

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека

Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и  
биотехнологии»

*На правах рукописи*

Красильникова Екатерина Александровна

ПОИСК ФАКТОРОВ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПОЛЕВОЧЬИХ  
ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*

Специальность:

03.02.03 – микробиология

Диссертация

на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель: д-р мед. наук С.В. Дентовская

Оболенск – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1 Общие сведения о факторах патогенности возбудителя чумы .....	13
1.2 «Неклассические» факторы патогенности чумного микроба .....	14
1.3 Протеомный подход для выявления факторов патогенности чумного микроба .....	29
1.4 Заключение по обзору литературы .....	32
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	35
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	35
2.1 Штаммы микроорганизмов .....	35
2.2 Плазмиды .....	41
2.3 Праймеры .....	42
2.4 Лабораторные животные .....	43
2.5 Среды и условия культивирования .....	43
2.6 Определение чувствительности штаммов к бактерицидному действию комплемента .....	44
2.7 Генно-инженерные манипуляции .....	45
2.7.1 Полимеразная цепная реакция .....	45
2.7.2 Клонирование генов в составе экспрессирующего вектора .....	45
2.8 Анализ белковых препаратов в полиакриламидном геле и методом иммуноблота .....	46
2.9 Выделение рекомбинантных белков .....	47
2.10 Биоинформатический анализ .....	48
2.11 Конструирование мутантных штаммов и плазмид для комплементации .....	48
2.12 Подтверждение корректности мутаций .....	49
2.13 Проведение тестикулярных пассажей .....	50
2.14 Культивирование штаммов <i>Y. pestis</i> в диализных камерах в организме морских свинок .....	50
2.15 Протеомный анализ .....	51
2.15.1 Подготовка белковых экстрактов .....	52

2.15.2 Двумерный гель-электрофорез в неравновесном градиенте рН .....	52
2.15.3 Цифровые изображений 2D гелей .....	52
2.15.4 Масс-спектрометрия .....	52
2.16 Иммунизация мышей белковыми препаратами .....	53
2.16.1 Подготовка препарата для иммунизации мышей .....	53
2.16.2 Иммунизация животных .....	53
2.17 Иммуноферментный анализ .....	54
2.18 Заражение животных и определение вирулентности штаммов <i>Y. pestis</i> .....	54
2.19 Статистический анализ .....	54
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	55
ГЛАВА 3 ПОИСК ФАКТОРОВ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ <i>Yersinia</i> <i>pestis</i> subsp. <i>microti</i> .....	55
3.1 Отбор пар штаммов <i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> , отличающихся по вирулентности для морских свинок .....	56
3.2 Модельная система для исследования физиологических изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы к организму млекопитающего .....	61
3.3 Сравнительный анализ протеомов культур <i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> , принципиально отличающихся по вирулентности для морских свинок ...	63
3.3.1 Сравнительный протеомный анализ изучаемых пар культур штаммов <i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> И-2422 и И-3189, выращенных <i>in vitro</i> ...	64
3.3.2 Сравнительный протеомный анализ изучаемых пар субкультур штаммов <i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> И-3189 и И-2239, культивированных <i>in</i> <i>vivo</i> .....	67
3.4 Заключение по главе 3 .....	69
ГЛАВА 4 ПОЛУЧЕНИЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОКАУТНЫХ МУТАНТОВ <i>Yersinia pestis</i> .....	71
4.1 HtpG <sup>-</sup> штаммы <i>Y. pestis</i> .....	71
4.1.1 Биоинформатический анализ <i>htpG</i> .....	72
4.1.2 Конструирование HtpG <sup>-</sup> варианта штаммов <i>Y. pestis</i> .....	72

4.1.3	Эффект делеции <i>htpG</i> на рост мутантного штамма, устойчивость к оксидативному и осмотическому стрессу .....	74
4.1.4	Устойчивость к нормальной человеческой сыворотке .....	76
4.1.5	Эффект делеции <i>htpG</i> на вирулентность для мышей и морских свинок .....	76
4.2	<i>GlnA</i> и <i>GlnALG</i> <sup>-</sup> штаммы <i>Y. pestis</i> .....	78
4.2.1	Биоинформатический анализ региона <i>glnALG</i> .....	79
4.2.2	Конструирование <i>GlnA</i> <sup>-</sup> и <i>GlnALG</i> <sup>-</sup> вариантов штаммов <i>Y. pestis</i> ...	81
4.2.3	Эффект делеции <i>glnA</i> и <i>glnALG</i> на рост мутантного штамма .....	82
4.2.4	Эффект делеции <i>glnA</i> и <i>glnALG</i> на вирулентность для мышей и морских свинок .....	84
4.3	<i>MetQ</i> <sup>-</sup> штаммы <i>Y. pestis</i> .....	89
4.3.1	Биоинформатический анализ <i>metQ</i> .....	89
4.3.2	Конструирование <i>MetQ</i> <sup>-</sup> вариантов штаммов <i>Y. pestis</i> .....	91
4.3.3	Эффект делеции <i>metQ</i> на рост мутантного штамма .....	92
4.3.4	Чувствительность к нормальной человеческой сыворотке .....	93
4.3.5	Эффект делеции <i>metQ</i> на вирулентность для мышей и морских свинок при подкожном заражении .....	93
4.3.6	Определение локализации <i>MetQ</i> в клетке чумного микроба.....	95
4.4	<i>Fba</i> <sup>-</sup> штамм <i>Yersinia pestis</i> .....	99
4.4.1	Биоинформатический анализ <i>fba</i> .....	100
4.4.2	Получение штаммов <i>Y. pestis</i> , дефектных по продукции <i>Fba</i> .....	100
4.5	Заключение по главе 4 .....	101
Глава 5	ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ И ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ <i>Yersinia pestis</i> .....	103
5.1	Молекулярное клонирование генов <i>htpG</i> , <i>glnA</i> , <i>fba</i> и <i>metQ</i> <i>Y. pestis</i> в <i>E. coli</i> .....	103
5.2	Аналитическая индукция синтеза, выделение и очистка рекомбинантных белков .....	105
5.3	Оценка иммуногенной активности рекомбинантных белков .....	109
5.4	Заключение по главе 5 .....	112
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114

ВЫВОДЫ.....	119
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ .....	120
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ .....	121
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	124
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....	157

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [1]. 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 наиболее древних азиатских природных очагах чумы, для которых характерно разнообразие грызунов – основных хозяев *Y. pestis* [166].

«Классические» штаммы чумного микроба *Y. pestis* subsp. *pestis* (основной подвид [145]), 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* (неосновной подвид [145]), выделенные из популяций различных видов полевок («полево́чьи» штаммы), 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 [3, 22].

Считают, что 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 [147], и ряда других факторов патогенности: LcrV [19], Ail [74], Caf1 [150], Pla [77]. Однако выявленные отличия не коррелировали 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.

Таким образом, до настоящего времени нет ясного представления о возможных причинах избирательной вирулентности штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, но 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 [83, 133, 190, 276].

#### **Степень разработанности темы исследования**

В целом ряде исследований оценивали дифференциальную продукцию белков культурами *Y. pestis*, выращенными *in vitro* в различных условиях [66, 119, 212, 213, 215]. 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 разных видов лабораторных животных.

#### **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  $\Delta glnALG$  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 обоих видов лабораторных животных.

Приоритет предложенного способа сенсibilизации планшета для иммуноферментного анализа нерастворимыми белковыми антигенами защищен патентом РФ № 2019140904.

### 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  $\Delta$ glnALG::cat, EV НИИЭГ  $\Delta$ glnA::cat, EV НИИЭГ  $\Delta$ htpG::cat и EV НИИЭГ  $\Delta$ metQ::kan, дефектные по синтезу глутаминсинтетазы и продуктов двухкомпонентной системы регуляции глутамина, глутаминсинтетазы, белка теплового шока и субстрат-связывающей единицы ABC-транспортера метионина, соответственно, и штаммы *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET32b-Fba-His<sub>6</sub>, *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-HtpG-His<sub>6</sub>, *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-MetQ-His<sub>6</sub> *E. coli*

BL21(DE3)/pET32b-GlnA-His<sub>6</sub> – продуценты рекомбинантных белков Fba, HtpG, MetQ и GlnA, соответственно (федеральный уровень внедрения).

