 26 штаммами *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b, имеющими длину ампликона 204 п.н.

С помощью сконструированных праймеров *ysu-interF/R* проведено исследование методом ПЦР *in vitro* следующих штаммов иерсиний: 55 *Y. pestis* и 100 *Y. pseudotuberculosis* (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты анализа штаммов иерсиний в ПЦР с праймерами *ysu-interF/R*

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

Продолжение таблицы 4

Серотип O:5a	2	3	257
<i>Yersinia pestis</i>			
Основной подвид	583	36	239
Неосновные подвиды		19	239

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. (Рисунок 6).

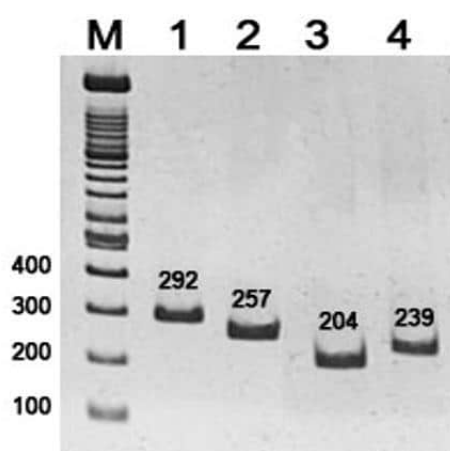


Рисунок 6 – Электрофореграмма в 8% полиакриламидном геле ампликонов, полученных в ПЦР *in vitro* при использовании ДНК разных штаммов *Y. pseudotuberculosis* в качестве матриц и праймеров *ysu-interF/R*. Маркеры ДНК-100 п.н. №323-1 (BioLabs, США)

Все штаммы чумного микроба, в свою очередь, как в ПЦР *in vitro*, так и *in silico*, давали одинаковый ампликон длиной 239 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.

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 [186].

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

ГЛАВА 3. 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.

3.1. Конструирование рекомбинантной плазмиды, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина из штамма *Y. pestis* EV76

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 *ypo1529-1532*) была лигирована с плазмидным вектором pSC-A-amp/kan (4,3 тыс. п.н.) (Рисунок 7 А, В).

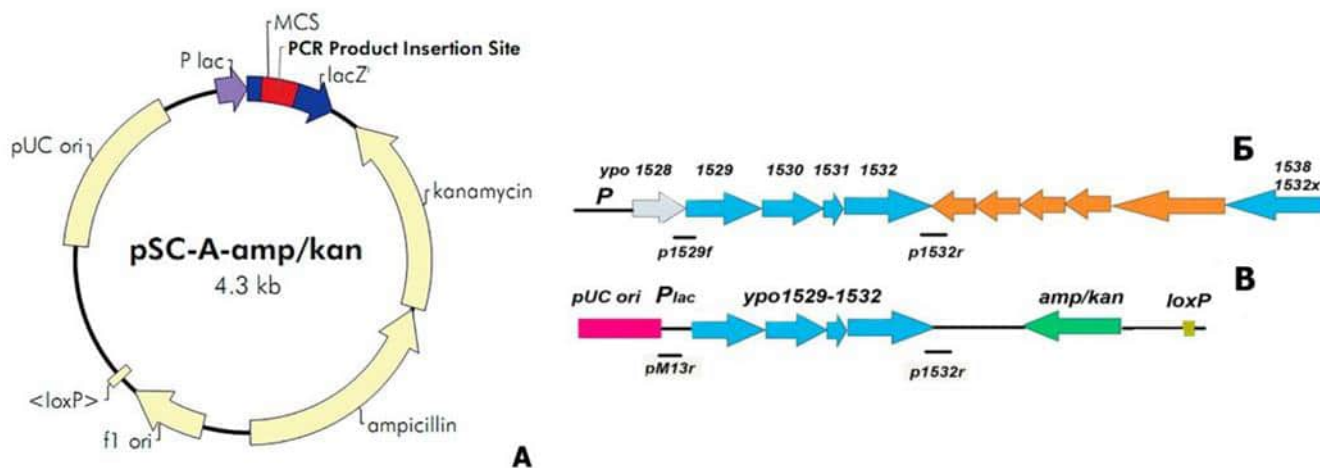


Рисунок 7 – Клонирование генов биосинтеза иерсиниахелина в плазмидном векторе pSC-A-amp/kan

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* (Таблица 5). В качестве

матрицы была использована хромосомная ДНК вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 (Рисунок 7 Б).

Таблица 5 – Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для получения ПЦР-копии четырех генов биосинтеза иерсиниахелина

Название	Нуклеотидная последовательность
<i>p1529F</i>	5' CCAAGTTCCTGCATTAGACAGA 3'
<i>p1532R</i>	5' CGTTGCCGGATCATTAAGTACCCTGAAT 3'

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 (*урo1528*), осуществляющей высвобождение железа из сидерофора внутри клетки.

Полученная лигазная смесь, содержащая рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV, использовалась для трансформации штамма *E. coli* Strata. В качестве контроля использовали трансформацию этого штамма векторной плазмидой pSC-A-amp/kan. Для того, чтобы убедиться в успешности трансформации проводили электрофоретический анализ тотальной клеточной ДНК. Плазида, выделенная из контрольных клонов, соответствовала по подвижности вектору, тогда как в рекомбинантных клонах обнаруживалась плазида, отличавшаяся меньшей подвижностью, что свидетельствовало о ее увеличенной молекулярной массе за счет встроенного фрагмента ДНК (Рисунок 8А). Для подтверждения успешного клонирования генов биосинтеза иерсиниахелина и определения ориентации встроенного фрагмента ДНК в рекомбинантной плазмиде был проведен ПЦР-анализ двух полученных клонов (Рисунок 8Б).

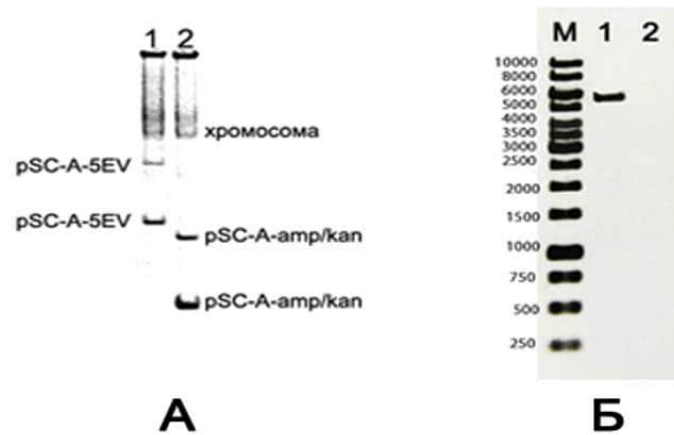


Рисунок 8 - Электрофоретический анализ штамма *E. coli* Strata, содержащего векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (2) и рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1)

В рекомбинантном штамме при использовании праймеров *pM13R* (комплементарного векторной ДНК) и *p1532R* (комплементарного 3'-концу рекомбинантного фрагмента) выявлялся ПЦР-фрагмент длиной около 6 тыс. п.н., что соответствовало расчетному размеру: 5,63 тыс. п.н. от рекомбинантного фрагмента плюс 0,15 тыс. п.н. от участка векторной ДНК. Этот результат свидетельствует о том, что рекомбинантный фрагмент встроился в правильной ориентации относительно векторного промотора. В контрольном штамме при использовании этих праймеров амплификационный продукт отсутствовал.

В результате проведенных генетических модификаций была создана рекомбинантная плазмида, несущая гены, ответственные за биосинтез иерсиниахелина, под управлением векторного промотора P_{lac} . Важно отметить, что активность промотора P_{lac} не подавляется белком Fur и, следовательно, не зависит от уровня железа в среде. Полученная плазмида pSC-A-5EV была использована для изучения экспрессии иерсиниахелина в клетках *E. coli* и *Y. pestis*. В качестве контроля использовалась векторная плазмида pSC-A-amp/kan, с помощью которой были получены контрольные штаммы указанных бактерий.

3.2. Анализ экспрессии иерсиниахелина в рекомбинантном штамме *E. coli*

В качестве реципиентов для рекомбинантной и векторной плазмид в настоящем исследовании использованы клетки экспериментального штамма *E. coli* H1884 Δ entDF. Этот штамм генетически модифицирован таким образом, чтобы им была утрачена способность к синтезу собственного сидерофора. С этой целью были делетированы гены *entD* и *entF*, ответственные за биосинтез энтеробактина.

В результате трансформации препаратом рекомбинантной плазмиды был получен штамм кишечной палочки, продуцирующий иерсиниахелин, а трансформация векторной плазмидой позволила получить контрольный штамм.

Полученные штаммы выращивали при разных температурах (26°C и 37°C) на плотной питательной среде LB в течение двух суток. Штамм кишечной палочки, продуцирующий иерсиниахелин, значительно отличался от контрольного по морфологии колоний, главным образом за счет коричневого приципитата, ярко выраженного при 37°C (Рисунок 9). Скорее всего, наблюдаемое отличие рекомбинантного штамма обусловлено внутриклеточным аккумулярованием комплекса сидерофора с железом.

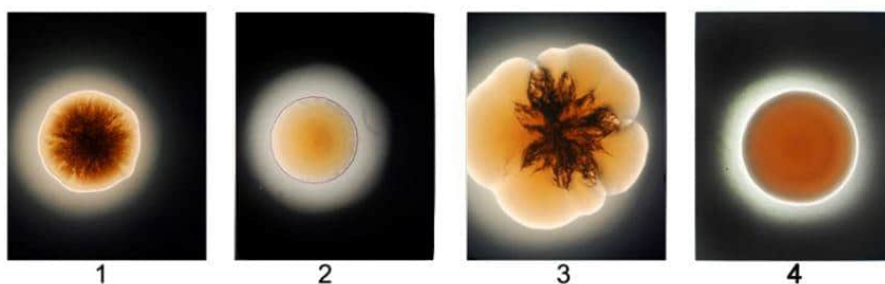


Рисунок 9 – Морфология колоний штамма *E. coli* H1884 Δ entDF, содержащего рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1,3) и векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (2, 4)

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)

Для подтверждения экспрессии иерсиниахелина в гетерологичном хозяине, рекомбинантный и контрольный штаммы были культивированы на универсальной индикаторной среде CAS-агар, предназначенной для обнаружения сидерофоров (Рисунок 10). Установлено, что оба штамма не демонстрировали сидерофорной активности при температуре инкубации 37°C. Хотя она и является оптимальной для роста и функционирования *E. coli*, при данной температуре сидерофор не секретируется в окружающую среду, а накапливается внутри бактериальных клеток. Это зафиксировано при проверке сидерофорной активности лизатов бактерий рекомбинантного штамма, выращиваемых при 37°C (данные не приведены). В то же время, сидерофорная активность рекомбинантного штамма на индикаторной среде отмечалась 26°C.

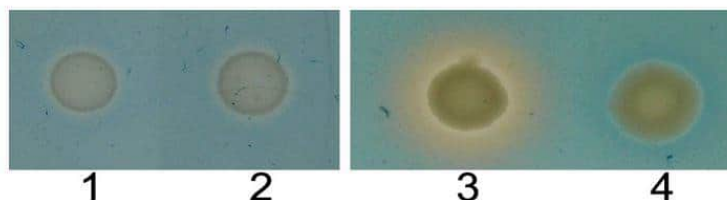


Рисунок 10 – Сидерофорная активность штамма *E. coli* H1884 Δ entDF, содержащего рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1,3) и векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (2, 4)

Примечание:

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

Рекомбинантный штамм демонстрировал выраженную зону просветления на CAS-агаре, что указывает на секрецию им иерсиниахелина и выделение его в среду (Рисунок 10). Контрольный штамм, лишенный сидерофорной активности, не вызывал изменений цвета среды при обеих температурах культивирования. Эти результаты свидетельствовали о том, что выделение сидерофора в среду происходит только при выращивании рекомбинантного штамма при 26°C. Так как рекомбинантная плазида, которой трансформировали штамм *E. coli* H1884 Δ entDF, не содержит гены, отвечающие за транспорт иерсиниахелина, предполагается, что при температуре 26°C в штамме активируются какие-то неспецифические системы экспорта низкомолекулярных веществ.

Выделение иерсиниахелина рекомбинантным штаммом в культуральную среду при 26°C удалось подтвердить и при выращивании двух штаммов *E. coli* в жидкой среде М9, содержащей 100 мкМ трехвалентного железа. В ходе эксперимента два штамма бактерий культивировали в течение трёх суток. Из культуральной среды каждого штамма были получены препараты с использованием метода, предназначенного для выделения сидерофоров гидроксаматного типа. Исследование полученных препаратов с использованием метода восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах силикагеля с фазой СЗ (Рисунок 11А) выявило их различия. В сравнении с препаратом, выделенным из контрольного штамма, препарат, полученный из рекомбинантного штамма, демонстрировал наличие дополнительного компонента с Rf 0,7. Данный компонент окрашивался парами йода.

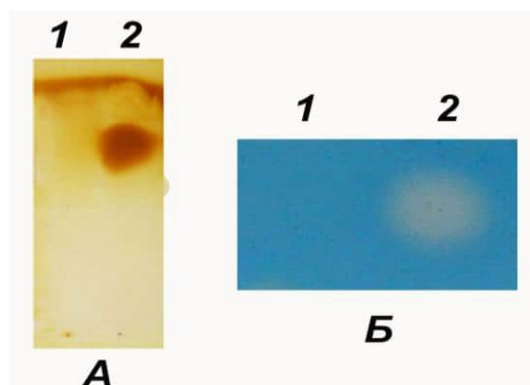


Рисунок 11 – Анализ препаратов иерсиниахелина, полученных из контрольного (1) и рекомбинантного (2) штаммов *E. coli* H1884 Δ entDF

Сидерофорную активность полученных препаратов проверяли на CAS-агаре. С этой целью их наносили пятном на индикаторную среду и инкубировали в течение 5 часов при 26°C. Результат учитывали по наличию изменения цвета среды на месте нанесения (Рисунок 11Б). Результаты анализа показали, что только препарат, полученный из рекомбинантного штамма, обладал сидерофорной активностью на индикаторной среде, о чем свидетельствовало изменение цвета CAS-агара с зеленого на желтый.

Таким образом, результаты вышеописанных экспериментов продемонстрировали, что рекомбинантный штамм при росте в жидкой минимальной питательной среде М9 с железом синтезирует иерсиниахелин, а при 26°C выделяет его в среду в значительных количествах.

