

На правах рукописи

КРАСИЛЬНИКОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ПОИСК ФАКТОРОВ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПОЛЕВОЧЬИХ
ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS***

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций, главный научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Федорова Валентина Анатольевна, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), профессор, Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Федерального агентства научных организаций, директор, г. Саратов.

Каратаев Геннадий Иванович, доктор биологических наук (специальность 03.02.03 – микробиология, 03.02.07 - генетика) Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория генетики бактерий, ведущий научный сотрудник, г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Иркутск.

Защита диссертации состоится «10» сентября 2021 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», р.п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В настоящее время принято считать, что вид *Yersinia pestis* обособился от *Y. pseudotuberculosis* 1500-20000 лет назад. Образование нового вида и последующая внутривидовая изменчивость привели к формированию широкого спектра внутривидовых групп чумного микроба (биоваров, подвидов, экотипов, плазмидоваров, генотипов и т.д.), отличающихся по спектру чувствительных к ним млекопитающих и вирулентности. Микроэволюция внутри вида *Y. pestis* приспособила возбудителя чумы к циркуляции в популяциях более 200 видов диких грызунов, а передача патогена между животными осуществляется не менее чем 80 видами блох (Anisimov *et al.*, 2002). Известно, что наибольшее внутривидовое разнообразие, проявляющееся и в избирательной вирулентности отдельных филогенетических групп чумного микроба в отношении различных видов теплокровных животных (включая человека), выявлено в древних азиатских природных очагах чумы, для которых характерно разнообразие грызунов – основных хозяев *Y. pestis*.

«Классические» штаммы чумного микроба *Y. pestis* subsp. *pestis*, циркулирующие в популяциях сурков, сусликов, песчанок, крыс, морских свинок и луговых собачек, обладают «универсальной» вирулентностью, вызывая летальную инфекцию как у мелких грызунов, так и у людей. Штаммы же *Y. pestis* subsp. *microti*, выделенные из популяций различных видов полевок, высоковирулентны для своих основных хозяев и лабораторных мышей, но, как правило, авирулентны для морских свинок и человека. Некоторые из них вызывают у людей спорадические заболевания средней тяжести без дальнейшей передачи от человека человеку (Anisimov *et al.*, 2004, Анисимов с соавт., 2016).

В настоящее время нет единого мнения о возможных причинах избирательной вирулентности штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*. Феномен, скорее всего, связан с отсутствием или структурно-функциональной модификацией генов одного или нескольких факторов патогенности у «полевочьих» штаммов. На сегодняшний день установлены отличия патогенных («классических») и условно-патогенных для человека («полевочьих») штаммов по структуре липополисахаридов (Knirel *et al.*, 2012), и ряда других факторов патогенности: LcrV (Anisimov *et al.*, 2010), Ail (Dentovskaya *et al.*, 2011), CafI (Kopylov *et al.*, 2016), Pla (Dentovskaya *et al.*, 2016), OmpF (Shaban *et al.*, 2017). Однако выявленные отличия не взаимосвязаны со степенью избирательной вирулентности. В то же время, до сих пор не проводили систематического и детального изучения структурных и функциональных особенностей других факторов патогенности из штаммов, отличающихся по спектрам чувствительных к ним животных.

Сравнительный анализ вирулентных и авирулентных штаммов (в идеале изогенных или хотя бы из одного клонального кластера) на уровне геномов, транскриптомов и (или) протеомов может способствовать получению новых знаний о молекулярных механизмах патогенеза чумы, поиску новых факторов патогенности *Y. pestis* – потенциальных молекулярных мишеней для этиотропного лечения, вакцинопрофилактики и иммунотерапии (Niikura *et al.*, 1987, Ellison *et al.*, 2008, Johnson *et al.*, 2013, Uda *et al.*, 2014).

Степень разработанности темы исследования

В целом ряде исследований оценивали дифференциальную продукцию белков культурами *Y. pestis*, выращенными *in vitro* в различных условиях (Chromy *et al.*, 2005, Nixson *et al.*, 2006, Pieper *et al.*, 2008, Pieper *et al.*, 2009). Однако при этом вирулентность

взятых для анализа штаммов чумного микроба не учитывали. Помимо этого, до последнего времени не проводили изучение спектров, продуцируемых *in vivo* белков – потенциальных факторов избирательной вирулентности для субкультур одного и того же штамма *Y. pestis*, характеризующихся различиями в вирулентности для морских свинок.

Цель исследования:

Поиск факторов избирательной вирулентности полевочьих штаммов *Yersinia pestis*.

Задачи исследования:

1. Провести селекцию одной-двух пар культур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок.
2. Выполнить сравнительный протеомный анализ изучаемых пар культур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, культивированных *in vitro* и *in vivo*.
3. Выполнить нокаутный мутагенез и комплементацию генов, обнаруженных предполагаемых факторов патогенности, отвечающих за избирательную вирулентность, и изучить свойства мутантных штаммов.
4. Оценить вклад продуктов выбранных генов в иммуногенез чумы.

Научная новизна исследования

Выявлены пять белков (WP_050548832.1, EIR69411.1, WP_002209962.1, WP_038931127.1, WP_016599821.1), экспрессия которых увеличивалась у высоковирулентных для морских свинок субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, выращенных *in vivo* – в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок. Кроме того, у вирулентных для морских свинок культур, выращенных *in vivo*, отметили увеличение в 5-7 раз продукции капсульного антигена Caf1 и прекращение продукции пестицина Pst.

Впервые показано, что мутация по гену *htpG* не влияет на вирулентность штаммов *Y. pestis* основного подвида и bv. *ulegeica* для мышей и морских свинок.

Впервые получены экспериментальные доказательства отсутствия влияния одиночной нокаутной мутации по гену *glnA* на вирулентность штаммов *Y. pestis* основного подвида для мышей и морских свинок. Показано, что для аттенуации в отношении двух видов животных требуется генетический нокаут всего *glnALG* оперона.

Впервые установлено, что Δ *glnALG* штамм *Y. pestis* не вызывает гибели мышей и морских свинок при подкожном введении и обеспечивает 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 200 DCL.

Впервые доказано, что делеция гена *metQ* ведет к аттенуации штамма *Y. pestis* основного подвида и для мышей, и для морских свинок. Комплементация делеционного мутанта восстанавливала его вирулентность для двух видов лабораторных животных.

Приоритет предложенного способа сенсibilизации планшета для иммуноферментного анализа нерастворимыми белковыми антигенами защищен патентом на изобретение № RU 2 732 013 C1, МПК G01N 33/569. Заявка 2019140904 11.12.2019 г. Опубликовано: 10.09.2020 г. Бюл. № 25.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные в рамках диссертационного исследования данные о молекулярных отличиях «полевочьих» штаммов *Y. pestis* с различной степенью избирательной вирулентности расширяют представления о механизмах патогенеза инфекций бактериальной этиологии и микроэволюции их возбудителей.

Использованный методический подход, заключающийся в анимализации путем последовательных тестикулярных пассажей, как правило, авирулентных для морских

свинок при подкожном заражении «полевочьих» штаммов чумного микроба, может быть применен для дифференциации бактериальных культур по степени их избирательной вирулентности.

Разработаны приемы культивирования вирулентных штаммов чумного микроба в перитонеальной полости морских свинок с использованием камер из диализной мембраны, подготовлены методические рекомендации «Модельная система для исследования изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы к организму млекопитающего» (утверждены директором ФБУН ГНЦПМБ 22.04.2020 г., протокол № 3).

Определено инактивирующее действие химических реагентов для получения безопасных препаратов белков из вирулентных штаммов *Y. pestis*, пригодных после разделения путем двумерного электрофореза для дальнейшего масс-спектрометрического анализа, подготовлены методические рекомендации «Подготовка и анализ препаратов белков из штаммов чумного микроба методом двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте рН» (утверждены директором ФБУН ГНЦПМБ 22.04.2020 г., протокол № 3).

Депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (п. Оболенск Московской обл.) штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* bv. *orientalis* EV НИИЭГ Δ glnALG::*cat*, EV НИИЭГ Δ glnA::*cat*, EV НИИЭГ Δ htpG::*cat* и EV НИИЭГ Δ metQ::*kan*, дефектные по синтезу глутаминсинтетазы и продуктов двухкомпонентной системы регуляции глутаминсинтетазы, белка теплового шока и субстрат-связывающей единицы ABC-транспортера метионина, соответственно, и штаммы *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET32b-Fba-His₆, *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-HtpG-His₆, *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-MetQ-His₆, *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-GlnA-His₆ – продуценты рекомбинантных белков Fba, HtpG, MetQ и GlnA, соответственно (федеральный уровень внедрения).

В ФБУН ГНЦПМБ Роспотребнадзора материалы диссертационной работы используются при подготовке кадров высшей квалификации (аспирантуре) по направлению 06.06.01 – Биологические науки, профиль 03.02.03 - микробиология и для слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации в рамках программы дополнительного профессионального образования «Микробиология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при чтении лекций и проведении практических занятий.

Методология и методы исследования

Методология исследования соответствовала поставленным задачам. Предметом исследования явились предполагаемые факторы избирательной вирулентности полевочьих штаммов *Y. pestis*. В работе использовали микробиологические, молекулярно-генетические, биохимические, иммунологические, биологические и биоинформатические методы, протеомный анализ, а также методы статистической обработки данных.

Штаммы бактерий. В диссертационном исследовании использовали 91 штамм бактерий: *Y. pestis* subsp. *pestis* (n = 11) и *Y. pestis* subsp. *microti* (n = 73), в том числе bv.: *caucasica* (n = 52), *hissarica* (n = 3), *talassica* (n = 4), *altaica* (n = 6), *xilingolensis* (n = 1), *ulegeica* (n = 6), циркулирующих на территории природных очагов чумы СНГ и Монголии, а также *Escherichia coli* (n = 7)

Лабораторные животные. В экспериментах использовали нелинейных мышей породы Swiss Webster (19 ± 2) г, а также морских свинок (275 ± 25) г (филиал «Апрелевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Все протоколы экспериментов на животных были одобрены Комитетом по Биоэтике ГНЦ ПМБ (разрешение № ВП-2015/2, ВП-2016/1).