Материалы диссертационной работы используются при подготовке кадров высшей квалификации (аспирантуре) и для слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора при чтении лекций и проведении практических занятий в рамках основной профессиональной образовательной программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению 06.06.01 – Биологические науки, профиль 03.02.03. - микробиология и программы дополнительного профессионального образования «Микробиология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности».

### **Методология и методы исследования**

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

### **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: 22<sup>nd</sup> 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 Ивановым, канд. биол. наук М.Е. Платоновым, канд. биол. наук Комбаровою Т.И, 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 1 патент.

## Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общие сведения о факторах патогенности возбудителя чумы

Чума - системное заболевание, передающееся блохами в природных популяциях грызунов. Высокая летальность необходима для переноса возбудителя чумы – *Yersinia pestis* - инфицированными блохами, вынужденными покидать мертвого грызуна в поисках нового хозяина-прокормителя. Два других представителя рода *Yersinia* – энтеропатогенные *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* – вызывают у людей, чаще всего, склонные к затяжному течению заболевания желудочно-кишечного тракта средней тяжести, обеспечивающие длительное выделение патогенов в окружающую среду и последующее алиментарное заражение новых хозяев. Одного из них – *Y. pseudotuberculosis* – принято считать прародителем *Y. pestis*. Дивергенция этих бактерий произошла 5000-20000 лет назад [13].

До настоящего времени поиск новых антигенов для разработки субъединичных и живых аттенуированных чумных вакцин, а также совершенствование препаратов для лабораторной диагностики и лечения чумы сохраняют свою актуальность, т.к. в природных очагах ежегодно заболевает до 3000 человек [99], что, с учетом высокой контагиозности легочной формы заболевания, представляет серьезную опасность возникновения эпидемических осложнений.

Наибольшее внутривидовое разнообразие филогенетических групп чумного микроба выявлено в наиболее древних азиатских природных очагах чумы, для которых характерно разнообразие грызунов – основных хозяев *Y. pestis*. "Избирательность" вирулентности культур чумного микроба для лабораторных животных как феномен была впервые обнаружена М.И. Леви в 1962 г. [22]. На территории природных очагов чумы в пределах СНГ выделяют два варианта "глицеринпозитивных" штаммов *Y. pestis*, отличающихся по эпидемическому потенциалу. «Классические» рамнозонегативные штаммы чумного микроба (*Y. pestis* subsp. *pestis*), циркулирующие в популяциях сурков, сусликов, песчанок, крыс, обладают «универсальной» вирулентностью, вызывая летальную инфекцию, как у мелких грызунов, так и у людей.

Рамнозопозитивные штаммы *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 [6, 7]

Особенности патогенеза инфекционных заболеваний и вирулентность вызывающих их микробов определяются имеющимися у последних вируломами – "наборами" факторов патогенности. При этом каждая из биомолекул (факторов патогенности) может обладать несколькими активностями, направленными на преодоление различных звеньев системы защиты макроорганизма. Развитие инфекционного процесса в организме восприимчивого хозяина требует присутствия у возбудителя чумы целого набора факторов патогенности различной функциональной направленности и систем регуляции, обеспечивающих их координированную экспрессию. "Выключение" любого из этих факторов, в свою очередь, может либо не влиять на вирулентность микроба, либо приводить к его аттенуации.

В середине прошлого века T.W. Burrows [51] описал признаки, присутствующие у всех изученных им вирулентных штаммов *Y. pestis* – классические "детерминанты вирулентности". К их числу он отнес способность клеток к сорбции экзогенных красителей и гемина (Pgm<sup>+</sup>), зависимость роста от наличия в среде ионов Ca<sup>2+</sup> при температуре 37 °C, синтез V (а позднее – LcrV) и W антигенов, "мышинного" токсина (Tox<sup>+</sup>), капсульного антигена FI (Fra<sup>+</sup> или F1<sup>+</sup>, а позднее – Caf1<sup>+</sup>), сочетанный синтез пестицина (Pst<sup>+</sup>), фибринолизина (Fb<sup>+</sup>) и плазмокоагулазы (Cg<sup>+</sup>), пуринонезависимость или способность синтезировать эндогенные пурины (Pur<sup>+</sup>). После десятилетий исследований и дискуссий, прошедших с момента постулирования детерминант вирулентности, некоторые из них, такие как W антиген, пестицин и способность к синтезу эндогенных пуринов уже не рассматривают как факторы патогенности [1, 2, 22, 74], но выявлен целый ряд новых кандидатов на роль факторов патогенности чумного микроба.

## 1.2 «Неклассические» факторы патогенности чумного микроба

### *Полифункциональные белки наружной мембраны*

Наружная мембрана грамотрицательных бактерий содержит множество белков, помогающих поддерживать структурную целостность клеточной оболочки. Белок

SurA (Survival protein A - SurA) впервые идентифицировали как фактор, играющий важную роль в выживании клеток *Escherichia coli* в стационарной фазе роста [267]. Показано, что парвулин-подобный домен белка обладает пептидил-пролил изомеразной активностью [158, 235], а N-концевой домен – шаперонной активностью [38]. Установлено, что именно шаперонная функция связана с ролью SurA в патогенезе инфекций, вызываемых некоторыми видами бактерий [37]. Например, делеция гена *surA* оказывает плеiotропный эффект на бактериальную клетку *Y. pseudotuberculosis*, проявляющийся в аттенуации штамма при мышинной модели инфекции [193, 194], что, отчасти, может быть связано с ролью белка в биогенезе наружной мембраны, а именно утратой Inv, необходимого возбудителю псевдотуберкулеза для процесса инвазии [193]. Делеционный мутант вирулентного штамма *Y. pestis* оказался более чувствителен к мембрано-проникающим агентам и не вызывал гибели мышей при подкожном введении  $2,1 \times 10^5$  КОЕ культуры [255]. Таким образом, SurA можно рассматривать как мишень для антимикробных агентов, а широкое распространение белка среди грамотрицательных патогенов делает перспективным его использование для разработки ингибиторов с широким спектром действия.

Липопротеин Брауна (Lpp) локализован в наружной мембране бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, связывает слой пептидогликанов с наружной бактериальной мембраной [109]. Структурно Lpp выступает в качестве спейсера между внутренней и наружной мембраной, поддерживая открытость периплазматического пространства и целостность наружной мембраны [262]. В процессе созревания липопротеина Брауна происходит модификация липидного домена, катализируемая глицеролтрансферазой, O-ацилтрансферазой, сигнальной трансферазой II и N-ацилтрансферазой [111]. Показано, что вместе с липополисахаридом Lpp индуцирует развитие септического шока, продукцию цитокинов TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 [302], активирует комплемент и систему свертывания крови [125, 188]. Установлено, что сигнал от Lpp, приводящий к индукции цитокинов, идет через рецептор TLR-2 (Toll-Like Receптор – толл-подобный рецептор) [16]. У возбудителя чумы Lpp имеет размер 8,3 кДа. J. Sha *et al.* [247, 248] получили одинарный делеционный мутант по гену *lpp* и двойной делеционный мутант по генам *lpp* и *msbB* на модели вирулентного штамма *Y. pestis* CO92 и аттенуированного штамма KIMD27 (Pgm<sup>-</sup>). Иммунизация полученными мутантными штаммами защищала от гибели мышей и крыс при

заражении высоковирулентными штаммами дикого типа в модельных экспериментах бубонной и легочной чумы. С.J. Van Lier *et al.* [278] показали, что штамм *Y. pestis* CO92 $\Delta$ *lpp* $\Delta$ *pla*, авирулентный для мышей при подкожном и аэрогенном пути введения, индуцирует гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ, обеспечивая защиту животных от заражения летальными дозами *Y. pestis* CO92. Исследователи впервые продемонстрировали, что полученный ими двойной мутант не способен эффективно переживать в макрофагах мыши и человека в отличие от штамма дикого типа. С.L. Galindo *et al.* [100] исследовали влияние мутации по гену *lpp* на экспрессию ряда генов стресс-ответа и вирулентности при температурах культивирования чумного микроба 26 °С и 37 °С. Если при температуре 26 °С у мутанта обнаруживали, главным образом, изменение экспрессии генов, отвечающих за метаболизм, то при 37 °С – уменьшалась экспрессия генов стресс-ответа и вирулентности (*htpN*, *degQ*, *htrA*, *lcrQ/yscM*, *iscR*, *nifS* и др.). Результаты эксперимента подтвердили роль Lpp в адаптации *Y. pestis* к условиям организма хозяина. Таким образом, Lpp обладает еще и регуляторной функцией.