3.3. Исследование функциональной активности иерсиниахелина в клетках *E. coli*

Контрольный и рекомбинантный штаммы *E. coli* H1884 Δ entDF продемонстрировали неспособность к росту в жидкой и на плотной минимальной среде М9 при температурах 26°C и 37°C в течение семи суток. Вероятной причиной данного явления является отсутствие синтеза катехолатного сидерофора энтеробактина, играющего ключевую роль в ассимиляции железа в условиях его дефицита. Несмотря на экспрессию иерсиниахелина рекомбинантным штаммом, наблюдается отсутствие роста, обусловленное отсутствием рецептора иерсиниахелина, необходимого для транспорта комплекса сидерофора с железом внутрь клетки. Полученные экспериментальные данные согласуются с результатами исследований [14], которые показали, что мутанты *E. coli*, лишенные способности продуцировать энтеробактин, не способны к росту на минимальной среде М9.

Несмотря на отсутствие роста при стандартных температурах инкубации (26°C и 37°C), добавление 100 мкМ трехвалентного железа в среду М9 позволило активировать рост исследуемых штаммов. Контрольный и рекомбинантный штаммы *E. coli* засеивали газоном на пластину агара М9, далее на поверхности среды размещали бумажные диски, пропитанные раствором FeCl₃ различной концентрации. На рисунке 12 показано, что раствор с концентрацией железа, равной 100 мкМ, оказывал стимулирующее воздействие на рост обоих исследуемых штаммов. Вероятно, такая концентрация железа способна стимулировать рост штаммов за счет активации низкоаффинных систем транспорта железа. Однако, несмотря на повышение концентрации трехвалентного железа до 1-10 мМ, не было выявлено стимуляционного эффекта по отношению к

исследуемым штаммам. Это, вероятно, связано с токсичностью высоких концентраций Fe^{3+} , которые, как известно, вызывают образование реактивных форм кислорода в реакции Хабера-Вайса [155]. Проведенные эксперименты показали отсутствие статистически значимых отличий в ростовых характеристиках контрольного и рекомбинантного штаммов. Тем не менее, полученные данные свидетельствуют о том, что рост обоих штаммов оказывается напрямую зависимым от концентрации доступного железа в питательной среде.

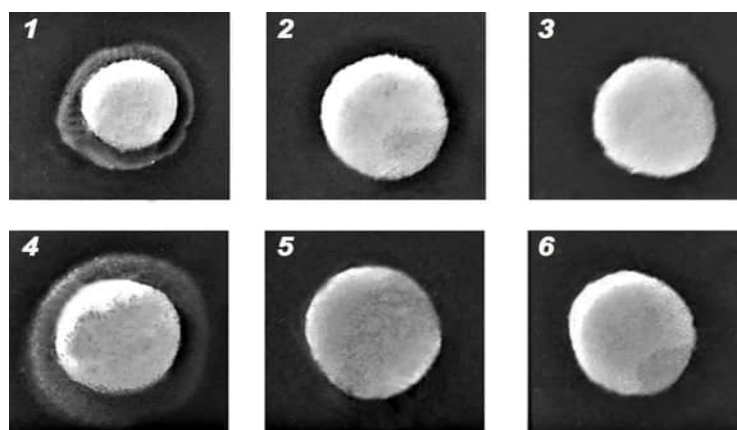


Рисунок 12 – Стимуляция роста исследуемых штаммов на агаре M9 раствором хлорида трехвалентного железа различной концентрации

Примечание:

1, 2, 3- контрольный штамм (концентрация FeCl_3 - 0,1 mM, 1 mM и 10 mM соответственно);

4, 5, 6- рекомбинантный штамм (концентрация FeCl_3 - 0,1 mM, 1 mM и 10 mM соответственно)

В последующих экспериментах штаммы выращивали в условиях аэрации в средах с достаточным содержанием железа (LB, M9+ 100 мкМ Fe^{3+}). Это позволило выявить значительные различия между ними. Так, рекомбинантный штамм опережал контрольный по скорости роста в условиях аэрации. Особенно при выращивании при 37°C с шуттелированием 150 *rpm* (Рисунок 13). Такого эффекта не наблюдалось при выращивании бактерий в микроаэрофильных условиях (без аэрации). Полученные данные позволили предположить, что иерсиниахелин защищает рекомбинантный штамм от действия реактивных соединений кислорода в условиях аэрации.

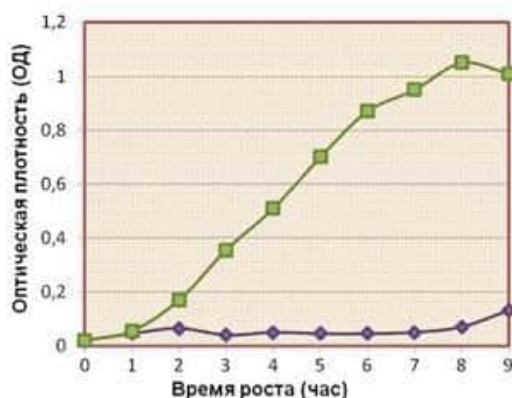


Рисунок 13 – Сравнение роста исследуемых штаммов в жидкой питательной среде LB с аэрацией (шуттелирование при 150 *rpm*) при 37°C

Примечание:

Зеленым цветом обозначена кривая роста рекомбинантного штамма, синим-контрольного

Для подтверждения этого был проведен ряд экспериментов по оценке чувствительности к перекиси водорода анализируемых штаммов. Для этого оба штамма культивировали в жидкой питательной среде LB при температуре 37°C, после чего засеивали на агаровые пластины. В центре каждой пластины располагали бумажный диск, на который был нанесен 3%-ный раствор H_2O_2 . На рисунке 14 показан результат, полученный по прошествии 24 часов инкубирования при 37°C. Зона отсутствия бактериального роста на агаре вокруг дисков была значительно меньше по диаметру у рекомбинантного штамма.

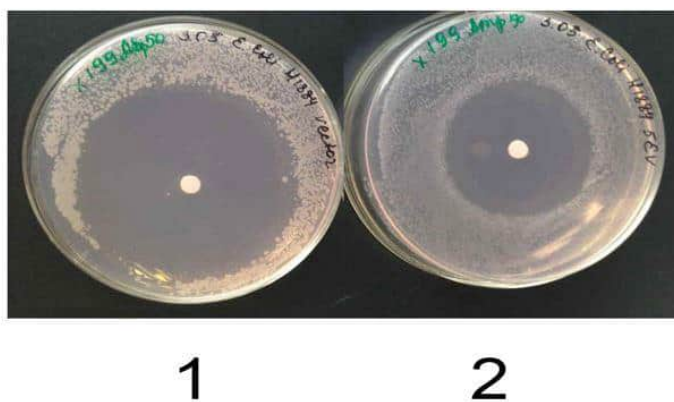


Рисунок 14 – Влияние перекиси водорода на рост штамма *E. coli* H1884 *DentDF*, содержащего векторную (1) и рекомбинантную (2) плазмиды

Любопытно, что вышеописанные различия были менее выражены при предварительном культивировании штаммов при 26°C, то есть в условиях, способствующих выделению иерсиниахелина в среду. Исследование предоставило дополнительные доказательства гипотезы о том, что иерсиниахелин может функционировать как антиоксидант, тем самым уменьшая восприимчивость бактерий к бактерицидным свойствам пероксида водорода.

Изучение антиоксидантной активности иерсиниахелина проводилось с использованием метода оценки влияния двухвалентного железа на рост исследуемых штаммов на питательной среде М9. В ходе экспериментального анализа было выявлено существенное различие в росте контрольного и рекомбинантного штаммов при добавлении Fe^{2+} в среду (Рисунок 15).

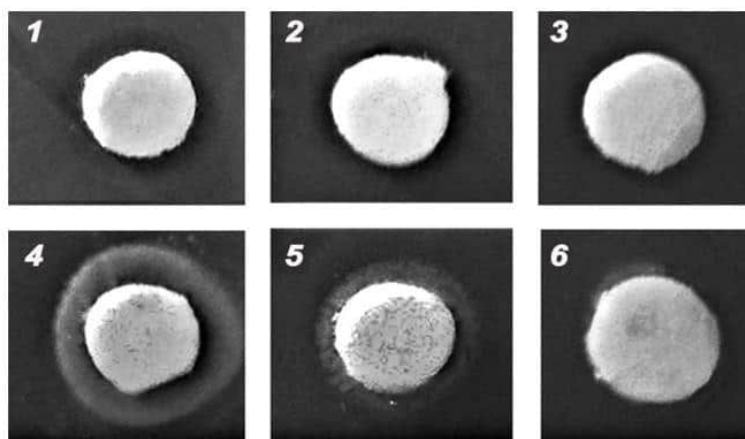


Рисунок 15 – Стимуляция роста исследуемых штаммов на агаре М9 раствором сульфата двухвалентного железа различной концентрации

Примечание:

1, 2, 3- контрольный штамм (концентрация FeSO_4 - 0,1 mM, 1 mM и 10 mM соответственно);

4, 5, 6- рекомбинантный штамм (концентрация FeSO_4 - 0,1 mM, 1 mM и 10 mM соответственно)

Рекомбинантный штамм демонстрировал стимуляцию роста при концентрации Fe^{2+} до 1 mM, в то время как контрольный штамм не рос при добавлении двухвалентного железа. Важно отметить, что Fe^{2+} обладает более высокой прооксидантной активностью по сравнению с трехвалентным железом из-

за способности образовывать высокореактивные гидроксил-радикалы в реакции Фентона в присутствии кислорода [155]. Двухвалентная форма железа является токсичной для бактерий. Особенно для тех, у которых отсутствуют эффективные механизмы антиоксидантной защиты. Иерсиниахелин, по всей видимости, способствует минимизации токсических свойств двухвалентного железа, что позволяет рекомбинантному штамму *E. coli*, в отличие от контрольного, расти в присутствии металла.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что рекомбинантный штамм *E. coli*, продуцируя сидерофор иерсиниахелин, не способен обеспечить поглощение железа в условиях дефицита этого элемента в среде M9 вследствие отсутствия специфического рецептора для данного сидерофора. Несмотря на это, иерсиниахелин демонстрирует антиоксидантную активность, способствующую росту бактерий при воздействии прооксидантов, таких как аэрация, перекись водорода и соли двухвалентного железа. Следует отметить, что антиоксидантные свойства характерны для многих сидерофоров бактериального и дрожжевого происхождения. Данная активность наиболее выражена у энтеробактерий, синтезирующих катехолатные сидерофоры, подобные энтеробактину [14, 148]. Гидроксаматные сидерофоры также обладают антиоксидантными свойствами [111] благодаря наличию остатков гидроксамовых кислот в своей структуре [70]. Важно подчеркнуть, что проявление антиоксидантных свойств у обоих типов сидерофоров наблюдалось только при их внутриклеточной локализации. Наши исследования также показали, что иерсиниахелин демонстрирует более выраженную антиоксидантную активность при температуре 37°C, когда он преимущественно находится внутри клеток, по сравнению с 26°C, когда большая его часть выделяется в окружающую среду.

3.4. Изучение функциональных свойств иерсиниахелина в клетках *Y. pestis*

3.4.1. Сравнение родительского штамма *Y. pestis* EV76 с его мутантом, не продуцирующим иерсиниахелин

Изучение функциональных свойств иерсиниахелина на модели чумного микроба проводили при использовании штамма *Y. pestis* EV76, который не продуцирует сидерофор иерсиниабактин, и его мутанта, не продуцирующего иерсиниахелин (вариант этого мутанта, лишенный плазмиды pCad, зарегистрирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» как *Y. pestis* KM1933).

Мутант был получен путем конъюгативного переноса [62] рекомбинантной плазмиды из клеток *E. coli* S17. Данная плазида содержала делецию трех генов биосинтеза иерсиниахелина из штамма EV76 (аналоги *ypol530-1532* в штамме *Y. pestis* CO92). При этом у мутанта были сохранены транспортные гены (аналоги *ypol533-1537*), необходимые для поглощения бактериями иерсиниахелина, связанного с железом. Наличие этих транспортных систем у родительского и мутантного штаммов позволило оценить роль этого сидерофора в ассимиляции железа, что не удалось сделать на модели штамма *E. coli* H1884 $\Delta entDF$, у которого эти гены отсутствуют.

Мутант *Y. pestis* EV76 Ych^- , имеющий направленную делецию только генов биосинтеза иерсиниахелина, очевидно, сохранил свои основные характеристики, свойственные вакцинному штамму *Y. pestis* EV76. Об этом позволяют судить результаты сравнения протективных свойств родительского и мутантного штаммов, которое не выявило между ними достоверных отличий ($p \geq 0,05$). В трех независимых экспериментах оба штамма через 21 день после подкожной иммунизации мышей дозой 10^6 м.кл защищали животных от заражения дозой 10^3 м.кл. высоковирулентного ($LD_{50} 3 \pm 1,4$ м.кл.) штамма *Y. pestis* 231 (Таблица 6). В то же время в контрольных группах (в каждом эксперименте использовали по 10 неиммунизированных мышей) все животные пали на 3-5 сутки.

Таблица 6 – Оценка протективных свойств родительского штамма *Y. pestis* EV76 и его мутанта, не продуцирующего иерсиниахелин

№ эксперимента	Кол-во мышей выживших/зараженных без иммунизации	Кол-во мышей выживших/иммунизированных <i>Y. pestis</i> EV76	Кол-во мышей выживших/иммунизированных <i>Y. pestis</i> EV76 Y_{ch}^-
1	0/10	8/10	9/10
2	0/10	7/10	8/10
3	0/10	8/10	9/10
Кол-во выживших мышей в трех опытах	0	$7,6 \pm 0,34$	$8,6 \pm 0,34$

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о том, что несмотря на отсутствие синтеза иерсиниахелина мутант сохранял протективную активность на уровне родительского вакцинного штамма.

В ходе исследования изучалась потенциальная вовлеченность иерсиниахелина в процессы ассимиляции железа *Y. pestis*. Для этого было проведено сравнение двух штаммов (родительского и мутантного) по их способности расти при температуре 26°C в жидких питательных средах с разной концентрацией железа. В богатой железом среде LB оба штамма демонстрировали практически идентичные показатели скорости роста (Рисунок 16А). Однако, в минимальной среде M9 мутантный штамм отставал в росте по сравнению с исходным штаммом (Рисунок 16Б), и это различие было особенно заметно в железodefицитной среде M9, дополненной 50 мкМ хелатора железа 2-2'-дипиридиллом (Рисунок 16В). Следует подчеркнуть, что при внесении в среду M9 солей трехвалентного железа (100 мкМ) различия в скорости роста между штаммами исчезали, аналогично тому, как наблюдалось при росте в жидкой среде LB. Полученные данные указывали на возможное участие иерсиниахелина в ассимиляции бактериями железа. Отсутствие иерсиниахелина у мутанта тормозит его рост в условиях дефицита железа, но не влияет на рост в условиях избытка этого металла.