Микробиологические методы. Микроорганизмы выращивали в жидких или на плотных питательных средах Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ), ВНИ (Brain Heart Infusion, HiaMedia, Индия), LB, pH 7,2 (Maniatis, 1982) или минимальной среде M9, pH 7,4 (Maniatis, 1982). Отбор клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды, вели на средах с добавлением соответствующих антибиотиков в концентрациях: ампициллин - 100 мкг/мл, канамицин - 40 мкг/мл, хлорамфеникол - 10 мкг/мл.

Молекулярно-генетические методы. Нокаутные мутанты получали методом RedGam мутагенеза (Datsenko, Wanner, 2006) или с использованием суицидного вектора (Donnenberg *et al.*, 1991). Гены *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV НИИЭГ клонировали в составе векторной плазмиды pET32b(+) по сайтам рестриктаз NdeI и XhoI в клетках протеазадефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, США).

Биохимические методы. Рекомбинантные антигены выделяли методом металло-хелатной хроматографии.

Протеомный анализ. Анализ белковых препаратов осуществляли методом двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте pH, как описано ранее (Hirano *et al.*, 2000). Масс-спектрометрический анализ выполняли на приборе Reflex IV MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия) в рефлекс-режиме, используя азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса 9 Hz в режиме положительных ионов. Белки идентифицировали с помощью программного обеспечения Mascot Software (Matrix Science Ltd., London, UK).

Биологические методы. Отбор высоковирулентных штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* проводили при подкожном заражении беспородных мышей двухсуточной культурой в дозах 10^2 и 10^3 КОЕ. Культуры, выделенные от животных, павших в ранние сроки от меньшей дозы (наблюдение 10 сут), четырехкратно последовательно пассировали через тестикулы самцов морских свинок со снижением инфицирующей дозы после первых двух этапов с 10^9 до 10^8 КОЕ. Высевы осуществляли из тестикул, лимфоузлов, печени, селезенки, головного мозга и крови павших или подвергнутых эвтаназии морских свинок (срок наблюдения 4 сут).

Для протеомного анализа отобранные субкультуры выращивали *in vivo* в перитонеальной полости морских свинок с использованием камер из диализной мембраны (Sigma-Aldrich D9652-100FT) (размер пор 10500 НОММ, ширина 33 мм).

Вирулентность сконструированных мутантов определяли по величине LD₅₀ по сравнению с исходными высоковирулентными штаммами *Y. pestis* на модели бубонной формы инфекции у нелинейных белых мышей и морских свинок.

Иммунологическую активность и протективность рекомбинантных белков GlnA, Fba, MetQ и HtpG (10 мкг), сорбированных на гидроокиси алюминия (1 : 1), оценивали после двукратного подкожного введения (через 30 сут) нелинейным мышам (19 ± 2 г ($n = 120$)). Для определения LD₅₀ на 30 сут после бустерного введения антигенов иммунизированных мышей и животных контрольной группы заражали вирулентным штаммом *Y. pestis* 231.

Иммунологические методы. Для оценки титров антител к рекомбинантным белкам *Y. pestis* в сыворотках иммунных мышей или переболевших морских свинок использовали метод твердофазного ИФА (Егоров с соавт., 1991). Фракции клеточных белков получали, как описано Obi *et al.* (2011, 2013). Иммуоблот выполняли, как описано ранее (Towbin *et al.*, 1979).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили, используя Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA), выполняя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Вычисление величин LD₅₀, а также доверительных интервалов (для

вероятности 95 %) проводили по методу Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (1972).

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный комплекс методических приемов позволяет проводить селекцию субкультур штаммов *Y. pestis*, принципиально отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок.

2. Избирательное "выключение" генов *htpG* или *glnA* не приводит к снижению вирулентности мутантных штаммов *Y. pestis* при подкожном заражении белых мышей и морских свинок.

3. Оперон *glnALG* и индивидуальный ген *metQ* – потенциальные «молекулярные мишени» для создания аттенуированных вакцинных штаммов и лечения чумы.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территорий Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней» и гранта Российского Научного Фонда № 14-15-00599 «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочных штаммов *Yersinia pestis*».

Достоверность результатов определяется использованием современных методов, документально регистрирующих изучаемые явления и объекты, достаточным по объему фактическим материалом и наличием соответствующих контролей, а также проведением статистической обработки данных.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на семи Всероссийских и международных конференциях: 22nd International scientific conference "Current issues on zoonotic diseases" (05 July 2017, Ulaanbaatar, Mongolia); XI-ом съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (16-17 ноября 2017 г., Москва); Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика – 2017» (18–20 апреля 2017 г. Москва); 22-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (23-27 апреля 2018 г., Пущино); International Conference on Plague Prevention and Control (12-16 November 2018, Harbin, China); Международной конференции "Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (4-6 декабря 2018 г. Санкт-Петербург); XI-ом Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (1-3 апреля 2019 г., Москва).

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в анализе литературных данных, планировании экспериментов, в выполнении молекулярно-биологических, микробиологических, иммунобиологических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с канд. биол. наук П.Х. Копыловым, д-ром мед. наук С.В. Дентовской, канд. биол. наук С.А. Ивановым, канд. биол. наук М.Е. Платоновым, канд. биол. наук Т.И. Комбаровою, канд. биол. наук Т.Э. Светоч. Масс-спектрометрическую идентификацию белков проводили совместно с сотрудниками ЗАО «Постгеномные и

нанотехнологические инновации». На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль автора была определяющей.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи в реферируемых научных журналах и один патент.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, результатов исследования с их обсуждением, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего 11 работ отечественных и 299 работы зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 10 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Отбор пар штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, отличающихся по вирулентности для морских свинок

На первом этапе провели селекцию субкультур штаммов, *Y. pestis* subsp. *microti*, вирулентность которых при подкожном заражении морских свинок соответствовала

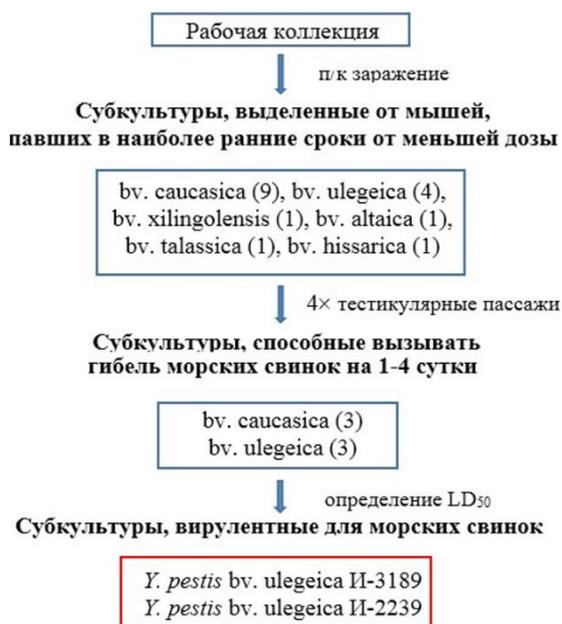


Рисунок 1 – Схема проведения экспериментов по отбору вирулентных субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*

вызывать генерализованную инфекцию. В ходе выполнения этой части исследования удалось отобрать два штамма *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica* И-3189 и И-2239, вирулентность субкультур которых после проведения тестикулярных пассажей достоверно не отличалась от вирулентности штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* при подкожном заражении морских свинок (Таблица 1).

или приближалась к таковой у штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* (Рисунок 1). После анимализации путем подкожных пассажей 52-х штаммов *Y. pestis* bv. *caucasica*, 6-ти штаммов bv. *ulegeica*, 1-го штамма bv. *xilingolensis*, 6-ти штаммов bv. *altaica*, 4-х bv. *talassica* и 3-х штаммов bv. *hissarica* удалось отобрать 17 культур высоковирулентных для мышей, вызывавших гибель животных при введении доз 10^2 - 10^3 КОЕ.

Затем провели четыре последовательных пассажа микробных культур через тестикулы самцов морских свинок. Гемато-тестикулярный барьер, защищая чумной микроб от иммунной системы хозяина, позволил в ряде случаев именно вирулентным бактериям размножиться с опережением, накопиться и

Таблица 1 – LD₅₀ штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* И-3189 и И-2239 и *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 для морских свинок (п/к заражение)

<i>Y. pestis</i>		LD ₅₀ , КОЕ	
		До пассажей	После пассажей
subsp. <i>microti</i>	И-3189	> 10 ⁸	68 (17-271)
	И-2239	> 10 ⁸	2 (1-9)
subsp. <i>pestis</i>	231	15 (4-58)	

Полногеномное секвенирование сравниваемых субкультур *Y. pestis* subsp. *microti* И-3189 и И-2239, отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок примерно в 10^6 раз (Anisimov *et al.*, 2018), показало отсутствие отличий на уровне нуклеотидных последовательностей, что свидетельствует о наличии у чумного микроба механизмов регуляции вирулентности на уровне экспрессии отдельных или групп генов.

Модельная система для исследования физиологических изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы к организму млекопитающего

Учитывая, что степень экспрессии отдельных генов *in vitro* и *in vivo* может отличаться, на следующем этапе исследования, предприняли попытку адаптировать предложенный ранее для *Borrelia burgdorferi* и *Leptospira interrogans* (Akins *et al.*, 1998, Grassmann *et al.*, 2015) технический подход, заключающийся в культивировании вирулентных штаммов в перитонеальной полости крыс с использованием камер из диализной мембраны. Малый размер пор диализной мембраны позволяет питательным веществам из организма хозяина проникать внутрь камеры и препятствует попаданию антител и эффекторных клеток иммунной системы. Данная модель наиболее близка к реальному инфекционному процессу при чуме. Две субкультуры (исходную авирулентную для морских свинок и после тестикулярных пассажей) каждого из штаммов *Y. pestis* bv. *ulegeica* культивировали в течение 2 сут в жидкой питательной среде в диализных камерах, имплантированных в брюшную полость морских свинок (Рисунок 2). Затем диализный мешок извлекали, а его содержимое отбирали путем аспирации с помощью стерильного шприца и использовали для выделения белков.