NlpD (novel lipoprotein D) – липопротеин наружной мембраны чумного микроба, содержащий 379 аминокислотных остатка и типичную для липидов консенсусную последовательность на N-конце. Ген *nlpD* вместе с генами *surE*, *pst*, *rpoS*, входит в состав хромосомного *pst*-локуса, обнаруживаемого у микроорганизмов различных видов семейства Enterobacteriaceae. R. Lange *et al.* [122, 152] и A. Tidhar *et al.* [266] показали, что гены *nlpD* и *rpoS* образуют оперон. Используя набор изогенных мутантов штамма *Y. pestis* Kimberly 53, A. Tidhar *et al.* [234] изучили экспрессию и роль продуктов генов *pst*-локуса в патогенезе чумы. Авторы обнаружили, что только NlpD существенен для вирулентности чумного микроба. Мутация по гену *nlpD* приводила к полной аттенуации *Y. pestis*, а сконструированный *nlpD* мутант превосходил вакцинный штамм EV76 по защите мышей от гибели при их последующем заражении бубонной или легочной формой чумы [234]. С.В. Дентовская с соавт. [74] сконструировали  $\Delta$ *nlpD* мутанты на основе других родительских штаммов *Y. pestis*, включая непатогенные для морских свинок и человека штаммы подвида *microti*. Сравнительная оценка подтвердила, что при подкожной иммунизации мышей  $\Delta$ *nlpD* мутанты индуцировали иммунитет, превосходящий по напряженности в 10<sup>5</sup> раз таковой в ответ на введение вакцинного штамма EV. В то же время NlpD<sup>-</sup> варианты

бактерий практически не защищали морских свинок при последующем подкожном заражении возбудителем чумы, уступая штамму EV по напряженности формируемого иммунитета в  $10^6$  раз.

OmpA (Outer membrane protein A – белок наружной мембраны A) является представителем порообразующих белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий, или поринов. Неспецифические порины доминируют среди белков наружной мембраны бактерий и предназначены для пассивной диффузии гидрофильных молекул с молекулярной массой не более 600 Да [73]. Порины чрезвычайно устойчивы к действию протеаз, повышенной температуре и другим денатурирующим факторам, что обусловлено особенностью их структуры. По физико-химическим свойствам порины – это слабокислые белки, содержащие необычно большое для интегральных белков количество полярных аминокислотных остатков [12]. Регуляция транспорта различных молекул через наружную мембрану, поддержание структурной целостности клетки, связывание различных веществ и адгезия – основные функции поринов. Было показано, что OmpA обладает пороформирующей активностью [258], опосредует резистентность к комплементу и антибактериальным пептидам, играет важную роль в инвазии и внутриклеточном переживании патогена [98, 172, 217]. Chen *et al.* [62] подтвердили высокую степень гомологии нуклеотидной и аминокислотной последовательностей OmpA у всех трех патогенных видов *Yersinia*: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Анализ последовательностей OmpA 262 штаммов *Y. pestis*, 134 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 219 штаммов *Y. enterocolitica* выявил 100 %, 98,8 % и 97,7 % гомологию. Для идентификации генов, продукты которых участвуют в реализации функции переживания *Y. pestis* в макрофагах, S.S. Bartra *et al.* [32] использовали подход, основанный на гибридизации по местам встраивания транспозонов (TraSH - transposon site hybridization). Авторы провели скрининг пула транспозоновых мутантов на модели культуры клеток. Результаты исследования подтвердили необходимость OmpA для переживания *Y. pestis* и родственного патогена *Y. pseudotuberculosis* в макрофагах. Таким образом, порины как белки, играющие важную роль во взаимоотношениях патогена с организмом хозяина, способные индуцировать образование протективных антител, привлекательны с точки зрения использования при конструировании вакцинных и диагностических препаратов.

Введение рекомбинантного OmpA *Y. pestis* мышам вызывало развитие протективного иммунного ответа против бубонной, но не легочной формы чумы при заражении Caf1<sup>-</sup> мутантом штамма CO92. Однако титры протективных антител в сыворотке вакцинированных мышей оказались намного ниже титров анти-Ail и анти-F1-V-антител. Тем не менее, полученные экспериментальные данные позволяют рассматривать рекомбинантный OmpA, а также Pla и Ail в качестве дополнительных антигенов в составе субъединичных вакцин к традиционно используемым Caf1 и LcrV для повышения протективности последних [84].

#### *Факторы адгезии и колонизации*

В процесс адгезии и колонизации вовлечены различные поверхностные молекулы *Y. pestis*. Кроме ранее идентифицированных фимбрий [86, 169, 236], адгезивные и инвазивные свойства установлены для некоторых белков наружной мембраны возбудителя чумы нефимбриальной природы.

Белок Ail/OmpX (Attachment invasion locus - Ail) принадлежит к Ail/Lom семейству белков наружной мембраны и обеспечивает защиту *Y. pestis* от комплемент-опосредованного киллинга [31]. Более того, Ail является доминантной молекулой адгезии и играет важную роль в доставке эффекторов системы секреции III-го типа к клеткам-мишеням хозяина в ходе инфекционного процесса [87]. Белок Ail *Y. pestis* идентифицировали, как один из главных адгезинов *Y. pestis* [31, 87, 89, 149]. Мутанты *Y. pestis* с делецией  $\Delta ail$  обладают сниженной способностью к системному распространению и той или иной степенью аттенуации, более выраженной на модели крыс, чем для мышей. Однако; показано, что адаптивный иммунный ответ у крыс формировался после введения высоких доз мутантного штамма ( $3 \times 10^4$  КОЕ), о чем свидетельствовали высокие титры антител к *Y. pestis* Caf1 антигену [117]. Более того, А.М. Kolodziejek *et al.* сообщили, что делеция гена *ail* у штамма *Y. pestis* CO92 приводила к высокой степени аттенуации на крысиной модели легочной чумы [148]. На модели штамма *Y. pestis* KIM5 с делецией *pgm* локуса показано, что Ail более важен для связывания клеток хозяина и индукции цитотоксичности и для вирулентности на мышинной модели инфекции при внутривенном пути введения, чем Pla, и опосредованная Pla секреция Yop не зависит от его протеазной активности [89]. Ail связывает фибронектин, белок внеклеточного матрикса, который возможно выступает в качестве связующего рецептора между Ail и хозяйскими клетками [274]. Антитела к

фибронектину подавляют KIM5-опосредованную цитотоксичность клеток хозяина в Ail-зависимой манере, показывая необходимость этого взаимодействия для доставки Yop [274].

Кроме того, адгезивные свойства описаны для нескольких белков автотранспортеров чумного микроба [297], таких как YарС [88], YарЕ [156, 157] и YадА-подобных олигомерных автотранспортных белков [95, 184]. К настоящему времени показана уникальная роль YарЕ, YарJ и YарK в патогенезе чумы. YарЕ необходим для полного проявления вирулентности штаммов при бубонной, но не легочной форме инфекции [156]. Продукты генов *yapK* и *yapJ* играют важную роль при развитии системной (не бубонной) чумной инфекции, при этом мутанты *Y. pestis*, лишенные обоих генов *yapK* и *yapJ* проявляют более аттенуированный фенотип, чем индивидуальные мутанты [161]. YадВ и YадС *Y. pestis*, два новых белка семейства олигомерных адгезинов [14, 233], способные к формированию тримеров, наличие которых коррелирует с инвазивностью *Y. pestis* для эпителиоидных клеток [88, 95]. Установлено, что YарС при экспрессии в *E. coli* опосредует агрегацию бактерий и прилипание к мышинным макрофагоподобным клеткам и эпителиальным клеткам человека. Утрата *yadBC* ведет к незначительному снижению инвазивности для эпителиоидных клеток и понижению вирулентности мутантов при бубонной, но не легочной чуме у мышей [95]. Иммунизация мышей слитым белком GST-YадС<sub>137-409</sub>, содержащим аминокислотные остатки YадС с 137 по 409, присоединенные к С-концу глутатион S-трансферазы (glutathione S-transferase - GST), обеспечивала частичную защиту против заражения Caf1<sup>-</sup> штаммом *Y. pestis* с стимуляцией Th1/Th2 иммунного ответа [184]. Данные находки выводят YадС в число перспективных компонентов кандидатных вакцин.