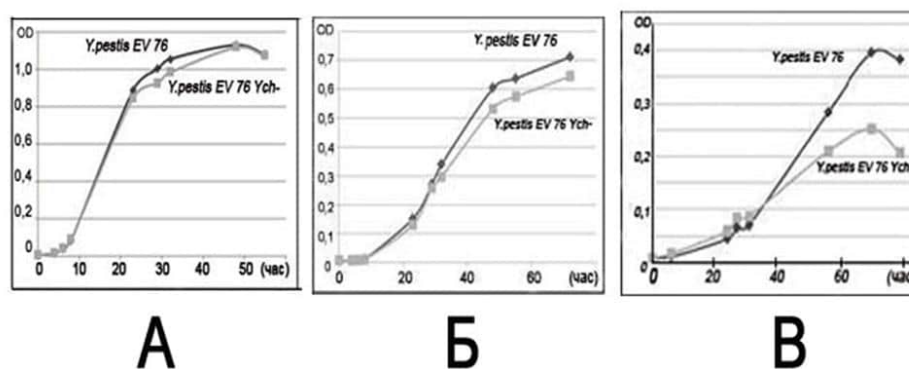


Рисунок 16 – Сравнение роста исследуемых штаммов в жидких питательных средах при 26°C в условиях аэрации (шуттелирование 150 rpm):

А – Кривые роста родительского (*Y. pestis* EV76) и мутантного (*Y. pestis* EV76 Ych⁻) штаммов в среде LB,

Б – Кривые роста родительского (*Y. pestis* EV76) и мутантного (*Y. pestis* EV76 Ych⁻) штаммов в среде M9,

В – Кривые роста родительского (*Y. pestis* EV76) и мутантного (*Y. pestis* EV76 Ych⁻) штаммов в среде M9, содержащей 50 мкМ 2-2'-дипиридила

3.4.2. Исследование роли иерсиниахелина в ассимиляции железа чумным микробом

В последующих экспериментах роль сидерофора в физиологии возбудителя чумы исследовалась в сравнении свойств трех штаммов (Таблица 7), 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.

Таблица 7 – Анализируемые штаммы *Y. pestis*, различающиеся по продукции иерсиниахелина

№	Название	Характеристика
1.	<i>Y. pestis</i> EV76 /pSC-A-amp/kan	Родительский штамм, трансформированный векторной плазмидой pSC-A-amp/kan
2.	<i>Y. pestis</i> EV76 Ych ⁻ /pSC-A-amp/kan	Ych ⁻ мутант, трансформированный векторной плазмидой pSC-A-amp/kan
3.	<i>Y. pestis</i> EV76 Ych ⁻ /pSC-A-5EV	Ych ⁻ мутант, содержащий рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV с генами биосинтеза Ych

Для обеспечения адекватного сравнения штаммов в идентичных условиях культивирования с использованием ампициллина, необходимого для поддержания рекомбинантной плазмиды pSC-A-5EV в бактериальных клетках, родительский штамм и его мутант по продукции иерсиниахелина были трансформированы векторной плазмидой pSC-A-amp/kan.

Исследование трех штаммов, культивируемых на плотной среде LB, показало сходство морфологии колоний при температуре 26°C. В то же время, при 37°C комплементированный мутант накапливал коричневые включения внутри колоний (Рисунок 17А).

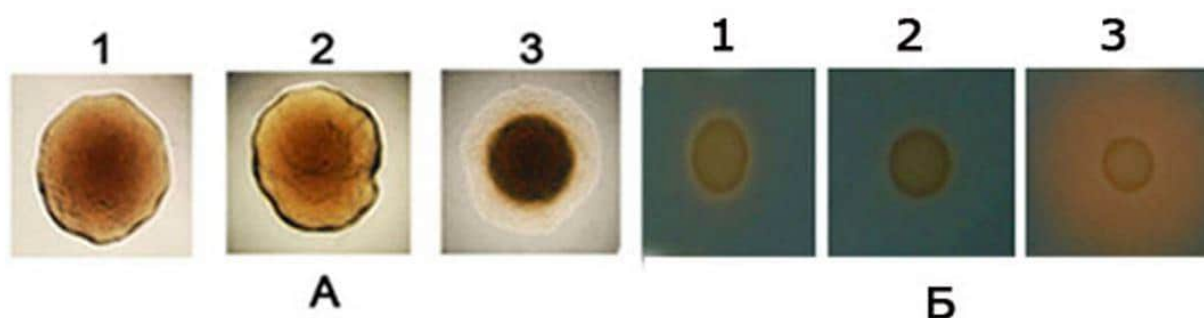


Рисунок 17 – Сравнительный анализ родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего иерсиниахелин (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3)

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

Эта особенность обусловлена тем, что при 37°C иерсиниахелин не секретируется рекомбинантным штаммом в окружающую среду, а аккумулируется внутри бактерий в комплексе с железом. Отсутствие наблюдаемого эффекта при 26°C указывает на то, что при данной температуре сидерофор выводится из клеток. Это предположение было подтверждено посредством анализа сидерофорной активности штаммов на индикаторной среде, предназначенной для детекции продукции сидерофоров (Рисунок 17Б).

Исследование сидерофорной активности трёх штаммов *Y. pestis* EV76 проводилось при температуре 26°C. При 37°C рост данных штаммов на средах с

дефицитом железа, в том числе на CAS-агаре, не наблюдался. Известно, что для роста в таких условиях бактериям *Y. pestis* необходим сидерофор иерсиниабактин, который отсутствует у всех трех штаммов [150]. Как видно из данных, представленных на рисунке 17Б, ни исходный штамм, ни его мутант не демонстрировали сидерофорной активности при 26°C. Вероятно, это связано с результатами других исследований [80, 150], согласно которым *pgm⁻* штаммы не способны продуцировать иерсиниабактин и, следовательно, не проявляют сидерофорной активности на CAS-агаре. Данное наблюдение привело авторов к выводу о том, что *Y. pestis* не синтезирует других сидерофоров помимо иерсиниабактина. Однако, как показали предыдущие исследования [158], клетки чумного микроба синтезируют другой сидерофор – иерсиниахелин, который связан на поверхности клеток фактором аутоагглютинации.

Исследования, проводимые ранее в нашем институте [9], демонстрировали, что отсутствие сидерофорной активности у *pgm⁻* штаммов на индикаторной среде не связано с отсутствием способности синтезировать другие сидерофоры. Оказалось, что *pgm⁻* штаммы, в отличие от *pgm⁺* штаммов, способны синтезировать низкомолекулярный ингибитор, который блокирует выделение сидерофоров в окружающую среду. Между тем, полученный в ходе настоящего исследования рекомбинантный штамм, содержащий гены биосинтеза иерсиниахелина на высококопийной плазмиде, способен продуцировать в больших количествах этот сидерофор. Это позволяет ему преодолеть действие ингибитора и выделить сидерофор в среду, который создает большую зону просветления вокруг посева на CAS-агаре. Эти результаты указывают на секрецию иерсиниахелина рекомбинантным штаммом при температуре 26°C и подчеркивают его роль в ассимиляции железа бактериями.

Проведенное исследование скорости роста трех штаммов в жидкой среде М9 с ампициллином (50 мкг/мл) и хелатором железа 2-2'-дипиридилем (50 мкМ) выявило различия в их динамике роста (Рисунок 18). Комплементированный мутант демонстрировал существенно более высокую скорость роста по сравнению с родительским штаммом. В то же время, мутант, лишенный способности

продуцировать сидерофор, отставал в росте от двух других штаммов. Эти данные подтверждают роль иерсиниахелина в процессе ассимиляции железа.

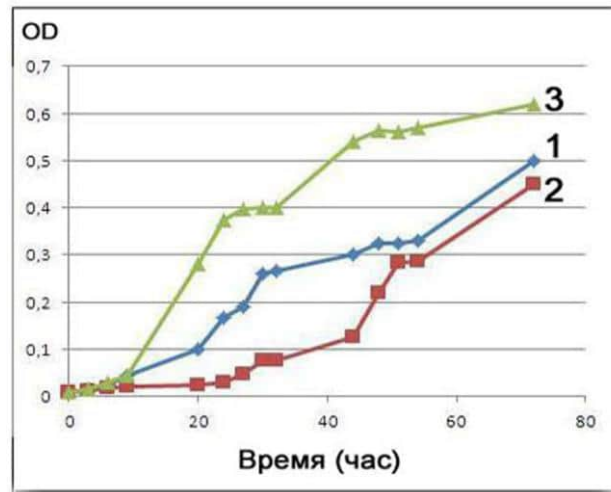


Рисунок 18 – Кривые роста трех штаммов в условиях аэрации (шутеллирование 150 rpm) при 26°C в среде M9, содержащей ампициллин (50 мкг/мл) и 50 мкМ 2-2'-дипиридила

1- *Y. pestis* EV76 /pSC-A-amp/kan, 2- *Y. pestis* EV76 Ych⁻ /pSC-A-amp/kan, 3- *Y. pestis* EV76 Ych⁻ /pSC-A-5EV

Различия в скорости роста трех исследуемых штаммов практически отсутствовали при росте бактерий в стационарных условиях при 26°C. Тем не менее они были значительными в условиях интенсивной аэрации (250 rpm). Полученные данные позволяют предположить, что иерсиниахелин, помимо своей роли в усвоении бактериями *Y. pestis* железа в условиях его дефицита, также может участвовать в защите бактерий от токсического действия реактивных соединений кислорода.

3.4.3. Анализ антиоксидантной активности иерсиниахелина в клетках *Y. pestis*

С целью подтверждения предположения о том, что иерсиниахелин обладает антиоксидантной активностью в клетках *Y. pestis* также, как и в клетках рекомбинантного штамма кишечной палочки, была проанализирована чувствительность штаммов к действию перекиси водорода в жидкой и на плотной питательной среде (Рисунок 19). При анализе роста исследуемых штаммов

штаммов на плотной среде диско-диффузионным методом (Рисунок 19А) показано, что мутант образовывал большую зону ингибиции роста, чем родительский штамм и комплеметированный мутант.

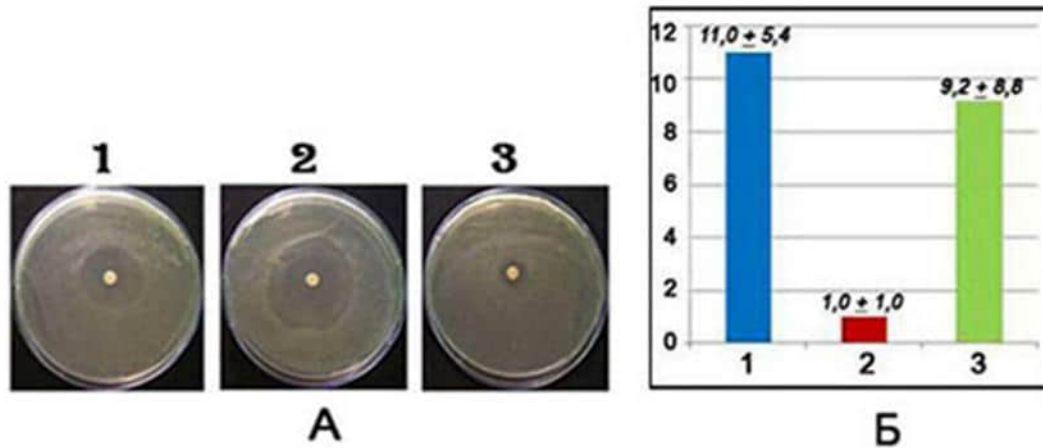


Рисунок 19 – Сравнительный анализ чувствительности к бактерицидному действию перекиси водорода родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего иерсиниахелин (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3)

Примечание:

А. Определение чувствительности штаммов, выращенных на плотной питательной среде ТА при 37°C диско-диффузионным методом

Б. Процент выживших бактерий после воздействия 0,01%-ной перекиси водорода в ЗФР в течение 30 мин

Как показано на рисунке 19Б, мутант, комплементированный рекомбинантной плазмидой, в отличие от родительского штамма и мутанта, не продуцирующего иерсиниахелин, способен более эффективно сопротивляться действию перекиси. Вышеописанные различия между штаммами демонстрируют антиоксидантные свойства иерсиниахелина и подтверждают результаты, полученные на модели *E. coli*.

Антиоксидантная активность иерсиниахелина, а также его участие в ассимиляции *Y. pestis* железа в условиях железodefицита, позволили предположить, что этот сидерофор способен участвовать в развитии инфекционного процесса.

3.4.4. Изучение роли иерсиниахелина в патогенезе инфекции

Следующим этапом работы явился анализ влияния иерсиниахелина на организм лабораторных животных, в ходе которого были обнаружены существенные различия между тремя штаммами, различающимися по продукции этого сидерофора. Так, патологоанатомическая картина у мышей, вскрытых через 1-5 суток после внутривенного заражения мышей родительским и мутантным штаммом, а также комплементированным мутантом, была различной. Особенно выраженные отличия между штаммами наблюдались при анализе регионарных лимфоузлов животных. На рисунке 20 приведены фотографии паховых лимфоузлов и кровеносных сосудов мышей через 3 суток после внутривенного заражения мышей тремя штаммами.

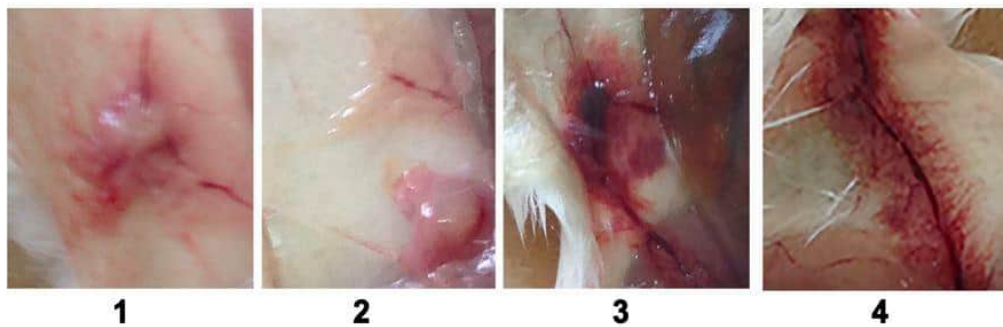


Рисунок 20 - Сравнительный анализ патологоанатомической картины у мышей, вскрытых через трое суток после внутривенного заражения родительским штаммом *Y. pestis* EV76 (1), его мутантом, не продуцирующим иерсиниахелин (2), и мутантом, комплементированным рекомбинантной плазмидой, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина (3, 4)

В отличие от мутанта (Рисунок 20-2), родительский штамм (Рисунок 20-1) вызывал образование геморрагий вокруг лимфоузлов. При этом мутант, комплементированный рекомбинантной плазмидой и продуцирующий большие количества иерсиниахелина, обладал гораздо более выраженной способностью к образованию геморрагий, чем родительский штамм (Рисунок 20-3). Интересно, что после внутривенного введения родительского штамма диапедез эритроцитов наблюдался главным образом в области первичных и вторичных лимфоузлов, а при

введении комплементированного мутантного штамма – и по ходу кровеносных сосудов (Рисунок 20-4).