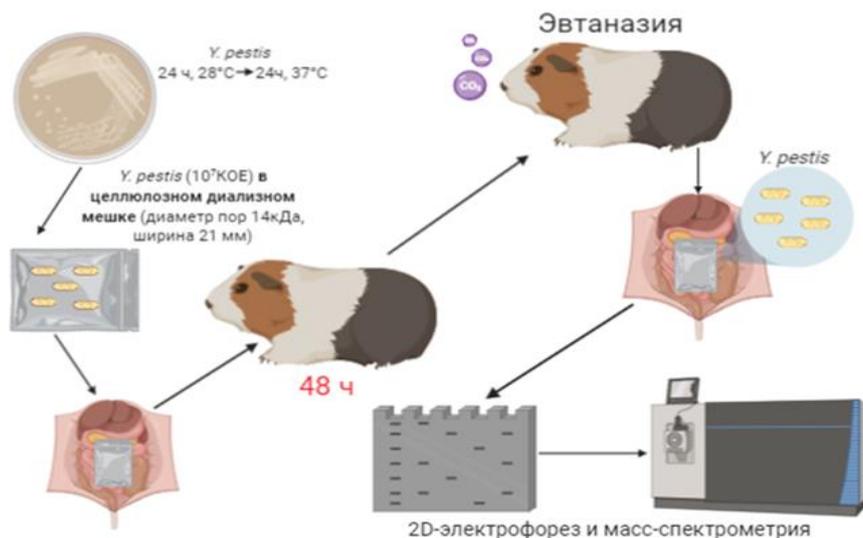
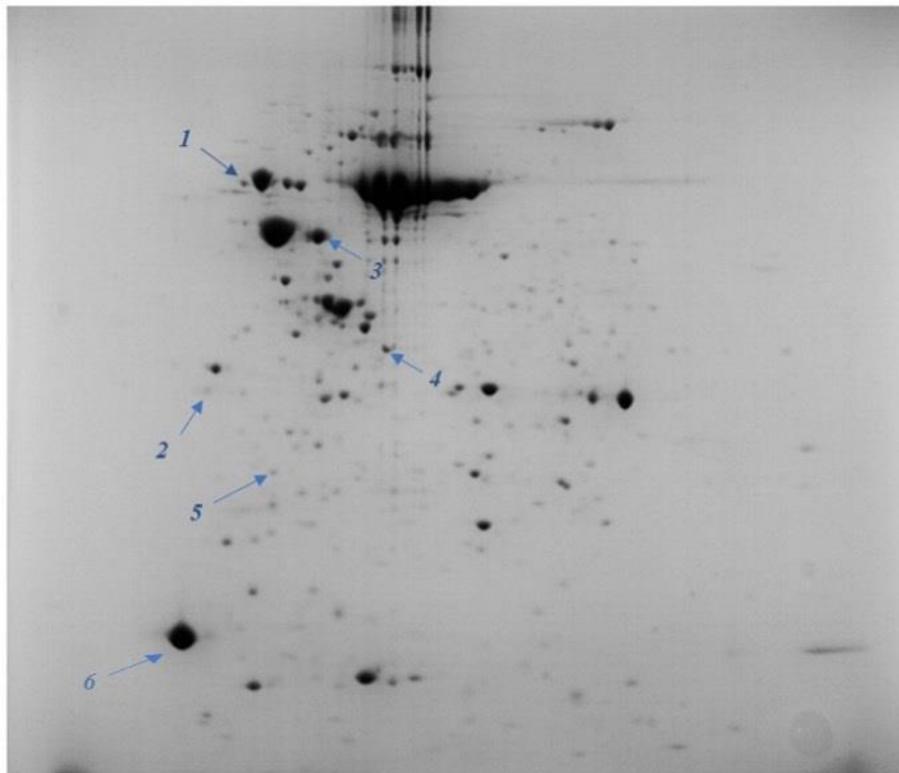


Рисунок 2- Схема протеомного анализа субкультур *Y. pestis*, выращенных в диализных камерах в организме морских свинок

Сравнительный анализ протеомов субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, принципиально отличающихся по вирулентности для морских свинок

При проведении двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте рН белковых экстрактов выявили появление пяти новых белковых пятен у вирулентных для морских свинок субкультур штаммов subsp. *microti* по сравнению с авирулентными

(Рисунок 3). С использованием масс спектрометрии идентифицировали следующие белки: белок теплового шока HtpG (WP_050548832.1), глутаминсинтазу GlnA (EIR69411.1), две изоформы фруктозо-бисфосфат альдолазы (WP_002209962.1), субстрат-связывающий белок ABC транспортера метионина MetQ (WP_038931127.1) и гипотетический белок (WP_016599821.1). Часть из этих белков относят к полифункциональным "белкам лунного света" (глутаминсинтаза, фруктозо-бисфосфат альдолаза), функционирующим как в цитоплазме, так и на поверхности клетки. Кроме того, обнаружили исчезновение одного пятна, соответствующего бактериоцину – пестицину, и увеличение в 5-7 раз продукции капсульного антигена Caf1 чумного микроба.



1 – молекулярный шаперон HtpG [*Y. pestis*]; 2 – глутаминсинтаза тип 1 [*Y. pestis* PY-25]; 3 – гипотетический белок [*Y. pestis*]; 4 – фруктозо-бисфосфат альдолаза [*Yersinia*]; 5 – субстрат-связывающий белок MetQ [*Y. pestis*]; 6 – капсульный антиген Caf1 [*Y. pestis*]

Рисунок 3 – Двумерный электрофорез вирулентной для морской свинки субкультуры *Y. pestis*

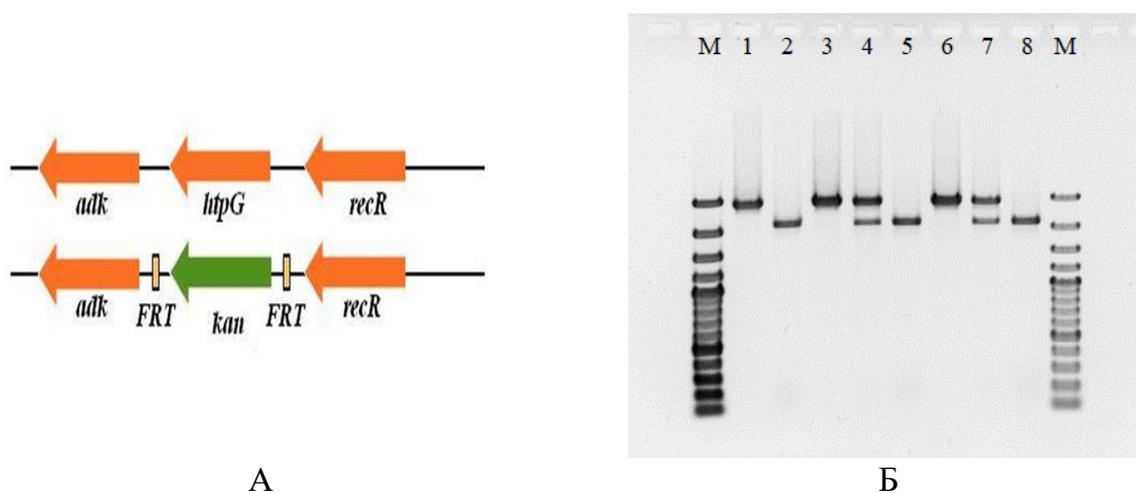
Нокаутный мутагенез генов, кодирующих выбранные белки полевоочьих штаммов чумного микроба, с последующей комплементацией необходим для изучения их вклада в патогенез чумы. Поэтому следующий этап нашего исследования был посвящен получению делеционных мутантов и комплементации генов обнаруженных белков, а именно HtpG, GlnA, GlnALG и MetQ.

HtpG⁻ штаммы *Y. pestis*

HtpG (высокотемпературный белок G - *high-temperature protein G*) – бактериальный гомолог высоко консервативного молекулярного шаперона Hsp90

эукариот, необходим для продукции ряда факторов патогенности *E. coli* (Garcie *et al.*, 2016), персистенции *Salmonella Typhimurium* в кишечнике свиней (Verbrugge *et al.*, 2015), а также играет важную роль в патогенезе инфекций, вызываемых *Francisella tularensis* (Weiss *et al.*, 2007), *Leptospira interrogans* (King *et al.*, 2014) и *Edwardsiella tarda* (Dang *et al.*, 2011). Проведенный биоинформатический анализ показал высокую консервативность (100 % идентичности) белка HtpG внутри вида *Y. pestis* (100 % идентичности), а также с белком *Y. pseudotuberculosis* (99 % идентичности) и *Y. enterocolitica* (96 % идентичности). Кроме того, BLASTp анализ HtpG выявил, что белок обладает значительным подобием с остальными HtpG и Hsp90 белками.

Для изучения функциональной важности HtpG в патогенезе чумы с помощью сайт-направленного мутагенеза гена *htpG* (YPO3119) получили изогенные наборы на основе аттенуированных и вирулентных штаммов *Y. pestis* (Рисунок 4).



Б: 1 – исходный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (2882 п.н.); 2 – штамм *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*htpG*::*cat* (2198 п.н.); 3 – исходный штамм *Y. pestis* 231; 4 – *Y. pestis* 231/pCVD442Δ*htpG*::*cat* (мерозигота); 5 – *Y. pestis* 231Δ*htpG*::*cat*; 6 – исходный штамм *Y. pestis* И-3189; 7 – И-3189/pCVD442Δ*htpG*::*cat* (мерозигота); 7 – *Y. pestis* И-3189Δ*htpG*::*cat*; М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Рисунок 4 – Схема конструирования HtpG⁻ варианта штамма *Y. pestis* (А) Скрининг мутантных клонов в ПЦР с праймерами HtpG2F и HtpG2R (Б)

Штаммы *Y. pestis* с делецией *htpG* проявляли чувствительность к температурному стрессу, обладая фенотипом общим для *htpG* мутантов других бактериальных видов (Рисунок 5). Однако мутанты не были чувствительны к осмотическому стрессу и комплементу сыворотки крови человека. При анализе выживания в присутствии H₂O₂ (40 mM) установили снижение жизнеспособности мутантного штамма EV НИИЭГΔ*htpG* (86,3 %) по сравнению с исходным штаммом EV НИИЭГ (95,2 %) ($p < 0,001$). Число бактерий исходного и мутантного штаммов, переживших инкубацию в жидкой питательной среде при pH 3,5 не отличалось