#### *Факторы инвазии*

В конце прошлого века возбудителя чумы большинство исследователей рассматривали как внеклеточный патоген, благодаря обнаружению мутаций в двух генах, кодирующих главные гомологи инвазина (Inv) и адгезина (YадА) *Y. pseudotuberculosis* [204]. Однако позднее было установлено, что *Y. pestis* может проникать внутрь нефагоцитирующих эукариотических клеток, и данная способность опосредуется рядом факторов патогенности, а именно активатором плазминогена (Pla), белком наружной мембраны OmpX (Ail), и рН 6 антигеном (Psa) [23, 53, 149, 154].

Причем ни один из данных факторов в одиночку не может полностью обеспечить процесс инвазии. J. Seo *et al.* [246] идентифицировали один из добавочных поверхностных белков *Y. pestis*, интимин/инвазин-подобный белок (intimin/invasin-like protein - Ip), кодируемый хромосомным геном YPO3944, подобный поверхностным белкам семейства интиминов/инвазинов грамотрицательных бактерий. Авторы показали, что Ip не участвует в колонизации блох, но необходим для адгезии к клеткам млекопитающего и регулирует системное распространение и вирулентность возбудителя чумы на мышинной модели инфекции, о чем свидетельствует 55-кратное увеличение LD<sub>50</sub> для *Δilp*-мутанта при интраназальном введении. Учитывая, что Ip играет важную роль в развитии легочной формы чумы, он может быть перспективен в качестве кандидата для конструирования вакцинных препаратов.

#### *Эффекторные Yop белки*

Для секреции и транслокации эффекторных Yop белков в клетки млекопитающих *Y. pestis* использует систему секреции белков третьего типа (type III secretion system - T3SS). Белок YopR (19 кДа) – фактор патогенности, секретлируемый *Y. pestis* на ранних стадиях развития инфекции. Причем, YopR транслоцируется не в цитозоль клеток хозяина, а во внеклеточное пространство. На мышинной модели инфекции показано, что делеция гена *yopR* приводит к 10-30-кратному снижению вирулентности *Y. pestis*. Schubot *et al.* [242] исследовали кристаллическую структуру резистентного к протеазам домена кора YopR (38-149 аминокислотные остатки) и обнаружили в этой области пять альфа-спиралей. Структура рассматриваемой области оказалась подобна структуре одного из доменов центрального регулятора T3SS *Y. pestis* YopN. По мнению авторов YopR, возможно, также участвует в регуляции T3SS. У *ΔyopR* мутантов *Y. pestis* нарушался процесс сборки «иглы» аппарата секреции T3SS. При этом YscF не поступал к месту сборки, а секретировался в среду. Предположительно, YopR может регулировать секрецию YscF. Альтернативным вариантом может являться непосредственное участие в полимеризации белка YscF, что менее вероятно, так как YopR не обнаруживали в ассоциации с очищенными «иглами». [42].

YpkA – один из эффекторных Yop белков возбудителя чумы, доставляемых в клетки хозяина посредством системы секреции белков третьего типа и локализующийся на внутренней поверхности плазматической мембраны. YpkA –

мультидоменный эффектор, состоящий из N-концевого секреторного сигнального пептида, который узнается T3SS аппаратом, подобного эукариотическому серин/треонин (Ser/Thr) киназного домена, GDI домена (guanosine dissociation inhibitors – GDI) и C-концевого актин связывающего домена [186, 218]. YpkA у бактерий является неактивной киназой, активация фермента проходит внутри цитозоля клетки хозяина путем связывания с коактиватором актином, которым богаты эукариотические клетки [273]. После активации YpkA подвергается автофосфорилированию, и фосфорилирует целый набор внутриклеточных субстратов, включая Gαq (α-субъединица гетеротримерных G-белков), фосфопротеин, стимулированный вазодилататором (VASP - vasodilator-stimulated phosphoprotein), убиквитин тиоэстеразу (otubain-1), и актин. Цитотоксические эффекты YpkA проявляются преимущественно в виде нарушения актинового цитоскелета, исчезновения стрессовых волокон и округления клеток, которое, по-видимому, зависит от киназной активности и GDI домена [81, 134, 162, 186, 218]. Показано, что мембранно-локализованный домен, расположенный в N-конце белка направляет YpkA к внутренней поверхности клеточной мембраны, где ГТФ-азы выполняют их функции [105]. GDI домен YpkA связывается с GTP или GDP-связывающими GTP-азами, мимикрируя белки GDI хозяина, для подавления обмена нуклеотидами при участии RhoA и Rac1 [218]. YpkA прерывает Gαq-опосредованный сигнальный путь, фосфорилируя Gαq в положении Ser47 [186]. VASP фосфорилируется YpkA преимущественно в положении Ser157, что ведет к подавлению VASP-опосредованной полимеризации актина, прерыванию образования стресс волокон и фагоцитоза макрофагов. VASP играет кардинальную роль в регуляции актинового цитоскелета, который, как было показано, является мишенью при развитии инфекций, вызванных *Helicobacter pylori* и *Listeria monocytogenes* [26, 40]. Киназный и GDI домены YpkA совместно ремоделируют цитоскелет клеток хозяина и прерывают хозяйские клеточные процессы, вызывающие перестройки цитоскелета, такие как фагоцитоз, подвижность клеток и слияние клеток. Помимо эффектов, направленных на цитоскелет, YpkA инициирует гибель клеток хозяина, т.к. показано, что N-концевые аминокислотные остатки 133–262 ответственны за индукцию апоптоза [202]. На мышинной модели инфекции установлено значительное снижение вирулетности YpkA-дефицитного мутанта *Y. pseudotuberculosis* [290]. Сведения о протективности YpkA *Y. pestis* ограничены. Установлено, что вакцинация

YrpA *Y. pestis* стимулирует у мышей образование значительных уровней анти-YrpA антител, достоверно удлиняет среднюю продолжительность жизни, но не влияет на выживаемость при подкожном заражении бескапсульным вариантом вирулентного штамма возбудителя чумы [18]. S. Wang *et al.* [239] попытались использовать ДНК иммунизацию как подход для определения протективной эффективности YrpA при интразальном заражении. Однако даже после модификаций генетической последовательности *yrpA* авторам удалось добиться лишь частичной защиты при заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* KIM1001.

#### *Факторы, обеспечивающие репликацию в макрофагах*

*Y. pestis* – факультативный внутриклеточный патоген, способный реплицироваться на ранней стадии инфицирования макрофагов [56, 60, 126, 257]. C. Rujol *et al.* [223] показали, что локус *pgm*, локализованный на хромосоме возбудителя чумы и ранее ассоциированный с системой транспорта железа, важен и для репликации клеток *Y. pestis* в макрофагах. Репликация Pgm<sup>+</sup> бактерий *Y. pestis* в активированных макрофагах коррелирует с уменьшением содержания в них NO, при этом репликация  $\Delta$ *pgm* бактерий *Y. pestis* возможна только в iNOS<sup>-</sup> (индуцибельная NO синтаза - iNOS) макрофагах, в отсутствие NO. Было показано, что в составе *pgm* локуса находится оперон, названный *rip* (required for intracellular proliferation), состоящий из трех генов *ripA*, *ripB*, *ripC* и необходимый для пролиферации бактериальных клеток внутри макрофагов. Показано, что мутантные штаммы с делецией любого из генов *ripA* и *ripB* неспособны снижать уровень NO и реплицироваться в активированных макрофагах [107, 223, 238, 251]. Белок RipA, кодируемый геном *ripA*, принадлежит семейству структурно гомологичных CoA трансфераз I, ответственных за перенос CoAS<sup>-</sup> аниона от донора CoA тиоэфира к акцептору - свободной кислоте [268]. RipA, представляющий собой тетрамер, функционирует как бутирил-CoA-трансфераза [269]. Предполагаемая функция белка RipB - еноил-гидролаза. Анализ последовательности гена *ripC* и соответствующего ему белка, аннотированного ранее как субъединица белка цитрат лиазы, а также отсутствие в геноме *Y. pestis* генов, кодирующих цитрат лиазу, позволили R. Torres *et al.* [270] выдвинуть предположение о принадлежности белка RipC к производному CoA. Таким образом, возможный сценарий действия оперона заключается в следующем: синтез ацетил-CoA, являющегося метаболическим предшественником в биосинтезе жирных кислот, необходимых для строительства

клеточной стенки и, возможно, являющихся причиной падения содержания NO [180, 232]. Авторы допустили, что конечным продуктом *rip* оперона является бутират, который косвенно обладает способностью подавлять IFN-опосредованную индукцию макрофагами продукции NO, предотвращая гибель бактериальных клеток [142, 203]. BLAST анализ доступных геномов прокариот показал, что *rip* оперон присутствует у микроорганизмах различных видов, в том числе, *Salmonella* и *Burkholderia*, что свидетельствует о целесообразности его сохранения в геномах патогенных микроорганизмов в ходе эволюции.