Возможным объяснением этих различий может быть тот факт, что в родительском штамме гены биосинтеза иерсиниахелина находятся под контролем собственного промотора, и их экспрессия, судя по данным транскриптомного анализа, активируется в лимфоузлах [92, 93]. При этом в комплементированном мутанте этот сидерофор экспрессируется конститутивно, поскольку гены его биосинтеза находятся под контролем нерегулируемого железом промотора P_{lac} . Полученные данные свидетельствуют о способности иерсиниахелина прямо или опосредованно стимулировать проницаемость кровеносных сосудов. Механизм, лежащий в основе этой активности иерсиниахелина, нуждается в дальнейшем углубленном исследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сидерофоры важны для жизнедеятельности и вирулентности многих возбудителей особо опасных инфекций, в том числе и для возбудителя чумы. Это доказано многолетними исследованиями фенолятного сидерофора иерсиниабактина *Y. pestis*, который является важным фактором вирулентности чумного микроба. Сидерофор иерсиниабактин, экспрессия которого активируется при 37°C [150], необходим микробу для роста при этой температуре в железодефицитных средах и в организме хозяина. Отсутствие сидерофорной активности на индикаторной среде у штаммов, не синтезирующих иерсиниабактин [80, 150], позволило разным авторам заключить, что *Y. pestis* не синтезирует другие сидерофоры.

В результате настоящей диссертационной работы получены убедительные экспериментальные доказательства того, что *Y. pestis*, помимо иерсиниабактина, действительно синтезирует второй сидерофор – иерсиниахелин, биосинтез и транспорт которого кодируется участком хромосомной ДНК, обозначенным при аннотации геномов как *ysu* (*y*ersinia *s*iderophore *u*talization) локус. Связь этого локуса с продукцией иерсиниахелина позволяет расшифровать его название как *y*ersiniachelin *s*ynthesis *u*talization. Вопрос о возможности синтеза чумным микробом сидерофора, кодируемого этим локусом, который имеет частичную гомологию с *alc* локусом бордетелл, многие годы был предметом дискуссий. Тем не менее, о функционировании генов этого локуса в клетках возбудителя чумы можно было судить по результатам анализа данных полногеномных транскриптомов [163]. Однако многие годы разным исследователям не удавалось обнаружить у чумного микроба другие сидерофоры, кроме иерсиниабактина. Штаммы, не синтезирующие этот сидерофор (*pgt*⁻ штаммы), не проявляли сидерофорную активность на среде для выявления сидерофоров (CAS-агаре). Объяснить это явление позволили данные, полученные в предыдущих исследованиях в нашей лаборатории [9]. Как выяснилось, отсутствие у *pgt*⁻ штаммов сидерофорной активности не является показателем отсутствия сидерофоров. Причина подобного эффекта – продукция

низкомолекулярного ингибитора, который блокирует выделение сидерофоров в среду. Однако суперпродукция иерсиниахелина при 26°C полученным в настоящем исследовании рекомбинантным штаммом, содержащим гены биосинтеза иерсиниахелина в составе высококопийной плазмиды, способствует преодолению негативного действия ингибитора и выделению сидерофора в среду. Таким образом была продемонстрирована секреция иерсиниахелина при 26°C бактериями *Y. pestis*. Для того чтобы выяснить, насколько этот сидерофор специфичен для возбудителя чумы, был проведен анализ генов его биосинтеза.

В результате анализа геномов разных видов бактерий гены биосинтеза иерсиниахелина обнаружены только у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Наличие генетических детерминантов иерсиниахелина в геномах этих двух видов иерсиний удалось подтвердить и при использовании разработанной в настоящей работе компьютерной программы «SiderophoreAnalyzer». При этом гены биосинтеза и рецептора иерсиниахелина выявляются абсолютно во всех проанализированных геномах. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности кластеров, кодирующих биосинтез и транспорт иерсиниахелина в разных штаммах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, показал, что все гены этих кластеров имеют высокую степень гомологии (98-99%), что свидетельствует об эволюционной стабильности генов и важности иерсиниахелина для этих двух видов иерсиний.

Несмотря на высокую степень гомологии структурных генов, кодирующих синтез и транспорт иерсиниахелина, между двумя видами иерсиний были обнаружены и различия в структуре терминаторной области *usi* кластера, содержащей вариабельные тандемные повторы (VNTR). Несмотря на наличие VNTR, структура этой области идентична у всех исследованных 583 штаммов *Y. pestis*, принадлежащих к разным подвидам и биоварам и выделенных в разные годы в разных природных очагах чумы. Это позволяет предположить, что стабильность терминаторной области этого локуса у различных штаммов чумного микроба имеет какую-то функциональную нагрузку. В то же время у разных штаммов возбудителя псевдотуберкулеза терминаторная область различается по количеству VNTR у разных групп штаммов, что было использовано для внутривидовой

дифференциации *Y. pseudotuberculosis* методом ПЦР *in silico* и *in vitro*. При этом было обнаружено, что 56 штаммов псевдотуберкулезного микроба, выделенные во время вспышек псевдотуберкулеза на протяжении 40 лет на территории нашей страны, не различались по структуре этой области.

Для оценки возможного влияния различий в структуре терминаторной области между чумным и псевдотуберкулезным микробом на экспрессию иерсиниахелина опероны биосинтеза сидерофора двух видов иерсиний (*Y. pestis* KIM и *Y. pseudotuberculosis* YPIII), различающиеся только по величине этой области, были клонированы в составе плазмидного вектора в штамме кишечной палочки. Сравнение экспрессии иерсиниахелина двумя рекомбинантными штаммами показало, что оперон псевдотуберкулезного микроба определяет значительно более высокую экспрессию сидерофора, чем оперон чумного микроба. Возможно, повышенная продукция иерсиниахелина псевдотуберкулезным микробом позволяет бактериям преодолеть отсутствие иерсиниабактина у большинства штаммов *Y. pseudotuberculosis*.

Полученные в ходе анализа *usi* локуса иерсиний сведения были использованы для конструирования штаммов и рекомбинантных плазмид, с помощью которых удалось однозначно доказать функциональность *usi* локуса и получить важные сведения о функциональной роли иерсиниахелина возбудителя чумы. Функциональность *usi* локуса была продемонстрирована путем клонирования генов биосинтеза этого сидерофора в клетках кишечной палочки, не синтезирующих собственный сидерофор энтеробактин. Как выяснилось, ПЦР-копия четырех генов (аналогов *upo* 1529-1532) штамма *Y. pestis* EV76 обеспечивает продукцию рекомбинантным штаммом сидерофора. Полученные данные свидетельствуют о функциональности генов биосинтеза иерсиниахелина, полученных из вакцинного штамма, и опровергают высказанные ранее предположения о неспособности штаммов возбудителя чумы синтезировать этот сидерофор [80].

Анализ роли иерсиниахелина в рекомбинантном штамме кишечной палочки показал, что сидерофор синтезируется как при 26°C, так и 37°C. При этом при 37°C

он остается внутри бактерий, а при 26°C выделяется в среду. При обеих температурах иерсиниахелин не обеспечивал ассимиляцию бактериями железа в железodefицитных условиях, поскольку в рекомбинантной плазмиде имеются только гены биосинтеза, и отсутствуют гены рецептора, обеспечивающего транспорт нагруженного железом сидерофора внутрь бактерий. По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что иерсиниахелин, синтезируемый рекомбинантным штаммом кишечной палочки, не способствует ассимиляции железа в железodefицитной среде ввиду отсутствия рецептора сидерофора. Несмотря на это, он обладает антиоксидантными свойствами и стимулирует рост бактерий в присутствии прооксидантов (аэрация, перекись водорода, соли двухвалентного железа).

Исследование роли иерсиниахелина на модели возбудителя чумы было проведено с использованием штамма *Y. pestis* EV76, который не содержит генов, кодирующих иерсиниабактин. Сравнительный анализ полученных в настоящей работе трех вариантов штамма *Y. pestis* EV76, различающихся по продукции иерсиниахелина, но содержащих гены его транспорта, позволил выявить секрецию этого сидерофора и оценить его роль в ассимиляции железа при 26°C. Кроме того, показано, что иерсиниахелин при 37°C остается внутри клеток и обладает способностью защищать бактерии от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. Поэтому он способен защищать бактерии *Y. pestis* от действия одного из защитных механизмов врожденного иммунитета.

Таким образом, полученные в работе данные позволяют заключить, что *Y. pestis*, как и многие другие колонизирующие организм хозяина бактерии, имеет множественные сидерофорные системы. Экспериментально доказано, что помимо иерсиниабактина, штаммы возбудителя чумы продуцируют гидроксаматный сидерофор иерсиниахелин. В настоящее время известно, что способность продуцировать несколько сидерофоров, обладающих различной функциональной активностью, обеспечивает бактериям конкурентное преимущество и позволяет им выживать в разных условиях, в том числе и в разных органах млекопитающих [127]. Тем не менее, различные функции может выполнять и один и то же

сидерофор. Это свойство обнаружено в ходе настоящего исследования у иерсиниахелина, который экспрессируется клетками чумного микроба 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 отсутствует или сильно снижена экспрессия иерсиниахелина, он секретируется в среду и способствует ассимиляции железа. А при 37°C, когда ведущую роль в ассимиляции железа играет иерсиниабактин, иерсиниахелин остается внутри бактерий и защищает их от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. Помимо этих двух видов активности, свойственных большинству известных сидерофоров, у иерсиниахелина выявлена и уникальная способность стимулировать проницаемость сосудов, которая может способствовать диссеминации возбудителя чумы из первичных очагов инфекции. Выявленные свойства иерсиниахелина 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 *ypj1529-ypj1538* 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 *ypj1529-ypj1532* 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 железodefицитных 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ- всемирная организация здравоохранения

г- грамм

ЗФР- забуференный физиологический раствор

КОЕ – колониеобразующие единицы

мкг- микрограмм

МНР- Монгольская Народная Республика

нг- нанограмм

п.н.- пар нуклеотидов

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР- полимеразная цепная реакция

ПЧС- противочумная станция

ТСХ – тонкослойная хроматография

ФА- фактор аутоагглютинации

CAS – хромазуrol S

Fur-box- сайт узнавания Fur-белка

indel- инсерции и делеции нуклеотидов

NCBI- National Center for Biotechnology Information

pCD1- плаزمида, кодирующая зависимость роста бактерий при 37° от наличия ионов Ca^{2+} в среде

pgm – (pigmentation) хромосомный локус, отвечающий за пигментсорбцию

pMT1- плазмиды, кодирующая «мышинный» токсин и капсульный антиген F1

pPCP1- плазмиды, кодирующая активатор плазминогена и пестицин

rpm- revolution per minute

SD- последовательность Шайна-Дальгарно

VNTR- variable number tandem repeat

Ybt- сидерофор иерсиниабактин

Ych- сидерофор иерсиниахелин

ysu- yersiniachelin synthesis utilization

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Еременко, Е.И. Сидерофоры *Bacillus anthracis* / Е.И. Еременко. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. - № 1. – С. 68-74.
2. Казюкова, Т.В. Регуляция метаболизма железа / Т.В. Казюкова, А.А. Левина, Н.В. Цветаева [и др.]. – Текст: электронный // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. - 2006. – Т. 85. - №6. – С. 94-98.
3. Козырев, Д.П. Роль железорегулируемых генов в патогенности бактерий / Д.П. Козырев, Н.А. Васинова. – Текст: электронный // Цитология. - 2004. - Т. 46. - № 5. – С. 465-472.
4. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Г. Г. Онищенко, И. В. Брагина, Е. Б. Ежлова [и др.]. – Москва: ЗАО "Шико", 2013. – 560 с. – ISBN 978-5-900758-68-8. – EDN SHFBUN.
5. Леонов, В.В. Микробные сидерофоры: строение, свойства и функции / В.В. Леонов, А.Ю. Миронов, И.В. Ананьина [и др.]. – Текст: электронный // Астраханский медицинский журнал. – 2016. Т.11. - № 4. – С. 24-37.
6. Миллер, Жак Франсиз Альфред Пьер. Эксперименты в молекулярной генетике [Текст] / Дж. Миллер. Пер. с англ. канд. биол. наук Ю. Н. Зографа [и др.]. Под ред. и с предисл. проф. С. И. Алиханяна. — Москва: Мир. - 1976. — 436 с.
7. Орлов, Ю.П. Метаболизм железа в биологических системах (Биохимические, патофизиологические и клинические аспекты) / Ю. П. Орлов, В. Т. Долгих. – Текст: электронный // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53. - № 1. – С. 25-38.
8. Орлов, Ю.П. Метаболизм железа в условиях инфекции / Ю.П. Орлов, Н.В. Говорова, В.Н. Лукач [и др.]. – Текст: электронный // Вестник интенсивной терапии имени А. И. Салтанова. - 2020. - №1. – С. 90-99.
9. Патент № 2549712 Российская Федерация, МПК C07K 14/195, C07K 1/100. Способ выделения ингибитора секреции сидерофоров, синтезируемого рgm⁺ штаммами *Y. pestis* и выделенный ингибитор: опубл. 27.04.2015 / Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Морозова И.В., заявитель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена

трудового Красного Знамени научноисследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU), Бюл. № 12.

10. Ракин, А. Остров «высокой патогенности»: продукция металлофора йерсиниобактина, интегративность, мобильность / А. Ракин. – Текст: электронный // Бактериология. – 2017. – Т. 2. - № 4. – С. 7-16.

11. Тарасова, Н.Е. Феррокинетика и механизмы её регуляции в организме человека / Н.Е. Тарасова, Е.Д. Теплякова. – Текст: электронный // Журнал фундаментальной медицины и биологии. - 2012. - №1. – С. 10-16.

12. Чернышов, В.В. Конъюгаты сидерофоров с антибиотиками: структурное разнообразие и антибактериальная активность / В.В. Чернышов, А.С. Кузовлев, Н.Д. Черепанова [и др.]. – Текст: электронный // КМАХ. - 2022. - №4. – С. 314-344.