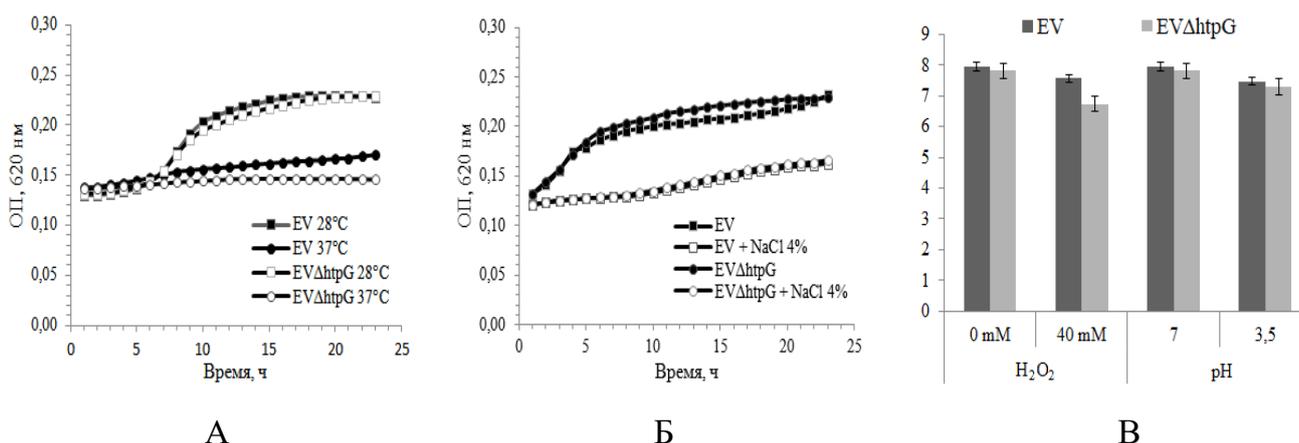


Рисунок 5 – Рост штамма «дикого» типа и мутанта EV НИИЭГΔhtpG *in vitro*: А - при температурах 28 °С и 37 °С; Б - в условиях нормальной (0,5 % NaCl) и повышенной (4 % NaCl) осмолярности; В – при добавлении перекиси водорода и изменении рН среды

Утрата чумным микробом способности к синтезу белка HtpG не оказывала влияния на вирулентность и средние сроки жизни мышей и морских свинок при подкожном способе заражения, что свидетельствует о не перспективности его использования в качестве молекулярной мишени для терапии и/или вакцинопрофилактики чумы (Таблица 2).

Таблица 2 - Вирулентность экспериментальных штаммов *Y. pestis* при подкожном заражении беспородных мышей

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Характеристика	LD ₅₀ , КОЕ *	средние сроки гибели, сут
231	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ HtpG ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ **	1 (1÷2)	5,4 ± 0,5
231ΔhtpG	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ HtpG ⁻ Pla ⁺ Pgm ⁺	5 (1 ÷ 18)	4,4 ± 1,0
И-3189	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ HtpG ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	2 (1 ÷ 5)	4,7 ± 0,9
И-3189ΔhtpG	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ HtpG ⁻ Pla ⁺ Pgm ⁺	5 (1 ÷ 18)	5,7 ± 1,9

Примечания: * 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках;

** - способность к продукции: Fra – капсульного антигена, Ymt – мышинового токсина, Lcr – Yop белков и V антигена, HtpG – белок теплового шока, Pla – активатора плазминогена; Pgm – сочетанная способность к сорбции гемина и чувствительности к пестицину.

GlnA⁻ и GlnALG⁻ штаммы *Y. pestis*

Одной из центральных молекул в обмене азота в клетке прокариот является глутамин, который синтезируется с помощью фермента глутаминсинтетазы из L-глутамата, аммиака с участием АТФ (Reitzer *et al.*, 1987). Известно, что приспособительная реакция к изменениям внеклеточного содержания азота у бактерий координируется двухкомпонентной системой GlnLG (Jiang *et al.*, 1999).

Генетический локус *glnALG* располагается у чумного микроба, как у кишечной палочки между генами *typA* и *hemN* (Рисунок 6). В состав локуса входят три гена *glnA* (YPO0024, кодирующий глутаминсинтетазу, состоящую из 469 а.о.), *glnL* (YPO0023, кодирующий сенсорную гистидинкиназу, состоящую из 349 а.о.) и *glnG* (YPO0022,

кодирующий синтез регуляторного белка, состоящего из 470 а.о.). Внутри вида *Y. pestis* белки высоко консервативны – BLASTp показал 99,5-100 % гомологию у штаммов различных биоваров чумного микроба. С энтеропатогенными представителями рода *Yersinia* процент гомологии аминокислотных последовательностей в BLASTp составил 94-100 %. Гомология аминокислотных последовательностей с белками GlnA, GlnL и GlnG других представителей *Enterobacteriaceae* была тоже достаточно высока (> 93 %).

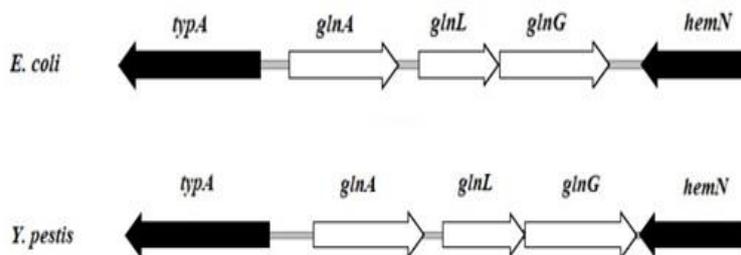
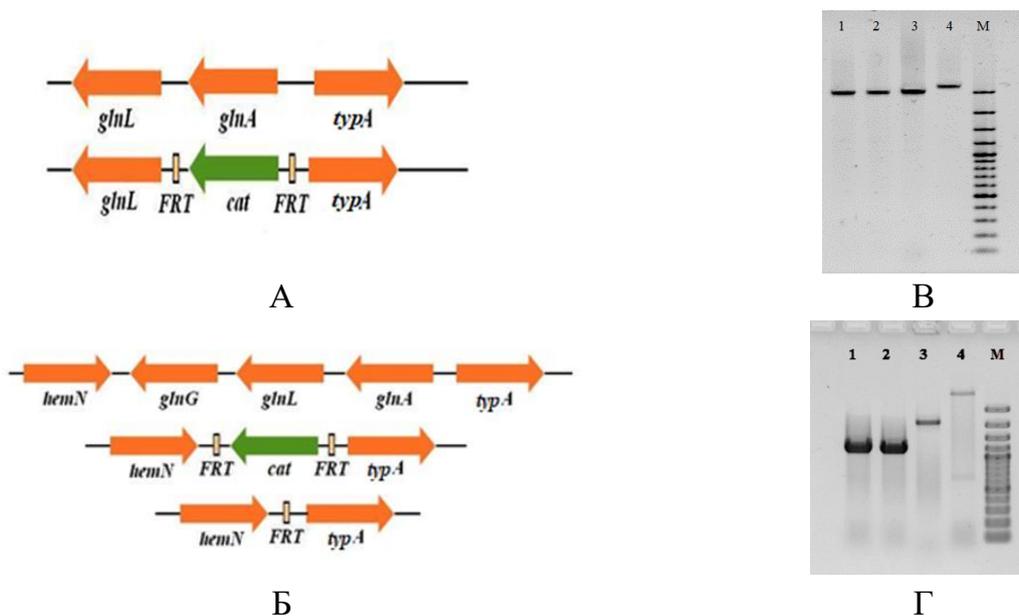


Рисунок 6 – Генетическая организация региона *glnALG* у чумного микроба и других бактерий

Проведенный сайт-направленный мутагенез одиночного гена *glnA* или трех генов *glnALG* в вакцинном штамме EV НИИЭГ, а также в вирулентном штамме *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 позволили получить мутанты EV НИИЭГΔ*glnA*, EV НИИЭГΔ*glnALG*, 231Δ*glnA* и 231Δ*glnALG* (Рисунок 7).



В: 1-3 – *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*glnA*::*cat* (3031 п.н.); 4 – исходный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (3432 п.н.); М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)
Г: 1,2 – *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*glnALG* (1100 п.н.); 3 – *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*glnALG*::*cat* (2188 п.н.); 4 – исходный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ 5256 п.н.); М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Рисунок 7 – Схема конструирования GlnA⁻ (А) и GlnALG⁻ (Б) вариантов штаммов *Y. pestis* и скрининг мутантных клонов в ПЦР

Созданные мутантные штаммы приобрели ауксотрофность по глутамину и не росли на плотных и в жидких питательных средах в его отсутствии, при добавлении 20 мМ глутамин скорость роста штамма *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*glnA* восстанавливалась, штамм *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*glnALG* продолжал достоверно отставать от контрольного (Рисунок 8).

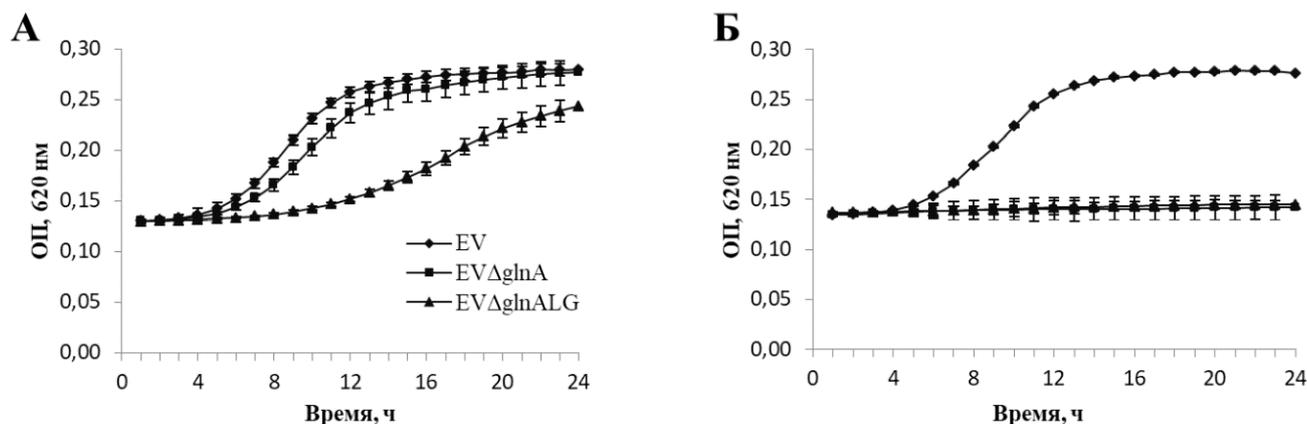


Рисунок 8 – Рост штамма «дикого» типа и мутантов EV НИИЭГΔ*glnA* и EV НИИЭГΔ*glnALG* в жидкой питательной среде *in vitro* при температуре 28 С: А – в присутствии 20 мМ глутамин; Б – без глутамин

Дефект в биосинтезе глутамин и потенциально ассоциированное с этим нарушение метаболизма азота может повреждать взаимоотношения патоген-хозяин. Вирулентность сконструированных мутантов *Y. pestis* 231Δ*glnA* и 231Δ*glnALG* определяли по величине LD₅₀ по сравнению с исходным высоковирулентным штаммом *Y. pestis* 231 для беспородных мышей и морских свинок, зараженных подкожно (Таблица 4). Утрата чумным микробом способности к синтезу GlnA не оказывала влияния на вирулентность и средние сроки жизни мышей и морских свинок при подкожном способе введения. Штамм с делецией генов *glnALG* при подкожном способе введения был авирулентен для мышей и морских свинок в максимальных дозах, использованных для заражения (Рисунок 9).