### *Регуляторные белки*

Рецептор циклического аденозинмонофосфата (Cyclic AMP receptor protein - Crp) является регулятором вирулентности многих патогенов [196, 229, 252, 301]. Crp контролирует экспрессию множества генов бактерий, ассоциированных с вирулентностью и отвечающих за приспособление к изменяющимся условиям окружающей среды [52]. Crp активен только в присутствии малой молекулы индуктора сАМР. Образовавшийся комплекс сАМР-Crp связывается с промоторными областями целевых генов, чтобы активировать или репрессировать их транскрипцию [52]. Комплекс сАМР-Crp модулирует экспрессию более 6 % генов *Y. pestis*, продукты которых обладают большим разнообразием функций [301]. Crp необходим для развития бубонной и легочной чумы, в основе которых лежит Crp-зависимая экспрессия *pla* и оперона *sucO-ypkA-yopJ* системы секреции III-го типа Yop-Ysc *Y. pestis* [141, 169, 300]. В то же время экспрессия Crp положительно регулируется PhoP на уровне транскрипции и Hfq (главный посттранскрипционный регулятор, который контролирует образование биопленки и вирулентность у штаммов *Y. pestis*) на посттранскрипционном уровне [155, 303], что указывает на значимость роли Crp в регуляции генов, кодирующих факторы патогенности, *Y. pestis*. Crp или его гомологи регулируют контроль образования биопленок у многих патогенов: *L. monocytogenes* [237], *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* [175], *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [271], *Vibrio cholera* [92] и *Serratia marcescens* [137]. Установлено, что потеря Crp ведет к значительному снижению образования биопленки возбудителем чумы [291]. Причем показано, что Crp оказывает прямое влияние на транскрипцию *gmhA* и опосредованно активирует транскрипцию *waaAE-coaD* путем

прямого влияния на *phoPQ*-YPO1632, но не оказывает регуляторного влияния на гены *hms* на уровне транскрипции [170].

#### *Ингибиторы лизоцима*

Возбудитель чумы обладает гомологами периплазматического ингибитора лизоцима *Ivu* и мембрано-связанного ингибитора лизоцима *MliC*. Показано, что *MliC* не требуется чумному микробу для устойчивости к лизоциму и развития инфекции. Делеция гена *ivu* снижала способность вирулентного штамма *Y. pestis* CO92 противостоять лизоциму и полиморфно-ядерным нейтрофилам, но не влияла на способность бактерии к росту в сыворотке или устойчивость к макрофагам. Штамм *Y. pestis*, лишенный *Ivu*, обладал сниженной вирулентностью для мышей при подкожном или интраназальном пути введения. При введении лизоцим М-дефицитным мышам линии FVB, не способным продуцировать лизоцим *LysM*, «дикий» штамм *Y. pestis* и его *Divu* мутант обладали одинаковой вирулентностью [77].

#### *Белки, участвующие в формировании биопленок*

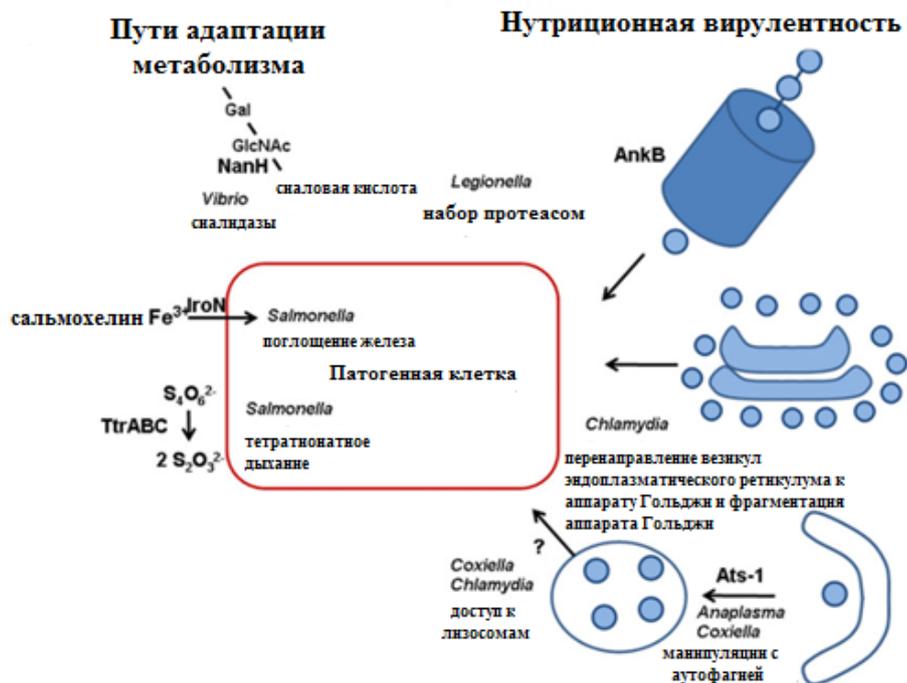
Важным процессом, обеспечивающим передачу возбудителя чумы новым теплокровным хозяевам, является размножение *Y. pestis* в организме блохи в виде бактериальных биопленок, заполняющих ее преджелудок и блокирующих прохождение пищи [2, 19, 49, 116, 117, 128, 129, 174, 208, 210]. Формирование биопленок у *Y. pestis* активируется циклическим ди-гуанилатмонофосфатом (ц-ди-ГМФ, c-di-GMP) [43] и подавляется двухкомпонентной регуляторной системой *Rcs* (regulation of capsular synthesis). *Rcs* состоит из двух мембранных белков - *RcsD* и *RcsC*; ДНК-связывающего регулятора – *RcsB*, и вспомогательного белка – *RcsA*. После стимуляции *RcsC* – сенсор автофосфорилируется и переносит фосфатную группу к *RcsD* и, затем, к *RcsB*. Фосфорилированный *RcsB* формирует *RcsB* гомополимер или *RcsB/RcsA* гетеродимер. Гетерополимер *RcsB/RcsA* подавляет экспрессию *HmsT*, фермента дигуанилат циклазы, которая синтезирует c-di-GMP, что, в итоге, приводит к ингибированию продукции биопленок [261]. Наличие регулятора *RcsB/RcsA* в клетках *Y. pseudotuberculosis* приводит к невозможности микроорганизмов данного вида формировать биопленки в организме насекомых [259, 260]. В штаммах *Y. pestis* ген *rcaA* инактивирован, замена данного гена на функциональный ген из возбудителя псевдотуберкулеза ведет к подавлению способности штаммов *Y. pestis* образовывать

био пленки в преджелудке блох, что свидетельствует о необходимости этой стадии в эволюционном изменении механизма распространения микроорганизма.

#### *Факторы нутриционной вирулентности чумного микроба*

Питание и размножение имеют фундаментальное значение для жизни, поэтому в ходе эволюции все организмы пытаются максимизировать получение энергии и строительных блоков для своей биомассы из доступных питательных веществ. Это актуально и для бактериальных патогенов, колонизирующих ткани хозяина и нуждающихся в питательных ресурсах для выживания/пролиферации в его организме. Причем получение питательных веществ во время инфекции может быть сложной задачей для микробных патогенов, поскольку одной из функций системы врожденного иммунитета хозяина является ограничение доступа к основным питательным веществам, таким как, например, железо.