13. Abbas, R. General Overview of Klebsiella pneumonia: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity / R. Abbas, M. Chakkour, H. Zein El Dine [et al.]. - Text: electronic // Biology (Basel). – 2024.- Vol.13. - №2. - P. 78.

14. Adler, C. The alternative role of enterobactin as an oxidative stress protector allows Escherichia coli colony development / C. Adler, N. S. Corbalan, D. R. Peralta [et al.]. - Text: electronic // PLoS ONE. – 2014. - Vol. 9. - № 1.

15. Ahmadi, M. K. Molecular variation of the nonribosomal peptide-polyketide siderophore yersiniabactin through biosynthetic and metabolic engineering / M. K. Ahmadi, S. Fawaz, L. Fang [et al.]. - Text: electronic // Biotechnology and bioengineering. – 2016. - Vol. 113. - № 5. - P. 1067–1074.

16. Ahmadi, M. K. Total Biosynthesis and Diverse Applications of the Nonribosomal Peptide-Polyketide Siderophore Yersiniabactin / M. K. Ahmadi, S. Fawaz, C. H. Jones [et al.]. - Text: electronic // Applied and environmental microbiology. – 2015. - Vol. 81. - №16. – P.5290-5298.

17. Ahmed, E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed, S. J. M. Holmström. - Text: electronic // Microbial biotechnology. - 2014. - Vol. 7. - №3. – P. 196-208.

18. Anderson, S.A. The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption / S. A. Anderson, C. P. Nizzi, Y. I. Chang [et al.]. - Text: electronic // Cell metabolism. – 2013. - Vol. 17. - № 2. – P. 282–290.
19. Andrews, S. C. Bacterial iron homeostasis / S. C. Andrews, A. K. Robinson, F. Rodríguez-Quinones. - Text: electronic // FEMS microbiology reviews. – 2003. - Vol. 27. - № 2-3. – P. 215-237.
20. Antunes, L. C. In vitro and in vivo antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* / L. C. Antunes, F. Imperi, F. Minandri [et al.]. - Text: electronic // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2012. - Vol. 56. - № 11. – P. 5961–5970.
21. Arnold, E. Non-classical roles of bacterial siderophores in pathogenesis / E. Arnold. – Text: electronic // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2024. – Vol. 14. – P. 1465719.
22. Arosio, P. Ferritin, cellular iron storage and regulation / P. Arosio, L. Elia, M. Poli. - Text: electronic // IUBMB Life. - 2017. - Vol. 69. - P. 414–422.
23. Aschemeyer, S. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin / S. Aschemeyer, B. Qiao, D. Stefanova [et al.]. - Text: electronic // Blood. - 2018. - Vol. 131. - P. 899–910.
24. Bakulina, O. Conjugates of Iron-Transporting *N*-Hydroxylactams with Ciprofloxacin / O. Bakulina, A. Bannykh, E. Levashova [et al.]. – Text: electronic // Molecules. – 2022. – Vol. 27 (12). – P. 3910.
25. Balla, J. Ferritin in kidney and vascular related diseases: novel roles for an old player / J. Balla, G. Balla, A. Zarjou. - Text: electronic // Pharmaceuticals (Basel). – 2019. – Vol.12. - № 2. – P. 96.
26. Banin, E. The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. / E. Banin, A. Lozinski, K.M. Brady, E. Berenshtein, P.W. Butterfield, M. Moshe, M. Chevion, E.P. Greenberg, E. Banin. - Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2008. – V. 105. - N 43. – P. 16761–16766.

27. Beall, B. An iron-regulated outer-membrane protein specific to *Bordetella bronchiseptica* and homologous to ferric siderophore receptors / B. Beall, T. Hoenes. - Text: electronic // Microbiology (Reading). – 1997. - Vol. 143 (Pt 1). - P.135-145.
28. Bearden, S.W. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis* / S.W. Bearden, J.D. Fetherston, R.D. Perry. Text: electronic // Infection and immunity. – 1997. - Vol. 65. - № 5. – P. 1659–1668.
29. Becker, K.W. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen / K.W. Becker, E.P. Skaar. – Text: electronic // FEMS microbiology reviews. – 2014. – Vol. 38(6). – P. 1235–1249.
30. Begg, S.L. The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens / S.L. Begg. - Text: electronic // Biochemical Society transactions. – 2019. - Vol. 47(1). – P. 77-87.
31. Bergeron, R J. Vibriobactin antibodies: a vaccine strategy / R J. Bergeron, N. Bharti, S. Singh, J.S. McManis, J. Wiegand, L.G. Green. – Text: electronic // Journal of medicinal chemistry. - 2009. – V. 52. – P. 3801–3813.
32. Bessman, N.J. Dendritic cell-derived hepcidin sequesters iron from the microbiota to promote mucosal healing / N.J. Bessman, J.R.R. Mathieu, C. Renassia [et al.]. – Text: electronic // Science. – 2020. – Vol. 368. – P. 186–189.
33. Bobrov, A.G. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in mice / A.G. Bobrov, O. Kirillina, J.D. Fetherston [et al.]. – Text: electronic // Molecular microbiology. - 2014. – Vol. 93. – P. 759–775.
34. Boda, S. Bacterial siderophore mimicking iron complexes as DNA targeting antimicrobials. / S. Boda, S. Pandit, A. Garai, D. Pal, B. Basu // RSC Advances. - 2016. – V. 6. - N 45. – P. 39245–39260.
35. Bogdanovich, T. Use of O-Antigen Gene Cluster-Specific PCRs for the Identification and O-Genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* / T. Bogdanovich, E. Carniel, H. Fukushima, M. Skurnik. – Text: electronic // Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41. – P. 5103-5112.

36. Braun, V. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria / V. Braun. – Text: electronic // International journal of medical microbiology: IJMM. – 2001. – Vol. 291(2). – P. 67-79.
37. Braun, V.; Hantke, K. Recent insights into iron import by bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011, 15, 328–334.
38. Brickman, T.J. Bordetella iron transport and virulence / T.J. Brickman, M.T. Anderson, S.K. Armstrong. – Text: electronic // Biometals. – 2007. – Vol. 20(3-4). – P. 303-322.
39. Brickman, T.J. Interspecies variations in Bordetella catecholamine receptor gene regulation and function / T.J. Brickman, R.J. Suhadolc, S.K. Armstrong. – Text: electronic // Infection and immunity. – 2015. – Vol. 83(12). – P. 4639-4652.
40. Brickman, T.J. Temporal signaling and differential expression of Bordetella iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators / T.J. Brickman, S.K. Armstrong. – Text: electronic // Biometals. – 2009. – Vol. 22(1). – P. 33–41.
41. Brickman, T.J. The ornithine decarboxylase gene *odc* is required for alcaligin siderophore biosynthesis in Bordetella spp.: putrescine is a precursor of alcaligin / T.J. Brickman, S.K. Armstrong. – Text: electronic // Journal of bacteriology. – 1996. – Vol. 178(1). – P. 54-60.
42. Britigan, B. E. Iron acquisition from Pseudomonas aeruginosa siderophores by human phagocytes: an additional mechanism of host defense through iron sequestration? / B. E. Britigan, G. T. Rasmussen, O. Olakanmi [et al.]. – Text: electronic // Infection and immunity. – 2000. – Vol. 68(3). – P. 1271–1275.
43. Brumbaugh, A.R. Immunization with the yersiniabactin receptor, FyuA, protects against pyelonephritis in a murine model of urinary tract infection / A.R. Brumbaugh, S.N. Smith, H.L. Mobley. – Text: electronic // Infection and immunity. – 2013. – Vol. 81(9). – P. 3309-3316.
44. Burrell, M. Evolution of a novel lysine decarboxylase in siderophore biosynthesis / M. Burrell, C.C. Hanfrey, L.N. Kinch, K.A. Elliott [et al.]. – Text: electronic // Molecular microbiology. – 2012. – Vol. 86(2). – P. 485-499.

45. Bythrow, G.V. Quadri LEN kinetic analyses of the siderophore biosynthesis inhibitor salicyl-AMS and analogues as MbtA inhibitors and antimycobacterial agents. / G.V. Bythrow, P. Mohandas, T. Guney [et al.]. – Text: electronic // Biochemistry. – 2019. – Vol. 58(6). – P. 833-847.
46. Byun, H. Siderophore piracy enhances *Vibrio cholerae* environmental survival and pathogenesis / H. Byun, I.J. Jung, J. Chen [et al.]. – Text: electronic // Microbiology (Reading). – 2020. – Vol. 166(11). – P. 1038-1046.
47. Cain, T.J. Ferric iron reductases and their contribution to unicellular ferrous iron uptake / T.J. Cain, A.T. Smith. – Text: electronic // Journal of inorganic biochemistry. – 2021. – 218:111407.
48. Carroll, C.S. Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetase / C.S. Carroll, M.M. Moore. – Text: electronic // Critical reviews in biochemistry and molecular biology. – 2018. – Vol. 53(4). – P. 356-381.
49. Cassat, J.E. Iron in infection and immunity / J.E. Cassat, E.P. Skaar. – Text: electronic // Cell Host Microbe. – 2013. – Vol. 13(5). – P. 509-519.
50. Caza, M. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans / M. Caza, J.W. Kronstad. – Text: electronic // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2013. – Vol. 3(80). – P. 1–15.
51. Cendrowski, S. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence / S. Cendrowski, W. MacArthur, P. Hanna. – Text: electronic // Molecular microbiology. – 2004. – Vol. 51(2). – P. 407–417.
52. Chaturvedi, K.S. Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic / K.S. Chaturvedi, C.S. Hung, D.E., Giblin [et al.]. – Text: electronic // ACS chemical biology. – 2014. – Vol. 9(2). – P. 551-561.
53. Chaturvedi, K.S. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection / K.S. Chaturvedi, C.S. Hung, J.R. Crowley [et al.]. – Text: electronic // Nature chemical biology. – 2012. – Vol. 8. – № 8. – P. 731–736.

54. Chen, W.J. Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis* / W.J. Chen, T.Y. Kuo, F.C. Hsieh [et al.]. – Text: electronic // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 32950.
55. Cheung, J. Discovery of an iron-regulated citrate synthase in *Staphylococcus aureus* / J. Cheung, M.E. Murphy, D.E. Heinrichs. – Text: electronic // Chemistry & biology. – 2012. – Vol. 19(12). – P. 1568-1578.
56. Chhakchhuak, P.I.R. In vivo regulation of bacterial Rho-dependent transcription termination by the nascent RNA / P.I.R. Chhakchhuak, R. Sen. – Text: electronic // The Journal of biological chemistry. – 2022. – Vol. 298(6). – P. 102001.
57. Chi, Z. The unique role of siderophore in marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2. / Z. Chi, X.X. Wang, Z.C. Ma [et al.]. – Text: electronic // Biometals. - 2012. – V. 25. – P. 219–230.
58. Chouikha, I. Differential Gene Expression Patterns of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* during Infection and Biofilm Formation in the Flea Digestive Tract / I. Chouikha, D. E. Sturdevant, C. Jarrett [et al.]. – Text: electronic // mSystems. – 2019. – Vol. 4 (1). - e00217-00218.
59. Cornelissen, C.N. Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria / C.N. Cornelissen. – Text: electronic // Frontiers in bioscience: a journal and virtual library. – 2003. – Vol. 8. - d836-847.
60. Correnti, M. Iron Absorption: Molecular and Pathophysiological Aspects / M. Correnti, E. Gammella, G. Cairo [et al.]. – Text: electronic // Metabolites. – 2024. - Vol. 14(4). - P. 228.
61. Dassonville-Klimpt, A. Advances in 'Trojan horse' strategies in antibiotic delivery systems / A. Dassonville-Klimpt, P. Sonnet. – Text: electronic // Future medicinal chemistry. – 2020. – Vol. 12(11). – P. 983-986.
62. Datsenko, K. A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K. A. Datsenko, B. L. Wanner. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2000. – Vol. 97(12). – P. 6640–6645.

63. de Jonge, E.F. Conditional growth defect of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* ferric uptake regulator (*fur*) mutants / E.F. de Jonge, J. Tommassen. – Text: electronic // FEMS microbiology letters. – 2022. – Vol.369(1). – fnac047.
64. De Serrano, L.O. Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields / L.O. De Serrano. – Text: electronic // Biomolecular concepts. – 2017. – V. 8. - N 3-4. – P. 169-178.
65. Deriu, E. Probiotic bacteria reduce salmonella typhimurium intestinal colonization by competing for iron / E. Deriu, J.Z. Liu, M. Pezeshki [et al.]. – Text: electronic // Cell Host Microbe. – 2013. – Vol. 14(1). – P. 26-37.
66. Dhusia, K. Overcoming antibiotic resistance: is siderophore Trojan horse conjugation an answer to evolving resistance in microbial pathogens? / K. Dhusia, A. Bajpai, P.W. Ramteke. – Text: electronic // Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society. – 2018. – V. 269. – P. 63-87.
67. Di Grazia, A. Hepcidin Upregulation in Colorectal Cancer Associates with Accumulation of Regulatory Macrophages and Epithelial-Mesenchymal Transition and Correlates with Progression of the Disease / A. Di Grazia, D. Di Fusco, E. Franzè [et al.]. – Text: electronic // Cancers. – 2022. – Vol. 14. – P. 5294.
68. Donovan, A. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis / A. Donovan, C.A. Lima, J.L. Pinkus [et al.]. – Text: electronic // Cell metabolism. – 2005. – Vol. 1(3). – P. 191-200.
69. Drechsel, H. Structure elucidation of yersiniabactin, a siderophore from highly virulent *Yersinia* strains / H. Drechsel, H. Stephan, R. Lotz [et al.]. – Text: electronic // Liebigs Annalen. – 1995. – Vol. 1995. – №. 10. – P. 1727-1733.
70. Eisendle, M. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans* / M. Eisendle, M. Schrettl, C. Kragl [et al.]. – Text: electronic // Eukaryot Cell. – 2006. – Vol. 5. – P. 1596–603.