Таблица 4 - Вирулентность экспериментальных штаммов *Y. pestis* при подкожном заражении беспородных мышей и морских свинок

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Мыши		Морские свинки	
	LD ₅₀ , КОЕ *	средние сроки гибели, сут	LD ₅₀ , КОЕ *	средние сроки гибели, сут
231	1 (1 ÷ 2)	5,4 ± 0,5	15 (4 ÷ 58)	8,5 ± 0,8
231Δ <i>glnA</i>	5 (1 ÷ 20)	6,5 ± 0,4	10 (0 ÷ 10)	8,4 ± 0,6
231Δ <i>glnALG</i>	> 10 ⁵		> 10 ⁷	

Примечания: * 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках; НД – нет данных

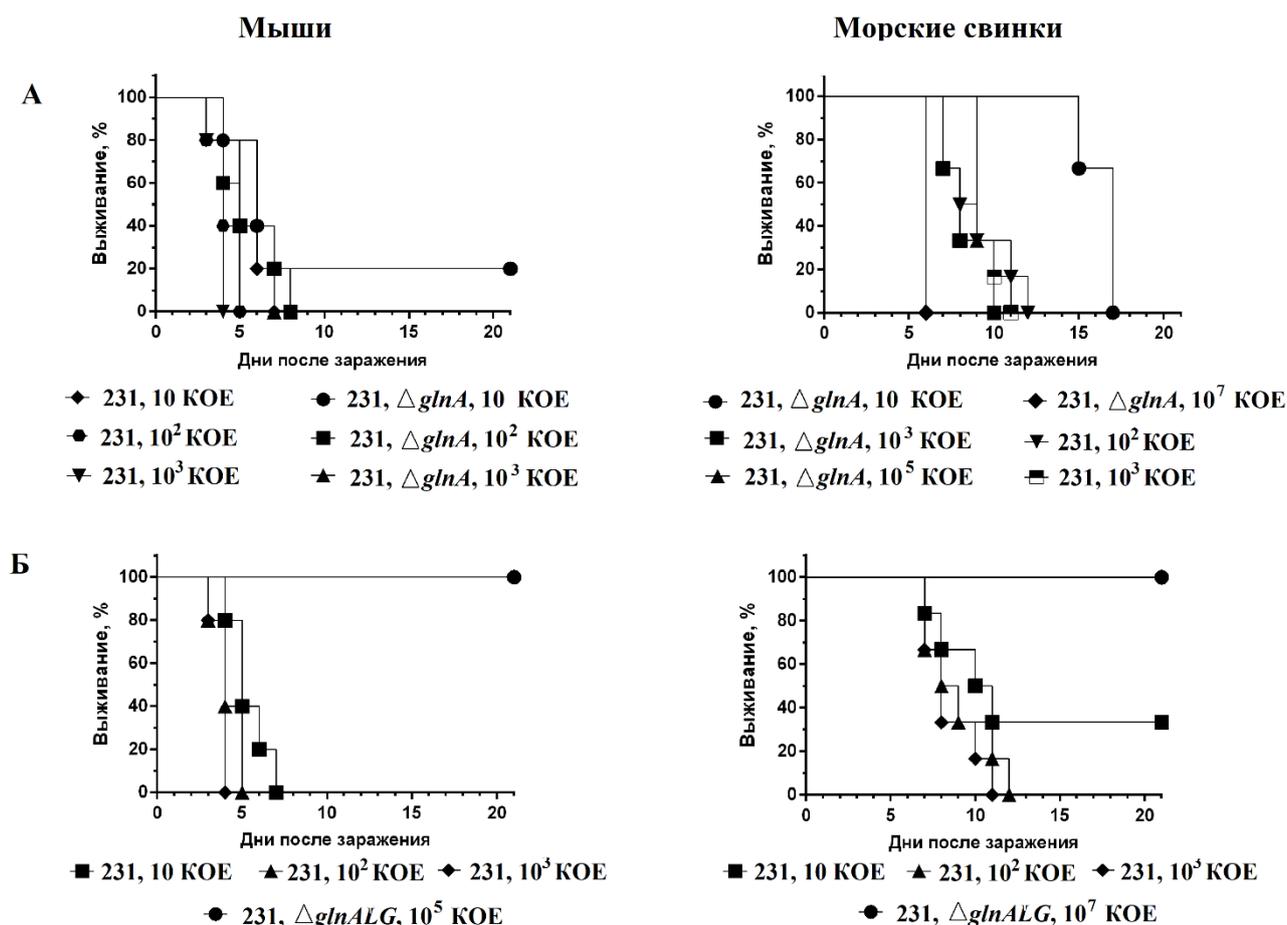


Рисунок 9 – Выживаемость беспородных мышей и морских свинок после подкожного заражения штаммами *Y. pestis* 231 $\Delta glnA$ (А) или $\Delta glnALG$ (Б)

Нокаут генов, отвечающих за транспорт или синтез веществ, необходимых для жизнедеятельности микроорганизма, является перспективным подходом при создании вакцинных штаммов против многих инфекционных заболеваний. Мы оценили иммуногенность сконструированного штамма *Y. pestis* 231 $\Delta glnALG$ для мышей и морских свинок. Подкожное введение штамма *Y. pestis* 231 $\Delta glnALG$ не вызывало гибели мышей, а при иммунизирующей дозе 10^5 КОЕ обеспечивало 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 (500 КОЕ). При использовании более низких иммунизирующих доз (10^2 - 10^4 КОЕ) выживаемость животных составляла от 40 % до 80 %. Все морские свинки, иммунизированные штаммом 231 $\Delta glnALG$ в дозах 10^4 - 10^7 КОЕ (Рисунок 10) пережили последующее заражение вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 (10^4 КОЕ). Протективность штамма *Y. pestis* 231 $\Delta glnALG$ была более выражена на модели бубонной чумы у морских свинок.

Таким образом, аттенуированный штамм *Y. pestis* 231 $\Delta glnALG$ может рассматриваться как перспективный кандидатный вакцинный штамм. Данный тип аттенуации *Y. pestis*, связанный с вмешательством в метаболизм микроорганизма, может дать дополнительные преимущества при конструировании вакцинного штамма, т.к. экспрессия генов чумного микроба, продукты которых связаны с патогенностью, не повреждается и полный антигенный состав доступен для узнавания иммунной системой и формирования разнонаправленного иммунного ответа хозяина.

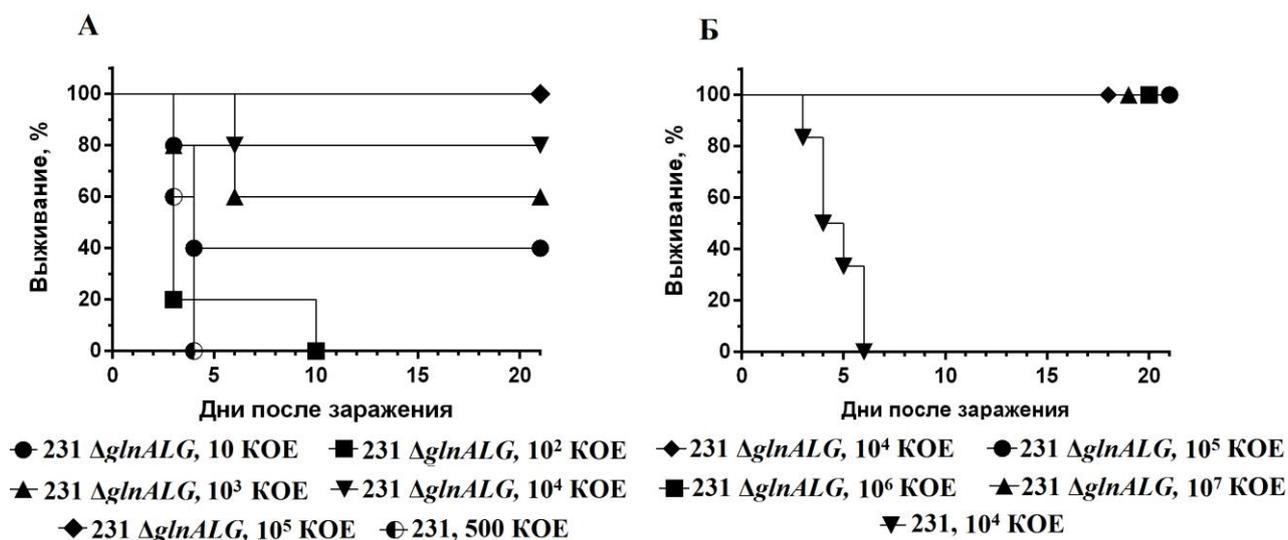


Рисунок 10 - Выживаемость беспородных мышей (А) и морских свинок (Б), подкожно вакцинированных штаммом *Y. pestis* ΔglnALG, после подкожного заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 231

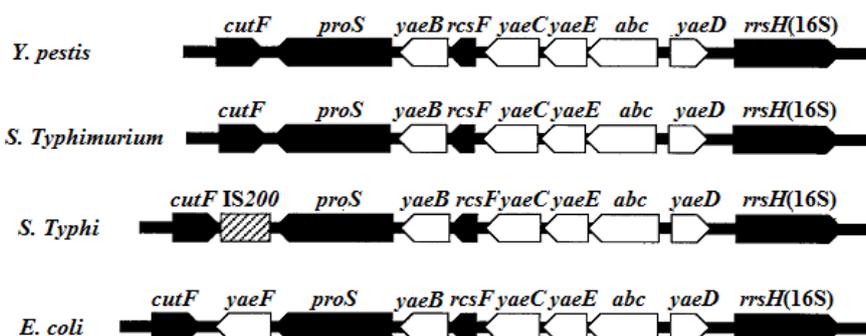
Полная оценка характеристик полученного штамма *Y. pestis* 231ΔglnALG и определение его соответствия МУ 3.3.1.1113-02 «Основные требования отбора новых вакцинных штаммов чумного микроба» будет одним из направлений наших дальнейших исследований.