Таким образом, для противодействия ограничениям со стороны хозяина «успешные» патогены выработали высокоэффективные стратегии получения питательных веществ [173, 191, 220, 226, 293]. Например, у представителей рода *Salmonella* кластер генов *iroBCDE* кодирует продукты, участвующие в биосинтезе сидерофора сальмохелина, устойчивого к деградации липокалином-2 хозяина, который во время воспаления инактивирует другие бактериальные сидерофоры, что дает сальмонеллам конкурентное преимущество над остальной микробиотой из-за лучшего доступа к железу (Рисунок 1) [224]. Другие патогены, такие как, например, *Shigella* и *Listeria*, приобрели способность расти в цитозоле клетки-хозяина, где имеют прямой доступ к его питательным веществам.



Общие пути адаптации метаболизма микроорганизмов показаны слева (факторы патогенности обозначены красным цветом). Стратегии «нутриционной вирулентности» патогенов, нацеленные на механизмы биосинтеза и деградации клеток хозяина для использования полученных при этом питательных веществ, показаны справа. Факторы коксиелл или хламидий, облегчающие доступ к лизосомам, еще не идентифицированы.

Рисунок 1 – Стратегии микробных патогенов для приобретения питательных веществ в инфицированных тканях хозяина

Питание микроорганизмов – сложный процесс, поскольку патогены в ходе инфекции обычно встречаются с несколькими различными нишами/тканями макроорганизма с уникальной для каждой из них доступностью питательных веществ. Даже в одной и той же нише доступность питательных веществ может динамично изменяться из-за иммунного ответа хозяина и связанных с ним воспаления и гипоксии, а также деградации макромолекул в воспалительных очагах [192]. Тканевая гипоксия в клетках макроорганизма вызывает драматический сдвиг метаболизма с активированием транскрипции гликолитических ферментов и путей гликолиза, приводящий к образованию в месте воспаления высоких уровней молочной кислоты и

повышению кислотности [192]. Персистенция *Mycobacterium tuberculosis* в воспалительных гранулемах зависит от использования в качестве источника углерода жирных кислот и холестерина [179, 264].

Утрата вирулентности и/или снижение внутриклеточной выживаемости, вызванная мутациями в транспортных системах марганца (Mn), была продемонстрирована для различных патогенов, включая *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Salmonella* spp., различные виды стрептококков и *Y. pseudotuberculosis* [17, 25, 39, 46, 78, 112, 127, 140, 167, 177, 199, 200, 253]. У грамотрицательных бактерий известны две системы транспорта марганца Yfe/Sit и/или MntH. Установлено, что система Yfe *Y. pestis* участвует в транспорте железа и марганца [34, 36, 208]. Позднее авторы продемонстрировали, что мутация в *yfe* или *mntH* существенно не влияла на рост чумного микроба в аэробных условиях *in vitro* при дефиците марганца. Двойной мутант  $\Delta yfe \Delta mntH$  показал умеренный дефект роста, который компенсировался добавлением марганца. Наконец, двойной мутант *Y. pestis*  $\Delta yfe \Delta mntH$  проявлял ~133-кратную потерю вирулентности на модели бубонной чумы у мышей, но сохранял вирулентность на модели легочной чумы. Это говорит о существовании отличий в доступности и потребности бактерии в марганце или транспортерах марганца, используемых *Y. pestis* в легких и системном кровотоке [207].

Железо (Fe) необходимо для роста почти всех бактерий. В 1950-х гг. Джексон и Берроуз впервые обнаружили, что *Y. pestis* нуждается в железе для роста *in vivo*. В последующем проведенные геномные и экспериментальные исследования показали, что в геноме чумного микроба существует множество генов, кодирующих транспортные системы железа с доказанной функцией, а также предполагаемых и нефункционирующих [96]. Некоторые из них являются дефектными из-за сдвига рамок считывания или вставок IS элементов, в то время как другие функционируют *in vitro*, но не имеют установленной роли в возникновении инфекций. Действительно, было показано, что только три транспортера Fe (Ybt, Yfe и Feo) играют важную роль по крайней мере в одной форме чумы. Система иерсиниабактина (Ybt) имеет важное значение на ранних кожно-лимфатических стадиях бубонной чумы, не имеет значения на септической стадии и имеет решающее значение при легочной чуме [209].

Подобно железу, организм млекопитающего-хозяина с помощью целого ряда механизмов ограничивает для внедрившихся патогенов доступность цинка ( $Zn^{2+}$ ). Уровень  $Zn^{2+}$  в сыворотке крови представляет собой микромолярные количества, металл часто хелатирован белками трансферрином, альбумином или  $\alpha_2$ -макроглобулином [94, 225, 231, 286]. В ходе инфекции организм млекопитающего снижает концентрацию  $Zn^{2+}$  на системном уровне и локально, пытаясь ограничить доступность этого необходимого для патогенов микроэлемента [68, 94, 120, 139, 171, 225, 231, 254, 286]. Поэтому микроорганизмам необходимы высокоаффинные системы получения  $Zn^{2+}$  в ходе инфекционного процесса. Для преодоления низкой концентрации  $Zn^{2+}$ , наблюдаемой внутри эукариотических клеток, многие патогенные бактерии используют транспортер цинка ZnuABC [102, 108, 139, 211]. А. G. Bobrov *et al.* [44] показали, что помимо транспортера ZnuABC возбудитель чумы обладает вторичным транспортером  $Zn^{2+}$ , включающим компоненты иерсиниабактина (Ybt), сидерофорозависимой транспортной системы железа. Авторы установили, что критичным для функционирования вторичной транспортной системы  $Zn^{2+}$  возбудителя чумы является синтез сидерофора Ybt и белка внутренней мембраны YbtX. Наконец, авторы показали, что система ZnuABC и Ybt-синтетаза HMWP2, предположительно через синтез Ybt, способствуют развитию летальной инфекции на модели септической чумы у мышей. В последующем А. G. Bobrov *et al.* [45] продемонстрировали в эксперименте на модели бубонной и легочной чумы, что двойной мутант  $\Delta ybtX\Delta znu$  аттенуирован для мышей, тогда как одинарный мутант  $\Delta ybtX$  сохранил вирулентность на уровне исходного штамма. В то время как ограниченность  $Zn^{2+}$  в организме хозяина является ключевым фактором «нутриционного» иммунитета, его избыток играет антимикробную роль в контроле внутриклеточной выживаемости бактерий. Установлено, что экспортер  $Zn^{2+}$ , ZntA, играет роль в устойчивости к токсическим эффектам  $Zn^{2+}$  *in vitro*, но что двойной мутант  $\Delta zntA\Delta zur$  сохраняет высокую вирулентность на моделях легочной и бубонной чумы и высокую выживаемость в макрофагах. Данные авторов показывают, что Ybt или модифицированный Ybt принимают участие или способствуют цинк-связывающей активности в супернатантах культур и вовлечены в получение  $Zn^{2+}$  чумным микробом.

Метаболизм патогенов адаптировался к различным уникальным, сложным и динамичным микросредам *in vivo*, чтобы максимизировать доступность питательных

веществ из ресурсов хозяина. Хотя получение микроорганизмами питательных веществ *in vivo* является основным фундаментальным аспектом инфекционных заболеваний, влияющим на патогенность и эффективность лечения антибиотиками [189, 234], наши знания о метаболизме микробов *in vivo* по-прежнему остаются очень ограниченными. Вероятно, это связано с тем, что до настоящего времени основное внимание уделяется изучению «классической» вирулентности, поиску новых факторов патогенности, а также решению экспериментальных задач по расшифровке получения питательных веществ и их обмена в сложных микросредах в организме хозяина. Более того, многие метаболические способности бактерий в ходе инфекции опосредуются избыточной работой ферментов и не могут быть обнаружены с помощью обычных генетических подходов. С другой стороны, использование транскриптомного анализа и полногеномные скрининги с использованием транспозонного мутагенеза помогают идентифицировать наборы генов, продукты которых участвуют в метаболизме микроорганизмов *in vivo*. В большинстве случаев основные механизмы и их функциональная значимость остаются неясными, но обширные текущие исследования постоянно предоставляют новую информацию, которая в конечном итоге может привести к комплексному пониманию питания и метаболизма возбудителей в организме хозяина. Полученные данные обеспечат необходимую основу для реконструкций и систематизации путей метаболизма на основе микробного генома и определения мишеней для лекарственных средств [61].

### 1.3 Протеомный подход для выявления факторов патогенности чумного микроба

Исследования на белковом уровне (протеомика) могут дать больше информации о вирулентности штаммов *Y. pestis* и служить логическим продолжением выполняемых многочисленных геномных и транскриптомных исследований.