71. Ellermann, M. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions / M. Ellermann, J.C. Arthur. – Text: electronic // Free radical biology & medicine. – 2017. – Vol. 105. – P. 68-78.
72. Ferreras, J.A. Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. / J.A. Ferreras, J.S. Ryu, F. Di Lello [et al.]. – Text: electronic // Nature chemical biology. – 2005. – Vol. 1 (1). – P. 29–32.
73. Fetherston, J. D. Analysis of the pesticin receptor from *Yersinia pestis*: role in iron-deficient growth and possible regulation by its siderophore / J. D. Fetherston, J. W. Lillard Jr., R. D. Perry. – Text: electronic // Journal of bacteriology. – 1995. – Vol. 177. – P. 1824-1833.
74. Fetherston, J. D. The Yfe and Feo transporters are involved in microaerobic growth and the virulence of *Yersinia pestis* in bubonic plague / J. D. Fetherston, I. Jr Mier., H. Truszczyńska [et al.]. – Text: electronic // Infection and immunity. – 2012. – Vol. 80. – P. 3880–3891.
75. Fetherston, J. D. YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis* / J. D. Fetherston, V. J. Bertolino, R. D. Perry. – Text: electronic // Molecular microbiology. – 1999. – Vol. 32. – P. 289-299.
76. Fetherston, J.D. The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague / J.D. Fetherston, O. Kirillina, A.G. Bobrov [et al.]. – Text: electronic // Infection and immunity. – 2010. – Vol. 70. – P. 2045–2052.
77. Fgaier, H. A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens via iron chelation / H. Fgaier, H.J. Eberl. – Text: electronic // Journal of theoretical biology. – 2010. – Vol. 263(4). – P. 566-578.
78. Foley, T.L. Targeting iron assimilation to develop new antibacterials / T.L. Foley, A. Simeonov. – Text: electronic // Expert opinion on drug discovery. – 2012. – Vol. 7. – P. 831–847.
79. Forman, S. Analysis of the aerobactin and ferric hydroxamate uptake systems of *Yersinia pestis* / S. Forman, M.J. Nagiec, J. Abney [et al.]. – Text: electronic // Microbiology (Reading). – 2007. – Vol. 153(Pt 7). – P. 2332-2341.

80. Forman, S. *Yersinia* ironomics: comparison of iron transporters among *Yersinia pestis* biotypes and its nearest neighbor, *Yersinia pseudotuberculosis* / S. Forman, J.T. Paulley, J.D. Fetherston [et al.]. – Text: electronic // *Biometals*. – 2010. – Vol. 23(2). – P. 275–294.
81. Frangipani, E. Pyochelin potentiates the inhibitory activity of gallium on *Pseudomonas aeruginosa* / E. Frangipani, C. Bonchi, F. Minandri [et al.]. – Text: electronic // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2014. – Vol. 58. – P. 5572–5575.
82. Freinbichler, W. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions / W. Freinbichler, M.A. Colivicchi, C. Stefanini [et al.]. – Text: electronic // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2011. – Vol. 68(12). – P. 2067–2079.
83. Fridman, C.M. A comparative genomics methodology reveals a widespread family of membrane-disrupting T6SS effectors / C.M. Fridman, K. Keppel, M. Gerlic [et al.]. – Text: electronic // *Nature communications*. – 2020. – Vol. 11(1). – P. 1085.
84. Gallegos-Monterrosa, R. The ecological impact of a bacterial weapon: microbial interactions and the Type VI secretion system. *FEMS microbiology reviews* / R. Gallegos-Monterrosa, S.J. Coulthurst. – Text: electronic // - 2021. – Vol. 45(6). - fuab033.
85. Ganz, T. Anemia of inflammation / T. Ganz. – Text: electronic // *The New England journal of medicine*. - 2019. – Vol. 381. – P. 1148–1157.
86. Gehring, A.M. Iron acquisition in plague: Modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis* / A.M. Gehring, E. DeMoll, J.D. Fetherston [et al.]. – Text: electronic // *Chemistry & biology*. - 1998. – Vol. 5. – P. 573–586.
87. Golonka, R. The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity / R. Golonka, B.S. Yeoh, M. Vijay-Kumar. – Text: electronic // *Journal of innate immunity*. – 2019. – Vol. 11(3). – P. 249–262.
88. Gorringe, A.R. Growth and siderophore production by *Bordetella pertussis* under iron-restricted conditions / A.R. Gorringe, G. Woods, A. Robinson. – Text: electronic // *FEMS microbiology letters*. – 1990. – Vol. 54(1-3). – P. 101-105.

89. Gozzelino, R. Iron Homeostasis in Health and Disease / R. Gozzelino, P. Arosio. – Text: electronic // International journal of molecular sciences. – 2016. – Vol. 17(1). – P. 130.
90. Gulick, A.M. Nonribosomal peptide synthetase biosynthetic clusters of ESKAPE pathogens / A.M. Gulick. – Text: electronic // Natural product reports. – 2017. – Vol. 34(8). – P. 981–1009.
91. Hagan, A.K. Petrobactin protects against oxidative stress and enhances sporulation efficiency in *Bacillus anthracis* Sterne / A.K. Hagan, Y.M. Plotnick, R.E. Dingle. – Text: electronic // mBio. - 2018. – Vol. 9(6). - e02079-18.
92. Han, Y. Comparative transcriptomics in *Yersinia pestis*: a global view of environmental modulation of gene expression / Y. Han, J. Qiu, Z. Guo [et al.]. – Text: electronic // BMC microbiology. – 2007. – Vol. 7 (96).
93. Han, Y. Comparative transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in response to hyperosmotic and high-salinity stress / Y. Han, D. Zhou, X. Pang [et al.]. – Text: electronic // Research in microbiology. – 2005. – Vol. 156. – P. 403–415.
94. Hao, Z. Rho-dependent transcription termination: a revisionist view / Z. Hao, V. Svetlov, E. Nudler. – Text: electronic // Transcription. – 2021. – Vol. 12(4). – P. 171–181.
95. Hider, R.C. Chemistry and biology of siderophores / R.C. Hider, X. Kong. – Text: electronic // Natural Product Reports. – 2010. – Vol. 27(5). – P. 637–657.
96. Hissen, A.H. Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores / A.H. Hissen, J.M. Chow, L.J. Pinto [et al.]. – Text: electronic // Infection and immunity. – 2004. – Vol. 72(3). – P. 1402–1408.
97. Hoelzgen, F. Structural basis for the intracellular regulation of ferritin degradation / F. Hoelzgen, T.T.P. Nguyen, E. Klugin [et al.]. – Text: electronic // Nature communications. – 2024. – Vol. 15(1). – P. 3802.
98. Holden, V. Diverging roles of bacterial siderophores during infection / V. Holden, M.A. Bachman. – Text: electronic // Metallomics. – 2015. – Vol. 7(6). – P. 986–995.

99. Hotta, K. Siderophoremediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains / K. Hotta, C.Y. Kim, D.T. Fox [et al.]. – Text: electronic // Microbiology. – 2010. – Vol. 156. – P. 1918–1925.
100. Jemielita, M. Quorum sensing controls *Vibrio cholerae* multicellular aggregate formation / M. Jemielita, N.S. Wingreen, B.L. Bassler. – Text: electronic // eLife. – 2018. – Vol. 7. - e42057.
101. Ji, C. Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates / C. Ji, R.E. Juarez-Hernandez, M.J. Miller. – Text: electronic // Future medicinal chemistry. – 2012. – V. 4. - N 3. – P. 297-313.
102. Jimenez, P.N. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* / P.N. Jimenez, G. Koch, J.A. Thompson [et al.]. – Text: electronic // Microbiology and molecular biology reviews: MMBR. – 2012. – Vol. 76(1). – P. 46-65.
103. Kahl, L.J. A survey of enabling technologies in synthetic biology / L.J. Kahl, D. Endy. – Text: electronic // Journal of biological engineering. – 2013. – Vol. 7(13). – P. 1–18.
104. Kang, D. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* / D. Kang, N.V. Kirienko. – Text: electronic // Journal of microbiology. – 2018. – Vol. 56. – P. 449–457.
105. Khan, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review / A. Khan, P. Singh, A. Srivastava. – Text: electronic // Microbiological research. – 2018. – Vol. 212-213. – P. 103-111.
106. Khasheii, B. Siderophores: importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry / B. Khasheii, P. Mahmoodi, A. Mohammadzadeh. – Text: electronic // Microbiological research. – 2021. – Vol. 250. – P. 126790.
107. Khazaal, M.T. In vitro and in silico studies of enterobactin-inspired Ciprofloxacin and Fosfomycin first generation conjugates on the antibiotic resistant *E. coli* OQ866153 / M.T. Khazaal, A.H.I. Faraag, H.H. El-Hendawy. – Text: electronic // BMC microbiology. – 2024. – Vol. 24(1). – P. 95.

108. Kirienko, N.V. Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa* / N.V. Kirienko, F.M. Ausubel, G. Ruvkun. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – Vol. 112(6). – P. 1821-1826.
109. Kirillina, O. A hierarchy of iron uptake systems: Yfu and Yiu are functional in *Yersinia pestis* / O. Kirillina, A. G. Bobrov, J. D. Fetherston [et al.]. – Text: electronic // Infection and immunity. – 2006. – Vol. 74 (11). – P. 6171–6178.
110. Kochan, I. The role of iron in bacterial infections, with special consideration of host-tubercle bacillus interaction / I. Kochan. – Text: electronic // Current topics in microbiology and immunology. – 1973. – Vol. 60. – P. 1-30.
111. Končić, M.Z. Antiradical, chelating and antioxidant activities of hydroxamic acids and hydroxyureas / M.Z. Končić, M. Barbarić, I. Perković [et al.]. – Text: electronic // Molecules. – 2011. – Vol. 16. – P. 6232–6242.
112. Kontoghiorghes, G.J. Iron and chelation in biochemistry and medicine: new approaches to controlling iron metabolism and treating related diseases / G.J. Kontoghiorghes, C.N. Kontoghiorghes. – Text: electronic // Cells. – 2020. – Vol. 9 (6). – P. 1456.
113. Kortman, G.A.M. Iron availability increases the pathogenic potential of *Salmonella typhimurium* and other enteric pathogens at the intestinal epithelial interface / G.A.M. Kortman, A. Boleij, D.W. Swinkels [et al.]. – Text: electronic // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(1). – e29968.
114. Kramer, J. Bacterial siderophores in community and host interactions / J. Kramer, Ö. Özkaya, R. Kümmerli. – Text: electronic // Nature reviews. Microbiology. – 2020. – Vol. 18(3). – P. 152-163.
115. Krause, A. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity / A. Krause, S. Neitz, H.J. Mägert [et al.]. – Text: electronic // FEBS letters. – 2000. – Vol. 480. – P. 147–150.
116. Krell, T. Antimicrobial resistance: progress and challenges in antibiotic discovery and anti-infective therapy / T. Krell, M.A. Matilla. – Text: electronic // Microbial biotechnology. – 2022. – Vol. 15. – P. 70–78.

117. Lamb, A.L. Breaking a pathogen's iron will: Inhibiting siderophore production as an antimicrobial strategy / A.L. Lamb. – Text: electronic // *Biochimica et biophysica acta*. – 2015. – Vol. 1854(8). – P. 1054–1070.

118. Lee, J.Y. Regulation of petrobactin and bacillibactin biosynthesis in *Bacillus anthracis* under iron and oxygen variation / J.Y. Lee, K.D. Passalacqua, P.C. Hanna [et al.]. – Text: electronic // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6 (6). – e20777.

119. Li, C. Aerobactin-Mediated Iron Acquisition Enhances Biofilm Formation, Oxidative Stress Resistance, and Virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* / C. Li, D. Pan, M. Li [et al.]. – Text: electronic // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 699913.

120. Lin, Y.M. Synthetic sideromycins (skepticism and optimism): selective generation of either broad or narrow spectrum Gram-negative antibiotics / Y.M. Lin, M. Ghosh, P.A. Miller [et al.]. – Text: electronic // *Biometals*. – 2019. – Vol. 32 (3). – P. 425–451.

121. Llamas, M.A. The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa* / M.A. Llamas, M. Sparrius, R. Kloet [et al.]. – Text: electronic // *Journal of bacteriology*. – 2006. – Vol. 188 (5). – P. 1882–1891.

122. Lucier, T.S. Iron uptake and iron-repressible polypeptides in *Yersinia pestis* / T.S. Lucier, J.D. Fetherston, R.R. Brubaker [et al.]. – Text: electronic // *Infection and Immunity*. – 1996. – Vol. 64. – P. 3023–3031.

123. Lun, S. Pharmacokinetic and in vivo efficacy studies of the mycobactin biosynthesis inhibitor salicyl-AMS in mice. // S. Lun, H. Guo, J. Adamson [et al.]. – Text: electronic // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – Vol. 57 (10). – P. 5138–5140.

124. Malerba, M. Epidermal hepcidin is required for neutrophil response to bacterial infection / M. Malerba, S. Louis, S. Cuvellier [et al.]. – Text: electronic // *The Journal of clinical investigation*. – 2020. – Vol. 130 (1). – P. 329–334.

125. Mastrogiannaki, M. Deletion of HIF-2 α in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice / M. Mastrogiannaki, P. Matak, S. Delga [et al.]. – Text: electronic // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – P. 587–590.

126. May, T. Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli* / T. May, S. Okabe. – Text: electronic // Environmental microbiology. – 2011. – Vol. 13(12). – P. 3149-3162.

127. McRose, D.L. Multiple siderophores: bug or feature? / D.L. McRose, M.R. Seyedsayamdost, F.M.M. Morel. – Text: electronic // Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry. – 2018. – Vol. 23. – P. 983–993.

128. Miethke, M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control / M. Miethke, M.A. Marahiel. – Text: electronic // Microbiology and molecular biology reviews: MMBR. – 2007. – Vol. 71 (3). – P. 413-451.

129. Miller, M.J. Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. // M.J. Miller, H. Zhu, Y. Xu [et al.]. – Text: electronic // Biometals. – 2009. – V. 22. - N 1. – P. 61-75.

130. Nadiras C, Eveno E, Schwartz A, Figueroa-Bossi N, Boudvillain M. A multivariate prediction model for Rho-dependent termination of transcription. Nucleic acids research. – 2018. – Vol. 46 (16). – P. 8245-8260.

131. Nemeth, E. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin / E. Nemeth, S. Rivera, V. Gabayan [et al.]. – Text: electronic // The Journal of clinical investigation. – 2004. – Vol. 113 (9). – P. 1271–1276.

132. Nemeth, E. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization / E. Nemeth, M.S. Tuttle, J. Powelson [et al.]. – Text: electronic // Science. – 2004. – Vol. 306 (5704). – P. 2090–2093.

133. Nemeth, E. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein / E. Nemeth, E.V. Valore, M. Territo [et al.]. – Text: electronic // Blood. – 2003. – Vol. 101 (7). – P. 2461–2463.

134. Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America. – 2001. – Vol. 98 (15). – P. 8780–8785.

135. Núñez, G. Innate nutritional immunity / G. Núñez, K. Sakamoto, M.P. Soares. – Text: electronic // *Journal of immunology*. – 2018. – Vol. 201 (1). – P. 11-18.