MetQ⁻ штаммы *Y. pestis*

Поглощение и синтез метионина необходимы для вирулентности многих бактериальных патогенов, таких как *S. enterica* (Ejim *et al.*, 2004), *Haemophilus influenzae* (Chanyangam *et al.*, 1991) и *S. pneumoniae* (Bardwell *et al.*, 1987). Большинство микроорганизмов способны синтезировать метионин *de novo* из аспарагина в ходе ряда реакций, включающих ассимиляцию неорганических сульфатов и синтез цистеина или гомоцистеина (Ferla *et al.*, 2014). Известно, что штаммы основного подвида чумного микроба не способны к самостоятельному синтезу метионина вследствие делеции одного нуклеотида (-G) в позиции 988 гена *metB*, кодирующего цистетин-γ-синтазу и проявляют ауксотрофность по данной аминокислоте (Odinokov *et al.*, 2011). Основными системами поглощения метионина у бактерий являются ABC-транспортеры, в том числе MetNIQ (MetD) у *E. coli* (Kadner *et al.*, 1974, Kadner *et al.*, 1974, Merlin *et al.*, 2002) и MetQNP *S. pneumoniae* (Bartra *et al.*, 2008) и *N. gonorrhoeae* (Semchenko *et al.*, 2017).

Генетический локус, предположительно кодирующий ABC-транспортер метионина, располагается у чумного микроба, как и у кишечной палочки между генами *rscF* и *gmhB* (Рисунок 11). В состав локуса входят три гена *metN* (YPO1074, ранее *abc*, кодирующий АТФ-азу), *metI* (YPO1072, ранее *yaeE*, кодирующий пермиазу) и *metQ* (YPO1071, ранее *yaeC*, кодирующий синтез субстрат-связывающего белка).

Открытая рамка считывания *metQ* (YPO1071 у *Y. pestis* CO92) длиной 816 п.о. кодирует DL-метионин-связывающий липопротеин MetQ (CAL19737.1), состоящий из 271 а.о. В структуре белка 1-22 а.о. относится к сигнальному пептиду. Белок MetQ *Y. pestis* предположительно имеет молекулярную массу 29,4 кДа и pI=5,21, аннотирован как гипотетический липопротеин и входит в TIGRFAM семейство липопротеинов "TIGR00363".

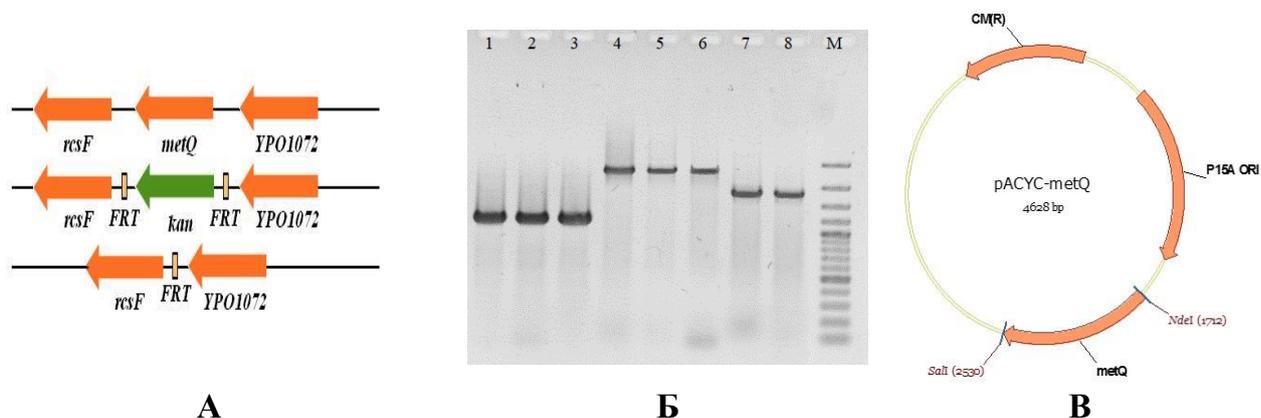


Для сравнения между микроорганизмами обозначения генов *abc*, *yaeB*, *yaeC*, *yaeD* и *yaeE*, ранее использованные для *E. coli*, применили к ортологам из других видов. Аннотированные названия генов *yaeB*, *yaeC*, *yaeE*, *yaeD* - YPO1069, YPO1071, YPO1072, YPO1074 для *Y. pestis*.

Рисунок 11 – Генетическая организация региона *metNIQ* у чумного микроба и других бактерий

Проведенный биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей выявил высокий уровень сходства между субстрат-связывающим доменом АВС-транспортера метионина MetQ энтеропатогенных иерсиний, а также белком MetQ *E. coli* и чумного микроба. Белки, гомологичные MetQ, в клетках млекопитающих отсутствуют (Wouters *et al.*, 2003).

Сайт-направленный мутагенез гена *metQ* в вакцинном штамме EV НИИЭГ, а также в вирулентном штамме *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 позволили получить мутанты EV НИИЭГΔ*metQ*, 231Δ*metQ*. Введение сконструированного вектора pACYC-*metQ* в штамм *Y. pestis* 231Δ*metQ*::*kan* привело к комплементации мутации (Рисунок 12).



Б: 1,2,3 – *Y. pestis* 231Δ*metQ* (1189 п.н.); 4,5,6 – *Y. pestis* 231Δ*metQ*::*kan* (2588 п.н.); 7,8 – исходный штамм *Y. pestis* 231 (1798 п.н.); М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Рисунок 12 – Схема конструирования MetQ⁻ вариантов штаммов *Y. pestis* (А) Скрининг мутантных клонов в ПЦР (Б). Карта вектора для комплементации pACYC-*metQ* (В)

Для исследования важности получения метионина рост исходного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и мутанта *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*metQ* сравнили в жидких

питательных средах: «голодной» среде М9, среде М9 с добавлением незаменимых для штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* аминокислот (метионин, треонин, фенилаланин, цистеин, аргинин, лейцин) и бульоне Хоттингера (Рисунок 13).

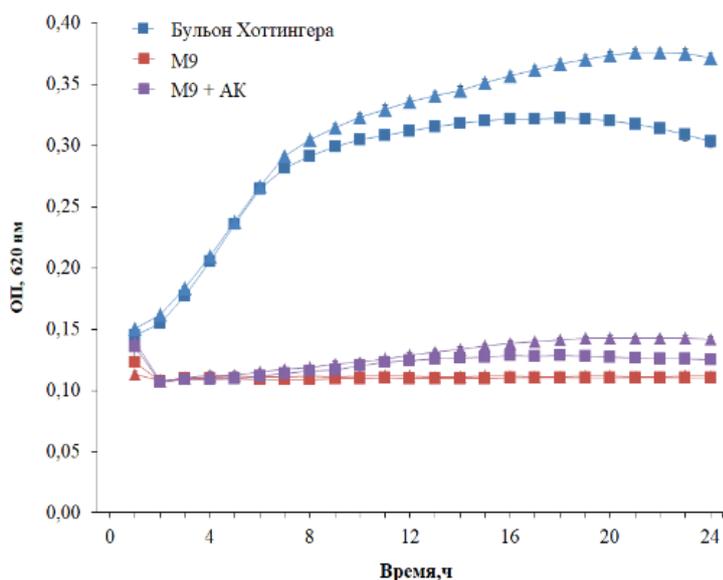


Рисунок 13 – Рост штамма «дикого» типа *Y. pestis* EV НИИЭГ (треугольник) и мутанта *Y. pestis* EV НИИЭГ Δ metQ (квадрат) в жидких питательных средах *in vitro* при температуре 28 °С

Ни исходный, ни мутантный штаммы *Y. pestis* не росли в «голодной» среде М9, в среде М9 с добавлением треонина, фенилаланина, цистеина, аргинина, лейцина в отсутствие метионина или в среде М9 с добавлением шести аминокислот (метионин, треонин, фенилаланин, цистеин, аргинин, лейцин). В бульоне Хоттингера мутантный штамм EV НИИЭГ Δ metQ уступал по скорости роста штамму «дикого» типа. Отличие проявилось спустя 6 ч после инокуляции и сохранялось на протяжении всего времени наблюдения (24 ч). Таким образом, белок MetQ необходим для получения метионина штаммам *Y. pestis* subsp. *pestis*, проявляющим ауксотрофность по данной аминокислоте (Odinokov *et al.*, 2011).

До настоящего момента в развитии инфекционного процесса при чуме была установлена только роль АВС-транспортеров, отвечающих за транспорт ионов металлов, таких как железо, цинк, марганец (Perry *et al.*, 2012; Forman *et al.*, 2008; Bobrov *et al.*, 2017). В настоящем исследовании впервые показали влияние делеции субстрат-связывающего белка MetQ АВС-транспортера метионина на вирулентность штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* при подкожном заражении двух видов лабораторных животных. Беспородные мыши и морские свинки пережили подкожное заражение штаммом *Y. pestis* 231 Δ metQ и в течение срока наблюдения (21 сут) после введения дозы 10⁵ КОЕ и 10⁷ КОЕ, соответственно, не проявляли признаков заболевания. После заражения исходным штаммом *Y. pestis* 231 в дозах 10-10³ КОЕ мыши пали к 4-6 сут, а морские свинки к 10-11 сут наблюдения (Рисунок 14). Комплементация мутантного штамма *Y. pestis* 231 Δ metQ плазмидой pACYSmetQ восстанавливала его вирулентность как для мышей, так и для морских свинок (Таблица 5).