В настоящее время двумерный электрофорез (2-DE) широко используется в качестве инструмента для изучения факторов вирулентности и регуляторных механизмов, участвующих в патогенности *Y. pestis*. R. Pieper *et al.* [212] охарактеризовали периплазматический протеом штамма *Y. pestis* KIM6+ с помощью 2-DE белков, выделенных из разных субклеточных фракций. Авторы обнаружили, что

несколько периплазматических белков с неизвестными ранее функциями могут играть важную роль в жизненном цикле *Y. pestis*. Они также сравнили субклеточные протеомы чумного микроба при температурах 26 и 37 °C, и обнаружили, что количество многих белков внешней мембраны, включая белок клеточной адгезии Ail (y1324) и три предполагаемых малых бета-цилиндрических белка (y1795, y2167 и y4083), сильно увеличивается при температуре тела млекопитающего. Напротив, белок семейства Ail/Lom y1682 (OmpX) сильно увеличивается при температуре 26°C [213]. Некоторые белки системы секреции типа VI идентифицируются только в мембранных фракциях клеток стационарной фазы, выращенных при температуре 26°C. В.А. Chromy *et al.* [66] использовали систему Ettan 2-D DIGE для сравнения экспрессии белков *Y. pestis* температурах 26 и 37 °C с добавлением в среду культивирования 4 mM Ca<sup>2+</sup> и без него. Авторы обнаружили дифференциальную экспрессию нескольких факторов, ассоциированных с патогенностью чумного микроба (включая каталазу-пероксидазу (KatY), мышинный токсин (Ymt), Pla и капсульный антиген F1 (Caf1)), а также нескольких предполагаемых факторов патогенности, мембраносвязанных белков и белков, участвующих в метаболизме.

R. Pieper *et al.* [214] сравнили изменения протеомов в трех субклеточных фракциях (растворимые периплазматические, цитоплазматические и смешанные мембранные) штамма *Y. pestis* KIM6+, выращенного в условиях дефицита железа и двух физиологически значимых температурах (26 и 37°C). Авторы обнаружили, что в клетках, испытывающих недостаток железа, значительно увеличивается экспрессия белков пяти систем сбора железа/сидерофоров *Y. pestis* (Ybt, Yfe, Yfu, Yiu и Hmu) и белка предполагаемого рецептора железа/хелата наружной мембраны (Y0850).

Проведенные сравнительные исследования являются предпосылками для дальнейшего изучения функциональных изменений чумного микроба. Однако низкий охват двумерного электрофореза (обычно 20-30 % от всех прогнозируемых белков) является ограничением для протеомного анализа. Поэтому в некоторых исследованиях используются другие или комбинированные технологии. Z. Chen *et al.*, [63] создали белковый микрочип, состоящий из ассоциированных с патогенностью белков *Y. pestis*, для сравнения профилей антител, продуцируемых в ответ на штамм «дикого» типа и мутанта по генам кворум сенсинга. Результаты показали, что кворум сенсинг влияет на экспрессию многих ассоциированных с патогенностью *Y. pestis* белков, включая

антигены F1, LcrV, KatY и pN6. К.К. Nixson *et al.* [119] использовали метод масс-спектрометрии и кластерный анализ для сравнения изменения численности 992 белков *Y. pestis* при четырех контрастных условиях роста (26 °C и 37 °C, с Ca<sup>2+</sup> или без него), которые имитировали состояния роста либо в организме блохи, либо млекопитающего. Авторы выявили уникальные биомаркеры, специфически связанные с разными условиями роста. R.E. Jabbour *et al.* [124] проанализировали белки наружной мембраны непатогенного штамма *Y. pestis* A1122 методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Однако в этом исследовании авторы сравнили белки наружной мембраны *Y. pestis* и *E. coli*, а только сравнительный анализ протеома между вирулентным и неvirulentным штаммами *Y. pestis* может помочь более эффективно идентифицировать ассоциированные с патогенностью белки.

Последние достижения в области многомерного хроматографического разделения и передовые методы масс-спектрометрии способствуют крупномасштабным исследованиям профилирования протеомов [206, 281, 285]. Внедрение высокопрофессиональных приборов для МС, в частности масс-анализатора ионно-циклонного резонанса с Фурье преобразованием и нового масс-спектрометра LTQ Orbitrap, позволяет идентифицировать белковые смеси с высокой пропускной способностью и качеством [59, 115, 197, 310]. В исследовании протеома металлредуцирующего микроорганизма *Geobacter sulfurreducens* с использованием жидкостной хроматографии сверхвысокого давления и стратегии точного метода масс-спектрометрии меток массы и времени, а также двумерного электрофореза авторам удалось приблизиться примерно к 90 % от общего количества предсказанных продуктов генов [230]. Чтобы лучше понять физиологию *Y. pestis* и патогенез чумы, L. Zhou *et al.* [306] провели углубленный протеомный анализ штамма *Y. pestis* 91001 при температуре 26°C в химически определенной среде, имитирующей рост в блохе. Авторы использовали усовершенствованный масс-спектрометр LTQ-FT, оснащенный источником ионов наноспрея и бинарной высокоэффективной жидкостной хроматографической системой серии Agilent 1100. Результаты продемонстрировали высокий охват (всего идентифицировано 1926 белков (13 082 пептида) *Y. pestis* 91001, что составляло 46,5 % (1926/4142)) и высокое качество (менее 1 % ложных обнаружений) при использовании этой комбинированной стратегии. Последующий транскриптомный анализ всего генома *Y. pestis*, проведенный на микрочипе ДНК,

определил 1655 генов с 56,65 % совпадением с протеомными результатами. L. Zhou *et al.* [306] обнаружили высокую экспрессию продуктов локуса *hms* и мышинового токсина в условиях *in vitro*, моделирующих пребывание чумного микроба в организме блохи. Несколько факторов патогенности, такие как Pla, участвующий в адгезии и инвазии к клеткам млекопитающих, двухкомпонентная система PhoP/PhoQ, необходимая для внутриклеточного роста, система секрции III типа (T3SS), система приобретения железа (Ybt, Yfe и Yfu) и Fur, участвующие во внеклеточном росте и системной инфекции, также активировались в различной степени. Т.о., чумной микроб явно использует различные стратегии выживания, прежде чем вторгнуться в организм основного хозяина -млекопитающего.

A.C. Schrimpe-Rutledge *et al.* [241] провели уточнение аннотации геномов на основе омиксных технологий с использованием транскриптомного и протеомного анализа путем сравнения эпидемически значимого штамма *Y. pestis* CO92, *Y. pestis* subsp. *microti* Pestoides F и *Y. pseudotuberculosis* PB1. С. Ansong *et al.* [24] предоставили еще один пример сравнительного исследования с использованием геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики для выяснения механизма патогенности представителей рода *Yersinia*. Они не только предсказали набор предполагаемых факторов патогенности, включающий 34 белка кодируемых плазмидой кальцийзависимости pCad, 53 белка кодируемых плазмидой pFra и 64 белка, кодируемых хромосомой; но и выявили потенциальные роли в патогенности продуктов 11 генов плазмиды pFra (YPMТ1.38с, YPMТ1.39с, YPMТ1.40с, YPMТ1.41с, YPMТ1.46Ac, YPMТ1.49Ac, YPMТ1.49с, YPMТ1.. 52с, YPMТ1.55с, YPMТ1.88 и YPMТ1.89) для крупных животных, включая человека.

Для объединения всех имеющиеся «омиксных» данных, полученных в фрагментарных исследованиях *Y. pestis*, необходимо повторно анотировать геном чумного микроба с тщательной реконструкцией путей метаболизма [187].

#### 1.4 Заключение по Обзору литературы

В последние три десятилетия достигнут значительный прогресс в понимании патогенеза чумной инфекции. Но, несмотря на значительное количество публикаций, посвященных вновь выявляемым факторам патогенности чумного микроба, природа

феномена «избирательной вирулентности» штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* пока еще не известна. До настоящего времени большинство омиксных исследований на чумном микробе проводились *in vitro*, и выполнение экспериментов *in vivo* (например, изучение взаимодействия патогена и хозяина в режиме реального времени) по-прежнему является сложной задачей с точки зрения технического осуществления. Для понимания вирулентности штаммов *Y. pestis* с помощью омиксных технологий необходима тщательная разработка животных моделей.