136. Nusca, T.D. Functional and structural analysis of the siderophore synthetase AsbB through reconstitution of the petrobactin biosynthetic pathway from *Bacillus anthracis* / T.D. Nusca, Y. Kim, N. Maltseva [et al.]. – Text: electronic // *The Journal of biological chemistry*. – 2012. – Vol. 287 (19). – P. 16058-16072.

137. Obando, S.T.A. A cluster of five genes essential for the utilization of dihydroxamate xenosiderophores in *Synechocystis sp.* PCC 6803 / S.T.A. Obando, M.M. Babykin, V.V. Zinchenko. – Text: electronic // *Current microbiology*. – 2018. – Vol. 75 (9). – P. 1165-1173.

138. Ostan, N.K.H. Lactoferrin receptors in Gram-negative bacteria: an evolutionary perspective / N.K.H. Ostan, T.F. Moraes, A.B. Schryvers. – Text: electronic // *Biochemistry and cell biology*. – 2021. – Vol. 99 (1). – P. 102-108.

139. Oves-Costales, D. The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis / D. Oves-Costales, N. Kadi, G.L. Challis. – Text: electronic // *Chemical Communications*. – 2009. – Vol. 43. – P. 6530-6541.

140. Paauw A., Leverstein-van Hall M.A., van Kessel K. P.M., et al. Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4. - N 12. - e8240.

141. Page, M.P.G. The role of iron and siderophores in infection and the development of siderophore antibiotics / M.P.G. Page. – Text: electronic // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2019. – Vol. 69 (7). – P. 529–537.

142. Palmer, L.D. Transition metals and virulence in bacteria / L.D. Palmer, E.P. Skaar. – Text: electronic // *Annual review of genetics*. – 2016. – Vol. 50. – P. 67-91.

143. Pantopoulos, K. Mechanisms of mammalian iron homeostasis / K. Pantopoulos, S.K. Porwal, A. Tartakoff [et al.]. – Text: electronic // Biochemistry. – 2012. – Vol. 51 (29). – P. 5705-24.
144. Park, C.H. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver / C.H. Park, E.V. Valore, A.J. Waring [et al.]. – Text: electronic // The Journal of biological chemistry. – 2001. – Vol. 276 (11). – P. 7806–7810.
145. Passari, A.K. Opportunities and challenges of microbial siderophores in the medical field / A.K. Passari, B. Ruiz-Villafán, R. Cruz-Bautista [et al.]. – Text: electronic // Applied microbiology and biotechnology. – 2023. – Vol. 107 (22). – P. 6751-6759.
146. Payne, S. M. Detection, isolation, and characterization of siderophores / S. M. Payne. – Text: electronic // Methods in enzymology. – 1994. - Vol. 235. - P. 329-344.
147. Payne, S.M. Vibrio iron transport: evolutionary adaptation to life in multiple environments / S.M. Payne, A.R. Mey, E.E. Wyckoff. – Text: electronic // Microbiology and molecular biology reviews: MMBR. – 2015. – Vol. 80 (1). – P. 69–90.
148. Peralta, D.R. Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire / D.R. Peralta, C. Adler, N.S. Corbalán [et al.]. – Text: electronic // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11 (6). - e0157799.
149. Pérez, N. Two parallel pathways for ferric and ferrous iron acquisition support growth and virulence of the intracellular pathogen *Francisella tularensis* Schu S4 / N. Pérez, R. Johnson, B. Sen [et al.]. – Text: electronic // Microbiology open. – 2016. – Vol. 5 (3). – P. 453–468.
150. Perry, R.D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis / R.D. Perry, J.D. Fetherston. – Text: electronic // Microbes and infection. – 2011. – Vol. 13 (10). P. 808-817.
151. Perry, R.D. The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of *Yersinia pestis* / R.D. Perry, A.G. Bobrov, J.D. Fetherston. – Text: electronic // Metallomics. – 2015. – Vol. 7 (6). – P. 965-978.
152. Perry, R. D. *Yersinia pestis* transition metal divalent cation transporters / R. D. Perry, A. G. Bobrov, O. Kirillina [et al.]. – Text: electronic // Advances in experimental medicine and biology. – 2012. – Vol. 954. – P. 267–279.

153. Perry, R. D. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation / R. D. Perry, P. B. Balbo, H. A. Jones [et al.]. – Text: electronic // Microbiology. – 1999. – Vol. 145. – P. 1181-1190.
154. Peters, J.M. Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles / J.M. Peters, A.D. Vangeloff, R. Landick. – Text: electronic // Journal of molecular biology. – 2011. – Vol. 412 (5). – P. 793-813.
155. Pierre, J.L. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry / J.L. Pierre, M. Fontecave. – Text: electronic // Biometals. – 1999. - Vol. 12. - №3. - P. 195-199.
156. Pluhacek, T. Analysis of microbial siderophores by mass spectrometry / T. Pluhacek, A. Skriba, J. Novak [et al.]. – Text: electronic // Methods in molecular biology. – 2019. – Vol. 1996. – P. 131-153.
157. Podladchikova, O. *Yersinia pestis* autoagglutination factor is a component of the type six secretion system / O. Podladchikova, U. Antonenka, J. Heesemann [et al.]. – Text: electronic // International journal of medical microbiology: IJMM. – 2011. – Vol. 301 (7). – P. 562-569.
158. Podladchikova, O. *Yersinia pestis* autoagglutination is mediated by Hcp-like protein and siderophore yersiniachelin / O. Podladchikova, V. Rykova, U. Antonenka [et al.]. – Text: electronic // Advances in experimental medicine and biology. – 2012. – Vol. 954. – P. 289-292.
159. Posey, J.E. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen / J.E. Posey, F.C. Gherardini. – Text: electronic // Science. – 2000. – Vol. 288 (5471). – P. 1651-1653.
160. Prabhakar, P.K. Bacterial siderophores and their potential applications: a review / P.K. Prabhakar. – Text: electronic // Current molecular pharmacology. – 2020. – Vol. 13 (4). – P. 295-305.
161. Price, S.L. Droplet Tn-Seq identifies the primary secretion mechanism for yersiniabactin in *Yersinia pestis* / S.L. Price, D. Thibault, T.M. Garrison [et al.]. – Text: electronic // EMBO reports. – 2023. – Vol. 24 (10). - e57369.

162. Rada, B. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase / B. Rada, M.A. Jendrysik, L. Pang [et al.]. – Text: electronic // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8 (1). – e54205.
163. Rakin, A. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia* / A. Rakin, L. Schneider, O. Podladchikova. – Text: electronic // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2012. – Vol. 2 (151).
164. Ramakrishnan, G. Citryl ornithine is an intermediate in a three-step biosynthetic pathway for rhizoferrin in *Francisella* / G. Ramakrishnan. – Text: electronic // ACS Chemical Biology. – 2019. – Vol. 14 (8). – P. 1760-1766.
165. Ramakrishnan, G. Iron and virulence in *Francisella tularensis* / G. Ramakrishnan. – Text: electronic // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2017. – Vol. 7 (107).
166. Raymond, K.N. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport / K.N. Raymond, E.A. Dertz, S.S. Kim. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – Vol. 100 (7). – P. 3584–3588.
167. Rayner, B. Siderophore conjugates to combat antibiotic-resistant bacteria / B. Rayner, A.D. Verderosa, V. Ferro [et al.]. – Text: electronic // RSC medicinal chemistry. – 2023. – Vol. 14 (5). – P. 800-822.
168. Ray-Soni, A. Mechanisms of bacterial transcription termination: all good things must end / A. Ray-Soni, M.J. Bellecourt, R. Landick. – Text: electronic // Annual review of biochemistry. – 2016. – Vol. 85. – P. 319-347.
169. Rebuffat, S. Microcins in action: amazing defence strategies of *Enterobacteria* / S. Rebuffat. – Text: electronic // Biochemical Society transactions. – 2012. – Vol. 40 (6). – P. 1456-1462.
170. Records, A. R. The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery / A. R. Records. – Text: electronic // Molecular plant-microbe interactions: MPMI. – 2011. – Vol. 24 (7). – P. 751–757.

171. Rizzi, A. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation / A. Rizzi, S. Roy, J.P. Bellenger [et al.]. – Text: electronic // Applied and environmental microbiology. – 2019. – Vol. 85. - e2439–e2418.
172. Rose, R. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE / R. Rose, O. Golosova, D. Sukhomlinov [et al.]. – Text: electronic // Bioinformatics. – 2019. – Vol. 35 (11). – P. 1963–1965.
173. Rossi, M.S. Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis* / M.S. Rossi, J.D. Fetherston, S. Létoffé [et al.]. – Text: electronic // Infection and immunity. – 2001. – Vol. 69 (11). – P. 6707-6717.
174. Sah, S. Siderophore: structural and functional characterization / S. Sah, R. Singh. – Text: electronic // A Comprehensive Review. Agriculture. – 2015. - Vol. 61 (Issue 3). – P. 97-114.
175. Sassone-Corsi, M. Siderophore-based immunization strategy to inhibit growth of enteric pathogens / M. Sassone-Corsi, P. Chairatana, T. Zheng [et al.]. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2016. – Vol. 113. - P. 13462–13467.
176. Schalk, I.J. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance / I.J. Schalk, M. Hannauer, A. Braud. – Text: electronic // Environmental microbiology. – 2011. – Vol. 13 (11). – P. 2844-2854.
177. Schalk, I.J. Siderophore-antibiotic conjugates: exploiting iron uptake to deliver drugs into bacteria / I.J. Schalk. – Text: electronic // Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 24 (8). – P. 801-802.
178. Schwartz, A.J. Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload / A.J. Schwartz, N.K. Das, S.K. Ramakrishnan [et al.]. – Text: electronic // The Journal of clinical investigation. – 2019. – Vol. 129 (1). – P. 336–348.
179. Schwyn, B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores / B. Schwyn, J.B. Neilands. – Text: electronic // Analytical biochemistry. – 1987. - Vol. 160 (1). - P. 47-56

180. Sewell, A.K. An unexpected benefit from *E. coli*: how enterobactin benefits host health / A.K. Sewell, M. Han, B. Qi. – Text: electronic // Microbial cell. – 2018. – Vol. 5 (10). – P. 469-471.
181. Sheldon, J.R. Iron Acquisition Strategies of Bacterial Pathogens / J.R. Sheldon, H.A. Laakso, D.E. Heinrichs. – Text: electronic // Microbiology spectrum. – 2016. Vol. 4 (2).
182. Sia, A.K. Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense / A.K. Sia, B.E. Allred, K.N. Raymond. – Text: electronic // Current opinion in chemical biology. – 2013. – Vol. 17 (2). – P. 150–157.
183. Silva-Stenico, M.E. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. / M.E. Silva-Stenico, C.S. Pamplona Silva, A.S. Lorenzi [et al.]. – Text: electronic // Microbiological research. – 2011. – Vol. 166. – P. 161–175.
184. Silvestri, L. Managing the dual nature of iron to preserve health / L. Silvestri, M. Pettinato, V. Furiosi [et al.]. – Text: electronic // International journal of molecular sciences. – 2023. – Vol. 24 (4). – P. 3995.
185. Skaar, E.P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts / E.P. Skaar. – Text: electronic // PLoS Pathogens. – 2010. – Vol. 6 (8). – e1000949.
186. Somova, L.M. Far eastern scarlet-like fever is a special clinical and epidemic manifestation of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in Russia / L.M. Somova, F.F. Antonenko, N.F. Timchenko [et al.]. – Text: electronic // Pathogens. – 2020. – Vol. 9 (6). – P. 436.
187. Stirrett, K.L. Small molecules with structural similarities to siderophores as novel antimicrobials against *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. / K.L. Stirrett, J.A. Ferreras, V. Jayaprakash [et al.]. – Text: electronic // Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2008. - Vol. 18. – P. 2662–2668.
188. Su, L. Biosynthesis of novel desferrioxamine derivatives requires unprecedented crosstalk between separate NRPS-independent siderophore pathways / L.

Su, Y. Souaibou, L. Hôtel [et al.]. – Text: electronic // Applied and environmental microbiology. – 2024. – Vol. 90 (3). - e0211523.

189. Syed, Y.Y. Cefiderocol: A Review in Serious Gram-Negative Bacterial Infections / Syed, Y.Y. – Text: electronic // Drugs. – 2021. – Vol. 81 (13). – P. 1559-1571.

190. Tan, Z. Growth and virulence of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in iron uptake / Z. Tan, S.M. Chekabab, H. Yu [et al.]. – Text: electronic // ACS Omega. – 2019. – Vol. 4 (8). – P. 13218–13230.

191. Thompson, J.M. Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization / J.M. Thompson, H.A. Jones, R.D. Perry. – Text: electronic // Infection and immunity. – 1999. – Vol. 67 (8). – P. 3879-3892.

192. Tonziello, G. Present and future of siderophore-based therapeutic and diagnostic approaches in infectious diseases / G. Tonziello, E. Caraff, B. Pinchera [et al.]. – Text: electronic // Infectious disease reports. – 2019. – Vol. 11 (2). – P. 30-36.

193. Troxell, B. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria / B. Troxell, H.M. Hassan. – Text: electronic // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2013. – Vol. 3. – P. 59.

194. Valdebenito, M. Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917 / M. Valdebenito, A.L. Crumbliss, G. Winkelmann [et al.]. – Text: electronic // International journal of medical microbiology: IJMM. – 2006. – Vol. 296 (8). – P. 513-520.

195. Varesio, L. Macrophage-inflammatory protein-3 α /CCL-20 is transcriptionally induced by the iron chelator desferrioxamine in human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)- κ B / L. Varesio, F. Battaglia, F. Raggi [et al.]. – Text: electronic // Molecular Immunology. – 2010. – Vol. 47 (4). – P. 685-693.

196. Vogt, A.S. On Iron Metabolism and Its Regulation / A.S. Vogt, T. Arsiwala, M. Mohsen [et al.]. – Text: electronic // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22 (9). P. 4591.