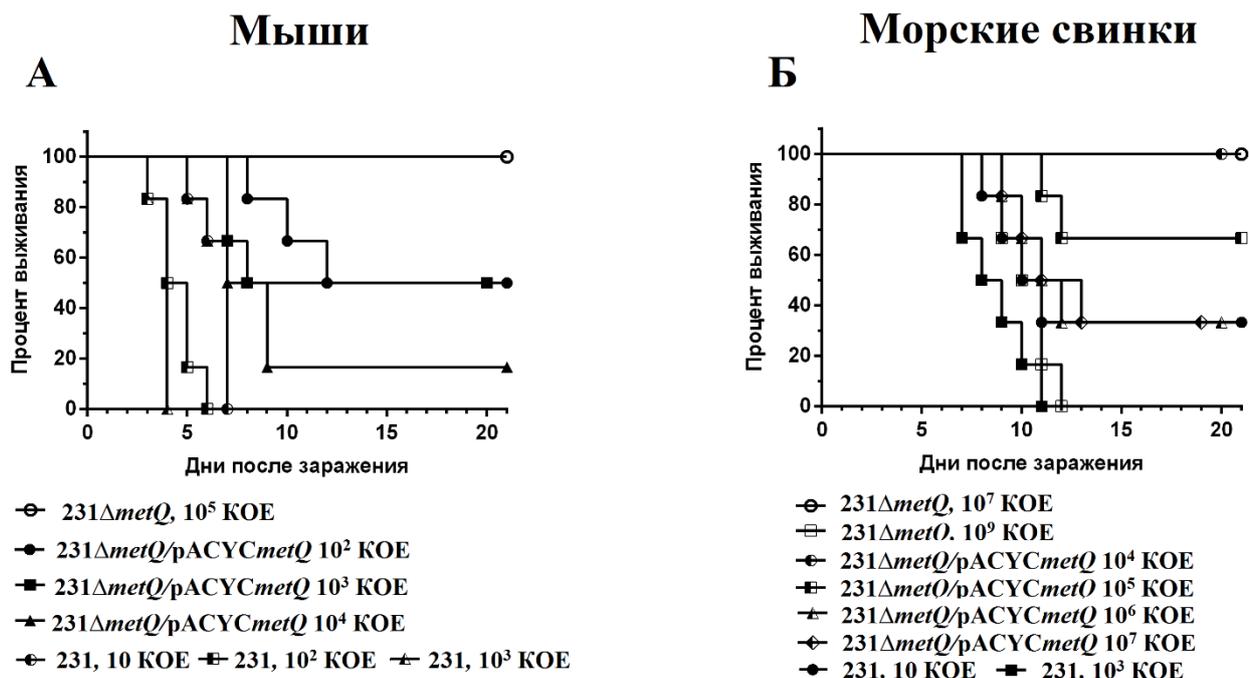


Рисунок 14 - Выживаемость беспородных мышей (А) и морских свинок (Б) после подкожного заражения мутантным штаммом *Y. pestis* 231ΔmetQ, комплементированным штаммом *Y. pestis* 231ΔmetQ/рАСУСmetQ и вирулентным штаммом *Y. pestis*

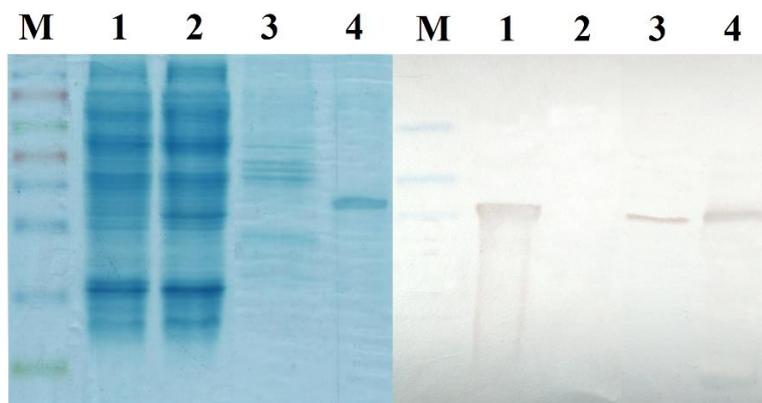
Таблица 5 - Вирулентность экспериментальных штаммов *Y. pestis* при подкожном заражении беспородных мышей

Штаммы <i>Y. pestis</i>	мыши		морские свинки	
	LD ₅₀ , КОЕ *	средние сроки гибели, сут	LD ₅₀ , КОЕ *	средние сроки гибели, сут
231	1 (1÷2)	5,4 ± 0,5	15 (4 ÷ 58)	8,5 ± 0,8
231ΔmetQ	> 10 ⁵		10 ⁸ (3,1 × 10 ⁷ ÷ 10 ⁹)	
231ΔmetQ/ рАСУСmetQ	10 ³ (2,7 × 10 ³ ÷ 4,3 × 10 ³)	7,6 ± 0,4	10 ⁴ (2,5 × 10 ³ ÷ 4,0 × 10 ⁴)	12,3 ± 0,7

Примечания: * 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках.

Большинство субстрат-связывающих белков АВС-транспортеров расположено в периплазме грамотрицательных бактерий (Rice *et al.*, 2014), однако существуют свидетельства поверхностной локализации для некоторых из них (Briles *et al.*, 2000, Kovacs-Simon *et al.*, 2014, Lefèvre *et al.*, 1997, Otsuka *et al.*, 2016). Например, при проведении протеомного анализа MetQ идентифицировали в препаратах белков и везикул наружной мембраны *N. gonorrhoeae* (Zielke *et al.*, 2016, Zielke *et al.*, 2014) и *N. meningitidis* (Larrann *et al.*, 2013). Алгоритмы предсказания структуры указывают на наличие сигнального пептида у белка MetQ чумного микроба, что свидетельствует о возможной его локализации в периплазматическом пространстве или наружной мембране. Локализацию MetQ в структурах бактериальной клетки определили, применив несколько подходов. Сконструированный рекомбинантный MetQ

использовали для получения поликлональных мышинных антител для проведения вестерн-блоттинга (Рисунок 15). Белок MetQ присутствовал в клеточном лизате штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и отсутствовал в штамме EV НИИЭГΔ*metQ*. Белок обнаруживали в наружной мембране чумного микроба.



А Б

М – маркер Spectra BR ThermoScientific multicolor (260, 140, 95, 72, 52, 42, 34, 26, 17, 10 кДа) 1 – клеточный лизат штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ; 2 – клеточный лизат *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*metQ*; 3 – внешняя мембрана штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ; 4 – рекомбинантный белок MetQ.

Рисунок 15 – Локализация MetQ в структурах бактериальной клетки *Y. pestis* и изменения в композиции белков наружной мембраны при его утрате (А - ДСН-ПААГ окраска Кумасси голубым и Б – иммуноблот)

Кроме того, подкожное заражение морских свинок штаммом *Y. pestis* 231 в сублетальной дозе (30 КОЕ) генерировало к 90 дню образование антител, которые распознавали рекомбинантный MetQ в ИФА в титре (5760 ± 691), что также подтверждает в том числе и поверхностное расположение белка.

Таким образом, проведенный цикл исследований позволил выявить белок MetQ - новую потенциальную молекулярную мишень для лечения чумы.

Штаммы-продуценты и оценка иммуногенной активности белков *Y. pestis*

Наибольшие усилия при разработке субъединичных вакцин против чумы сконцентрированы на создании препаратов, содержащих два основных иммунодоминантных антигена *Y. pestis* – F1 и LcrV. Однако сосредотачиваться исключительно на F1 и LcrV, как на единственных протективных белках, подходящих для создания кандидатных вакцин, было бы не дальновидным вследствие обнаружения структурного полиморфизма LcrV *Y. pestis* (Anisimov *et al.*, 2010) и существования высоковирулентных природных штаммов возбудителя чумы, лишенных способности продуцировать F1 антиген (Anisimov *et al.*, 2004). Таким образом, поиск дополнительных протективных антигенов чумного микроба продолжает сохранять свою актуальность.

Гены *htpG*, *glnA*, *fbaA* и *metQ* из штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV НИИЭГ клонировали в составе векторной плазмиды pET32b(+) по сайтам рестриктаз NdeI и XhoI в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, США). Белки GlnA, Fba, MetQ и HtpG состояли из 475, 365, 277 и 628 аминокислотных

остатков, соответственно, содержали полигистидиновую последовательность и были выделены методом аффинной Ni^{2+} -хелатной хроматографии.

Для трех белков Fba, MetQ и HtpG показана способность стимулировать продукцию специфических антител после двукратной подкожной иммунизации беспородных мышей. Установлено отсутствие выраженной протективной активности для всех белков (Fba, GlnA, MetQ и HtpG) при последующем подкожном заражении двукратно иммунизированных беспородных мышей вирулентным штаммом чумного микроба. Невакцинированные беспородные мыши контрольной группы, зараженные 50 КОЕ штамма *Y. pestis* 231 пали к 7 дню наблюдения. Выживаемость животных, вакцинированных рекомбинантными антигенами Fba, GlnA, MetQ и HtpG, при данной заражающей дозе составила от 10 до 30 %.

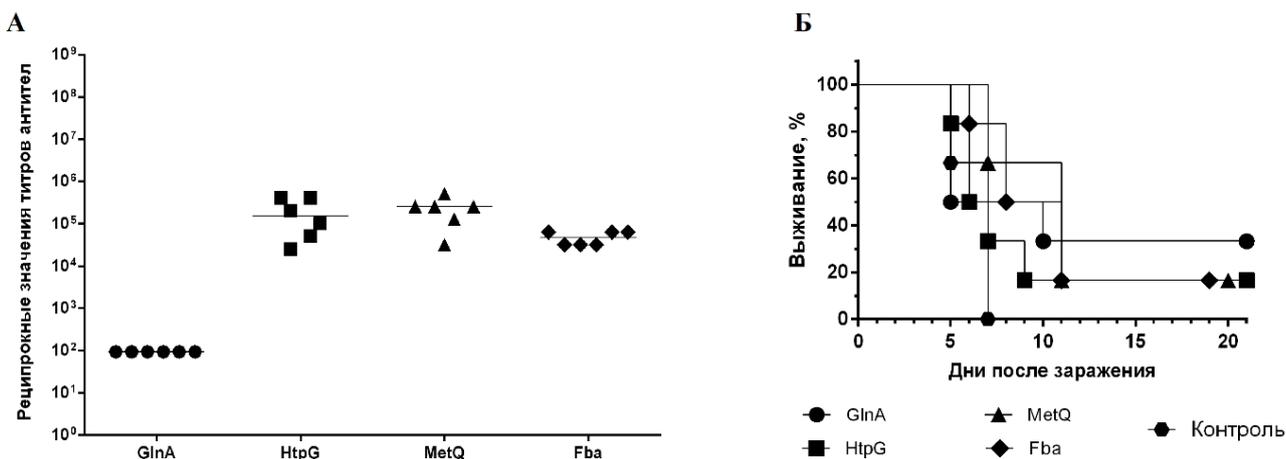


Рисунок 16 - Иммунологическая активность рекомбинантных белков Fba, GlnA, MetQ и HtpG: А - Реципрокные значения титров антител после 2-ой иммунизации мышей, Б - Выживаемость иммунизированных рекомбинантными белками мышей после подкожного заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 50 КОЕ.