197. Wandersman, C. Haemophore functions revisited / C. Wandersman, P. Delepelaire. – Text: electronic // *Molecular microbiology*. – 2012. – Vol. 85 (4). – P. 618-631.
198. Wang, H. Enterobactin-specific antibodies induced by a novel enterobactin conjugate vaccine / H. Wang, X. Zeng, Y. Mo [et al.]. – Text: electronic // *Applied and environmental microbiology*. – 2019. – Vol. 85 (10).
199. Wang, J. Application of TonB-Dependent Transporters in Vaccine Development of Gram-Negative Bacteria / J. Wang, K. Xiong, Q. Pan [et al.]. – Text: electronic // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2021. – Vol. 10. – P. 589115.
200. Wang, W.L. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. / W.L. Wang, Z.M. Chi, Z. Chi [et al.]. – Text: electronic // *Bioresource technology*. – 2009. – Vol. 100 (9). – P. 2639–2641.
201. Wilson, B.R. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential / B.R. Wilson, A.R. Bogdan, M. Miyazawa [et al.]. – Text: electronic // *Trends in molecular medicine*. – 2016. – Vol. 22 (12). – P. 1077-1090.
202. WHO. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline / WHO. – 2019. - Geneva: World Health Organization, 2019. – 35 p. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000193>. – Text: electronic.
203. Wu, X. Hecpidin regulation by BMP signaling in macrophages is lipopolysaccharide dependent / X. Wu, L.-M. Yung, W.-H. Cheng [et al.]. – Text: electronic // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. - e44622.
204. Xie, B. Exploring the Biological Pathways of Siderophores and Their Multidisciplinary Applications: A Comprehensive Review / B. Xie, X. Wei, C. Wan [et al.]. – Text: electronic // *Molecules*. – 2024. – Vol. 29 (10). – P. 2318.
205. Xiong, K. A TonB dependent transporter YncD of *Salmonella enterica* Serovar Typhi possesses vaccine potential / K. Xiong, L. Deng, Z. Li [et al.]. – Text: electronic // *World journal of microbiology & biotechnology*. – 2024. – Vol. 40 (4). – P. 131.

206. Yoshida, N. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies / N. Yoshida, M. Sato. – Text: electronic // Applied microbiology and biotechnology. – 2009. – Vol. 83 (5). – P. 791-798.

207. Zeng, Y. Biosynthesis of albomycin delta (2) provides a template for assembling siderophore and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitor conjugates / Y. Zeng, A. Kulkarni, Z. Yang [et al.]. – Text: electronic // ACS chemical biology. – 2012. – Vol. 7 (9). – P. 1565–1575.

208. Zheng, T. Siderophore-based detection of Fe (III) and microbial pathogens / T. Zheng, E.M. Nolan. – Text: electronic // Metallomics. - 2012. - Vol. 4(9). – P. 866-880.

209. Zumerle, S. Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the hemochromatotic phenotype / S. Zumerle, J.R.R. Mathieu, S. Delga [et al.]. - Text: electronic // Blood. – 2014. - Vol. 123. – P. 3646–3650.

210. Zygiel, E.M. Exploring iron withholding by the innate immune protein human calprotectin / E.M. Zygiel, E.M. Nolan. – Text: electronic // Accounts of chemical research. – 2019. – Vol. 52. – P. 2301 – 2308.

Штаммы *Y. pestis*, использованные для проверки сконструированных в работе
праймеров методом ПЦР *in vitro*

№ п.п.	Штамм	Подвид/ Биовар	Место	Источник	Год
Основной подвид					
1.	17	Antiqua	Чита	человек	1923
2.	Кызылкумский 1 вакц.	Antiqua	Северо-западная Кызылкумка	н/д	1951
3.	927	Antiqua	Араломорск ПЧС	н/д	1955
4.	Harbin	Antiqua	Китай, Харбин,	н/д	н/д
5.	231 (708)	Antiqua	Киргизская ССР	органы трупа алтайского сурка	1947
6.	580	Antiqua	Читинская ПЧС	блохи из нор суслика	1960
7.	798	Antiqua	Читинская ПЧС	даурский суслика	1960
8.	1068	Antiqua	МНР, Цагаар-Нур, Самон	плоскочерепная полевка	1958
9.	24	Antiqua	Респ. Алтай, Кош- Агачский район, вершина р. Уландрык	остатки стола хищных птиц	2023
10.	27	Antiqua	Респ. Алтай, Кош- Агачский район, вершина р. Уландрык	остатки стола хищных птиц	2023
11.	32	Antiqua	Респ. Алтай, Кош- Агачский район, вершина р. Уландрык	остатки стола хищных птиц	2023
12.	33	Antiqua	Респ. Алтай, Кош- Агачский район, вершина р. Уландрык	остатки стола хищных птиц	2023
13.	34	Antiqua	Респ. Алтай, Кош- Агачский район, вершина р. Уландрык	остатки стола хищных птиц	2023
14.	35	Antiqua	Респ. Алтай, Кош- Агачский район, вершина р. Уландрык	остатки стола хищных птиц	2023
15.	39	Antiqua	Респ. Алтай, Кош- Агачский район, вершина р. Калгуты	остатки стола хищных птиц	2023

16.	48	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, вершина р. Калгуты	остатки стола хищных птиц	2023
17.	616	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, Богуты	длиннохвостый суслик	2023
18.	849	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, вершина р. Калгуты	<i>Oropsylla silantewi</i>	2023
19.	850	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, вершина р. Калгуты	вши	2023
20.	851	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, вершина р. Калгуты	вши	2023
21.	852	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, вершина р. Калгуты	вши	2023
22.	853	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, вершина р. Калгуты	вши	2023
23.	854	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, вершина р. Калгуты	вши	2023
24.	884	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, Богуты	<i>Oropsylla alaskensis</i>	2023
25.	885	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, Богуты	<i>Oropsylla alaskensis</i>	2023
26.	886	Antiqua	Респ. Алтай, Кош-Агачский район, Богуты	<i>Oropsylla alaskensis</i>	2023
27.	887	Medievalis	МНР, Цагаар-Нур, Самон	плоскочерепная полевка	1958
28.	149	Medievalis	МНР, Цагаар-Нур, Самон	блохи, снятые с полевки Брандта	1958
29.	26 Otten	Orientalis	Тживайжеж близ Бандуга	чумная крыса	н/д
30.	146	Orientalis	МНР, Цагаар-Нур, Самон	блохи, снятые с полевки Брандта	1958
31.	EV	Orientalis	Мадагаскар	человек	1926

32.	EV76 НИИЭГ	<i>Orientalis</i>	Мадагаскар	человек	1926
33.	EV76- Mollaret	<i>Orientalis</i>	Мадагаскар	человек	1926
34.	Jawa FD1135	<i>Orientalis</i>	о. Ява	бубон человека	1920
35.	231	<i>Orientalis</i>	Киргизская АССР, Восточный Аксай	остатки трупа сурка	1947
36.	TRU 1242	<i>Orientalis</i>	н/д	н/д	н/д
Неосновные подвиды					
37.	751	<i>caucasica</i>	Азербайджанская ПЧС	серая полевка	1962
38.	377	<i>caucasica</i>	Азербайджанская ПЧС	лесная мышь	1962
39.	336	<i>caucasica</i>	Азербайджанская ПЧС	серая полевка	1962
40.	1709	<i>caucasica</i>	Гурьевская обл.	блохи большой песчанки	1969
41.	564 «Ширак»	<i>caucasica</i>	Армянская ПЧС	полевка	1958
42.	564	<i>caucasica</i>	Азербайджан	полевка	н/д
43.	8786	<i>caucasica</i>	н/д	н/д	н/д
44.	126	<i>microtus</i>	Иркутск	полевка	1959
45.	2420	<i>microtus</i>	Иркутская ПЧС	полевка	1956
46.	64	<i>tallasica</i>	Горный Алтай Среднеаз.ПЧС	блохи пищухи	1961
47.	269/19	<i>tallasica</i>	Склон Таласского хребта Среднеаз. ПЧС	<i>N. fereture</i>	1980
48.	568	н/д	Иркутск	больной	н/д
49.	2563	<i>altaica</i>	МНР, Баян- Хонгорский аймак	полевка Брандта	1956
50.	436	<i>altaica</i>	МНР, Баян- Хонгорский аймак	блохи от полевки Брандта	1958
51.	803	<i>ulegeica</i>	Читинская ПЧС	полевка Брандта	1960
52.	805	<i>ulegeica</i>	Читинская ПЧС	полевка Брандта	1960
53.	12258	<i>ulegeica</i>	МНР, Баян- Ульгийский аймак	суспензия блох	1972
54.	12259	<i>ulegeica</i>	МНР, Баян- Ульгийский аймак	монгольская пищуха	1972
55.	1129	<i>hissarica</i>	Таджикская ПЧС	арчевая полевка	1970

Штаммы *Y. pseudotuberculosis*, использованные для проверки
сконструированных в работе праймеров методом ПЦР *in vitro*

№	Особое название штамма	Инвентарный номер штамма	Место выделения	Источник выделения	Дата выделения
1.	K St.1	17844	Германия	человек	н/д
2.	F Pa 3606	17845	Япония	человек	2009
3.	T. Kuratani-2	17846	Япония	горная вода	н/д
4.	T208	17847	Япония	человек	н/д
5.	K 1779	17848	Германия	человек	н/д
6.	T274	17849	Япония	человек	нд
7.	K 47	17850	Германия	человек	н/д
8.	M 51	17851	Франция	н/д.	н/д
9.	F Pa 3420	17852	Япония	человек	н/д
10.	F 79	17853	Япония	собака	н/д
11.	T 197	17854	Япония	человек	н/д
12.	FDD 110	17855	Япония	человек	н/д
13.	T 257	17856	Япония	собака	н/д
14.	-	17857	Япония	дикая крыса	н/д
15.	F R 708 Ly	17858	Япония	дикая крыса	н/д
16.	I 6088	17859	Япония	енотовидная собака	н/д
17.	F R 80	17860	Япония	дикая крыса	н/д
18.	FMW-2	17861	Япония	горная вода	н/д
19.	ZN 916	17862	Китай	домовая крыса	н/д
20.	ZCN 3	17863	Китай	дикая крыса	н/д
21.	-	17864	н/д	н/д	н/д
22.	-	17865	н/д	н/д	н/д
23.	IP33111 (360)	20834	Россия, СПб	грызун	н/д
24.	IP33228 (594)	21646	Россия, г. Горно-Алтайск	человек	1993
25.	IP33122 (715)	20835	Россия,	н/д	н/д

			г. Великий Новгород		
26.	2394	20907	Россия, г. Томск	больной	2021
27.	2396	20908	Россия, г. Томск	больной	2021
28.	2397	20909	Россия, г. Томск	больной	2021
29.	2398	20910	Россия, г. Томск	больной	2021
30.	2399	20911	Россия, г. Томск	больной	2021
31.	2401	20832	Россия, г. Томск	больной	2021
32.	2402	20905	Россия, г. Томск	больной	2021
33.	2403	20906	Россия, г. Томск	больной	2021
34.	2442	20912	Россия, г. Красноярск	больной	2021
35.	2443	20913	Россия, г. Красноярск	больной	2021
36.	2444	20914	Россия, г. Красноярск	больной	2021
37.	2445	20915	Россия, г. Красноярск	больной	2021
38.	2446	20916	Россия, г. Красноярск	больной	2021
39.	2447	20833	Россия, г. Красноярск	больной	2021
40.	2448	21219	Россия, г. Красноярск	больной	2021
41.	2449	20917	Россия, г. Красноярск	больной	2021
42.	2450	20918	Россия, г. Красноярск	больной	2021
43.	IP33116 (698)	21209	Россия, СПб	больной	1981
44.	IP33114 (703)	21210	Россия, СПб	больной	1981
45.	IP33118 (711)	21216	Россия, СПб	больной	1981
46.	IP33117 (714)	21218	Россия, СПб	больной	1981
47.	IP33128 (377)	21214	Россия, СПб	больной	2000
48.	IP33130 (378)	21212	Россия, СПб	больной	2000
49.	IP33131 (379)	21647	Россия, СПб	больной	2000
50.	IP33132 (380)	20919	Россия, СПб	больной	2000
51.	IP33133 (381)	20920	Россия, СПб	больной	2000
52.	IP33135 (427)	20921	Россия, СПб	картофель	2000

53.	IP33137 (429)	20922	Россия, СПб	картофель	2000
54.	IP33138 (430)	20923	Россия, СПб	картофель	2000
55.	434(1330)	20924	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
56.	177(1334)	20925	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
57.	190(1336)	20926	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
58.	168(1338)	20927	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
59.	308(1339)	20928	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
60.	121(1341)	21207	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
61.	245/1(1342)	21206	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
62.	173(1344)	21221	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
63.	170(1345)	21202	Россия, г. Новый Уренгой	больной	2007
64.	IP33163(525)	20836	Россия, г. Зима	больной	1998-99
65.	IP33177(540)	21204	Россия, г. Зима	капуста	1998-99
66.	IP33199(563)	21220	Россия, г. Зима	больной	1998-99
67.	IP33200(564)	20837	Россия, г. Зима	больной	1998-99
68.	IP33211(576)	20929	Россия, г. Зима	больной	1998-99
69.	IP33216(581)	20930	Россия, г. Зима	больной	1998-99
70.	IP33239(605)	21215	Россия, г. Зима	больной	1998-99
71.	IP33242(608)	20931	Россия, г. Зима	крыса	1998-99
72.	IP33244(610)	20932	Россия, г. Зима	больной	1998-99
73.	IP33246(612)	20933	Россия, г. Зима	мышь	1998-99
74.	IP33183(546)	21645	Россия, г. Зима	больной	2000
75.	IP33208(573)	21211	Россия, г. Зима	лук	2000
76.	IP33209(574)	21222	Россия, г. Зима	больной	2000
77.	IP33210(575)	21213	Россия, г. Зима	больной	2000
78.	IP33212(577)	21205	Россия, г. Зима	больной	2000
79.	IP33214(579)	21217	Россия, г. Зима	больной	2000
80.	IP33220(586)	21208	Россия, г. Зима	мышь	2000
81.	IP33221(587)	21203	Россия, г. Зима	лук	2000
82.	IP33238(604)	20838	Россия, г. Зима	больной	2000

83.	99	1629	Россия, г. Владивосток	больной	1965
84.	111	1630	Россия, г. Владивосток	больной	1965
85.	113	1632	Россия, г. Владивосток	больной	1965
86.	103	1633	Россия, г. Владивосток	больной	1965
87.	862	1988	Франция	заяц	н/д
88.	861	1992	Франция	голубь	н/д
89.	826	1993	Франция	обезьяна	н/д
90.	506	1995	Германия	заяц	н/д
91.	25	282	Франция	н/д	н/д
92.	463	5504	Швеция, г. Стокгольм	н/д	н/д
93.	1193 (278)	21644	Украина, Хмельницкая обл.	полевка обыкновенная	2005
94.	1212(270)	21643	Украина, Хмельницкая обл.	рыжая полевка	2005
95.	67	268	Франция	н/д	н/д
96.	586	1359	г. Владивосток	морская свинка	1959
97.	837	1990	Франция	индюк	н/д
98.	4166	P-2031	г. Одесса	серая крыса	1962
99.	5680	P-2033	г. Одесса	серая крыса	1961
100.	1391	P-2085	г. Одесса	домовая мышь	1966