В заключение следует отметить, что при обсуждении результатов исследований, представленных в различных разделах данной диссертационной работы, мы пытались кратко остановиться на том, какое значение может иметь разбираемый в соответствующей главе феномен для патогенеза чумы, и как теоретические знания о конкретных феноменах могут быть использованы в совершенствовании специфической профилактики и лечения данной инфекции.

ВЫВОДЫ

1. На основе тестикулярной анимализации разработан оригинальный комплекс методических приемов, позволяющий проводить селекцию субкультур некоторых слабовирулентных штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, величины LD_{50} которых при подкожном заражении морских свинок составляют единичные клетки, как и у штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis*.

2. Выявлены пять белков (WP_050548832.1, молекулярный шаперон - белок теплового шока HtpG; EIR69411.1, глутаминсинтетаза GlnA; WP_002209962.1, фруктозо-бисфосфат альдолаза Fba; WP_038931127.1, субстрат-связывающий белок АВС-транспортера метионина MetQ и WP_016599821.1, гипотетический белок), экспрессия которых увеличивалась у высоковирулентных для морских свинок субкультур штаммов, выращенных *in vivo* – в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок.

3. Впервые показано, что мутация по гену *htpG* не влияет на вирулентность штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* и bv. *ulegeica* для мышей и морских свинок.

4. Впервые получены экспериментальные доказательства отсутствия влияния одиночной мутации по гену *glnA* на вирулентность штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* для мышей и морских свинок. Показано, что для аттенуации требуется генетический нокаут всего *glnALG* оперона.

5. Установлено, что $\Delta glnALG$ штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* не вызывал гибели мышей и морских свинок при подкожном введении и обеспечивал 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 200 DCL.

6. Впервые доказано, что делеция гена *metQ* ведет к аттенуации штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* для мышей и морских свинок, что наряду с поверхностной локализацией метионин-связывающего белка MetQ и отсутствием гомологичных белков в клетках млекопитающих, делает его потенциальной молекулярной мишенью при разработке новых препаратов для лечения чумы.

7. Показана способность рекомбинантных белков Fba, MetQ и HtpG стимулировать продукцию специфических антител при отсутствии протективной активности.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. При дифференциации бактериальных культур чумного микроба по степени их избирательной вирулентности рекомендуем использовать методический подход, заключающийся в последовательных тестикулярных пассажах на самцах морских свинок.

2. Для исследования физиологических изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы или других патогенных микроорганизмов к организму млекопитающих, целесообразно использовать культивирование штаммов в диализных камерах, имплантированных в брюшную полость морских свинок.

3. При подготовке белков из штаммов чумного микроба для анализа методом двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте pH рекомендуем обеззараживать препараты путем инкубации в течение 10 мин в 15 %-ном растворе трихлоруксусной кислоты, что обеспечит их полную специфическую стерильность.

4. Необходимо продолжить изучение сконструированного в ходе диссертационной работы штамма 231 $\Delta glnALG$ на предмет его соответствия критериям отбора вакцинных штаммов чумного микроба.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) статьи в реферируемых научных журналах

1. **Красильникова, Е.А.** Вирулентность HtpG⁺ и HtpG⁻ штаммов *Yersinia pestis* для мышей и морских свинок / **Е.А. Красильникова**, Р.З. Шайхутдинова, Т.Э. Светоч, М.Е. Платонов, Т.И. Комбарова, С.А. Иванов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 86-90. **Scopus** (Двухлетний импакт-фактор РИНЦ – 0,863)

2. **Красильникова, Е.А.** Подбор новых молекулярных мишеней для оптимизации вакцинопрофилактики и терапии чумы / **Е.А. Красильникова**, А.С. Трунякова, А.С. Вагайская, Т.Э. Светоч, Р.З. Шайхутдинова, С.В. Дентовская //

Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 265-282. **Scopus** (Двухлетний импакт-фактор РИНЦ – 0,755)

3. Kislichkina, A.A. Whole-Genome Assembly of *Yersinia pestis* 231, the Russian Reference Strain for Testing Plague Vaccine Protection / A.A. Kislichkina, **Е.А. Krasil'nikova**, M.E. Platonov, Y.P. Skryabin, A.A. Sizova, V.I. Solomentsev, T.V. Gapel'chenkova, S.V. Dentovskaya, A.G. Bogun, A.P. Anisimov // *Microbiol Resour Announc.* – 2021. – Vol.10. – No. 5. – P. e01373-20. **Scopus** (импакт-фактор Scopus – 0,785).

б) патенты

4. № RU 2 732 013 C1, МПК G01N 33/569. № 2019140904. Способ сенсibilизации планшета для иммуноферментного анализа нерастворимыми белковыми антигенами / П.Х. Копылов, **Е.А. Красильникова**, А.С. Трунякова, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов. – Заявка 2019140904 11.12.2019 г. Опубликовано: 10.09.2020 г. Бюл. № 25.

в) статьи в других научных изданиях

5. Копылов, П.Х. Анализ белковых препаратов вирулентных штаммов *Y. pestis* методом двумерного электрофореза / П.Х. Копылов, **Е.А. Красильникова**, О.Н. Перовская, Р.З. Шайхутдинова, С.А. Иванов, Е.А. Тюрин, А.П. Анисимов, С.В. Дентовская // *Бактериология.* – 2017. –Т. 2. – № 3. – С. 28–32. **РИНЦ** (импакт-фактор РИНЦ – 0,348)

г) тезисы научных конференций

6. Anisimov, A.P. Search for factors responsible for selective virulence of *Yersinia pestis* rhamnose-positive strains / A.P. Anisimov, A.A. Kislichkina, P.Kh. Kopylov, **Е.А. Krasil'nikova**, A.A. Bogun, S.V. Dentovskaya // Conference: 22nd INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE "CURRENT ISSUES ON ZOO NOTIC DISEASES" (Ulaanbaatar, Mongolia, 05 July 2017). – At Ulaanbaatar, Mongolia. – P. 25.

7. Анисимов, А.П. Полиморфизм аминокислотных последовательностей факторов патогенности у штаммов чумного микроба с избирательной вирулентностью / А.П. Анисимов, Т.Е. Светоч, **Е.А. Красильникова**, С.А. Иванов, С.В. Дентовская // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения: материалы XI съезда Всерос. науч.-практ. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 16–17 ноября 2017 г.) / под ред. А.Ю. Поповой. СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2017. – С. 418

8. **Красильникова, Е.А.** Поиск факторов, отвечающих за избирательную вирулентность *Yersinia pestis* / **Красильникова Е.А.**, Копылов П.Х., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярная диагностика // Сб. трудов / колл. авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 1. – Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2017. – С. 316

9. **Красильникова, Е.А.** Влияние факторов нутриционного обмена на вирулентность штаммов *Yersinia pestis* на примере ABC-транспортера метионина / **Е.А. Красильникова**, С.А. Иванов, Р.З. Шайхутдинова, Т.И. Комбарова, Т.Э. Светоч, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Сборник тезисов 22-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 23-27 апреля 2018 г.). – 2018. – С. 296

10. Anisimov, A. *Yersinia pestis* vole (O.PE) strains as a convenient model for finding new molecular targets for vaccine prevention and treatment of plague / A. Anisimov, **Е. Krasil'nikova**, A. Vagaiskaya, V. Solomentsev НИИЭГ, P. Kopylov, S. Ivanov, T. Svetoch, T. Kombarova, R. Shaikhutdinova, A. Kislichkina, A. Bogun, S. Dentovskaya //

Collection of Abstracts of the International Conference on Plague Prevention and Control (Harbin, China, 12-16 Noveber 2018). – 2018. – P. 30.

11. Anisimov, A.P. *Yersinia pestis* vole's strains: taxonomy, phylogeography, polymorphisms of pathogenicity factors and selective virulence / A.P. Anisimov, **Е.А. Красил'никова**, A.S. Vagaiskaya, V.I. Solomentsev, P.Kh. Kopylov, S.A. Ivanov, T.E. Svetoch, R.Z. Shaikhutdinova, A.A. Kislichkina, A.G. Bogun, S.V. Dentovskaya // Инфекция и иммунитет. 2018. – Т. 8. – № 4. – С. 554. **Scopus**

12. **Красильникова, Е.А.** Влияние метаболизма метионина на вирулентность *Yersinia pestis* // **Е.А. Красильникова**, Р.З. Шайхутдинова, С.А. Иванов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Материалы XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 1-3 апреля 2019 г.). – 2019. – С. 97.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

а.о.	– аминокислотные остатки
АТФ	– аденозинтрифосфат
ГКПБ	– Государственная коллекция патогенных бактерий
ЗАО	– закрытое акционерное общество
ИФА	– иммуноферментный анализ
КОЕ	– колониобразующая единица
НИИЭГ	– Научно-исследовательский институт экспериментальной гигиены
НОММ	– номинальная отсекаемая молекулярная масса
п.н.	– пар нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РАН	– Российская академия наук
ФБУН	– Федеральное бюджетное учреждение науки
ГНЦПМБ	государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ФГБУН	– Федеральное государственное учреждение науки
НЦБМТ ФМБА	«Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»
ABC	– ATP-Binding Cassette
ANOVA	– ANalysis Of VAriance
ВНИ	– Brain Heart Infusion
BLASTp	– Basic Local Alignment Search Tool protein
bp	– base pairs
DCL	– доза, летальная для 100 % животных (<i>dosis certe letalis</i>)
DNA	– deoxyribonucleic acid
HtpG	– high-temperature protein G
LB	– Luria Bertani broth medium
LD ₅₀	– доза, летальная для 50 % животных (<i>dosis letalis 50</i>)
MALDI-TOF	– Matrix-Assisted Lazer Desorption/Ionization Time-of-Flight