Крупномасштабные данные, содержащие информацию о геноме, транскриптоме, кРНК и протеоме возбудителя чумы нуждаются в систематизации и интеграции, сложностью которых остается отсутствие единообразия экспериментальных условий их получения. Однако даже фрагментированные, эти данные дают многочисленные подсказки для дальнейших исследований. При проведении динамических сравнительных омиксных исследований, даже при сравнении с *Y. pseudotuberculosis*, необходимо выбирать высоковирулентные и менее вирулентные штаммы, чтобы выявить факторы, связанные с патогенностью для разных животных моделей, и различия в их регуляции. Эти данные чрезвычайно важны для разработки препаратов для лечения, совершенствования методов лабораторной диагностики и противодействия чуме.

Также продолжаются поиски оптимального способа аттенуации при конструировании вакцинного штамма или определение антигенного/эпитопного и адьювантного составов молекулярной вакцины против чумы, а также способов ее презентации. На наш взгляд, наиболее перспективными мишенями для иммунопрофилактики и антимикробной терапии чумы являются поверхностно расположенные белки внешней мембраны и/или адгезины *Y. pestis*, а также белки, опосредующие нутриционную вирулентность чумного микроба, что позволит повысить эффективность разнонаправленного бактерицидного и/или бактериостатического действия иммунобиологических и/или лекарственных препаратов.

Таким образом, для проведения исследования молекулярных основ избирательной вирулентности *Y. pestis* subsp. *microti* необходимо выполнить сравнение штаммов или субкультур одного штамма, изначально авирулентных для морских свинок с культурами, повысившими свою вирулентность в ходе тестикулярных

пассажей. Анализировать необходимо спектры белков, секретируемых этими культурами при их выращивании в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок. Белки с отличающимися уровнями продукции можно идентифицировать методом масс-спектрометрии. Нокаутный мутагенез генов, кодирующих синтез данных белков в «универсально» вирулентном штамме *Y. pestis* subsp. *pestis* позволит пролить свет на вклад данных молекул в патогенез чумы, а молекулярное клонирование генов с выделением и очисткой препаративных количеств рекомбинантных белков и определение их иммуногенной активности поможет выяснить их вклад в иммуногенез чумы.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ<sup>1</sup>

#### 2.1 Штаммы микроорганизмов

Видовые и родовые названия основных штаммов микроорганизмов, использованных в работе и источники их получения представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика штаммов, использованных в работе

п/н	Номер штамма (особое название)	Характеристика	Источник получения и (или) ссылка на литературу
1	2	3	4
<i>Y. pestis subsp. pestis</i>			
1.	EV линия НИИЭГ (bv. orientalis)	<i>Δpgm</i> , вакцинный; линия EV, поддерживаемая в России для производства живой чумной вакцины	ГИСК им. Л.А Тарасевича
2.	231(708) (bv. antiqua)	«Дикого» типа, выделен в 1947 г. от сурка в Среднеазиатском горном очаге	ГКПБ «Микроб»
<i>Y. pestis subsp. microti</i>			
3.	M-999 Amv (bv. caucasica)	Выделен в Армении, Колтахчи, в 1958 г. от общественной полёвки	ГКПМ- Оболенск
4.	C-111 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>r</sup> ); выделен в 1965 г. из блох <i>Ceratophyllus consimilis</i> в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
5.	C-345 (bv. caucasica)	Выделен в Ленинанканском горном очаге № 04 от трупа обыкновенной полёвки в 1976 г.	МЖК СтавНИПЧИ

<sup>1</sup> Все представленные исследования проводили в соответствии с: Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности), СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», "Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного и холерного микробов. - Саратов, 1982", МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

1	2	3	4
6.	C-346 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен из <i>Stenophthalmus teres</i> в 1976 г. в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
7.	C-376 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1958 г. от полевки общественной ( <i>Microtus socialis</i> ) в Ленинанканском горном очаге	МЖК ИркНИПЧИ
8.	C-512 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен из блох <i>Callopsylla caspia</i> в 1982 г. в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
9.	C-586 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1980 г из блох <i>Ct. teres</i> в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
10.	C-588 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1981 г от блох <i>C. caspia</i> обыкновенной полевки в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
11.	C-590 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1983 г из трупа обыкновенной полевки в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
12.	C-591 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1983 г из блох <i>C. caspia</i> в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
13.	C-593 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1982 г из блох <i>Ct. teres</i> в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
14.	C-594 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1982 г из блох <i>Ct. teres</i> в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
15.	C-98 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1964 г. от обыкновенной полевки в Ленинанканском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
16.	C-273 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Ленинанканском горном очаге № 04 от обыкновенной полевки в 1969 г	МЖК СтавНИПЧИ
17.	C-287 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Ленинанканском горном очаге № 04 от блохи <i>Ct. teres</i> в 1970 г.	МЖК СтавНИПЧИ
18.	C-290 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Ленинанканском горном очаге № 04 от блохи <i>Ct. teres</i> в 1971г.	МЖК СтавНИПЧИ
19.	C-370 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1978 г. из <i>C. caspia</i> обыкновенной полевки в Восточно-Кавказском очаге	МЖК СтавНИПЧИ
20.	C-535 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1984 г. от обыкновенных полевков в Восточно-Кавказском высокогорном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
21.	C-537 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1984 г. из <i>Ct. golovi</i> обыкновенных полевков в Восточно-Кавказском очаге	МЖК СтавНИПЧИ
22.	C-538 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1984 г. из <i>Megabotris turbidus</i> в Восточно-Кавказском высокогорном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
23.	C-540 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1984 г. из блох <i>Ct. golovi</i> обыкновенных полевков в Восточно-Кавказском очаге	МЖК СтавНИПЧИ
24.	C-669 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1988 г. из блох <i>Ct. intermedius</i> в Восточно-Кавказском высокогорном очаге	МЖК СтавНИПЧИ

Продолжение Таблицы 1

1	2	3	4
25.	C-671 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге № 39 от блох <i>Ct. golovi</i> в 1988 г	МЖК СтавНИПЧИ
26.	C-675 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге № 39 от блох <i>Ct. intermedius</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
27.	C-676 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в 1988 г. из блох <i>C. caspius</i> в Восточно-Кавказском высокогорном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
28.	C-712 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге № 39 от блох <i>Ct. intermedius</i> , собранных от гнезд обыкновенной полевки в 1996 г.	МЖК СтавНИПЧИ
29.	C-717 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге № 39 от блох <i>Frontopsylla elata</i> собранных из гнезд обыкновенной полевки	МЖК СтавНИПЧИ
30.	C-746 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге № 39 от блохи из гнезд обыкновенной полевки в 1997 г.	МЖК СтавНИПЧИ
31.	C-678 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге № 39 от блох <i>F. elata</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
32.	C-709 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге № 39 от блох <i>F. elata</i> , собранных от гнезд обыкновенной полевки в 1996 г.	МЖК СтавНИПЧИ
33.	C-715 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском очаге № 39 в 1996 г. из блох <i>C. caspius</i> обыкновенной полевки	МЖК СтавНИПЧИ
34.	C-716 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском очаге в 1996 г. из блох <i>Fr. elegata</i> обыкновенной полевки	МЖК СтавНИПЧИ
35.	C-741 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге от <i>M. turbidus</i> из гнезд обыкновенной полевки в 1998 г	МЖК СтавНИПЧИ
36.	C-744 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорном очаге № 39 от <i>F. elata</i> из гнезд обыкновенной полевки в 1997 г.	МЖК СтавНИПЧИ
37.	C-700 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>S</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорном очаге № 39 от норových блох <i>C. caspius</i> из гнезд обыкновенной полевки в 1995 г	МЖК СтавНИПЧИ

1	2	3	4
38.	C-707 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорном очаге № 39 от <i>C. intermedius</i> из гнезд обыкновенной полевки в 1996 г.	МЖК СтавНИПЧИ
39.	C-739 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорном очаге № 39 от <i>C. turbidus</i> из гнезд обыкновенной полевки в 1998 г.	МЖК СтавНИПЧИ
40.	C-823 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорном очаге № 39 от <i>C. turbidus</i> из гнезд обыкновенных полевков в 2010 г	МЖК СтавНИПЧИ
41.	C-824 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорном очаге № 39 от <i>F. elata</i> , счесанных с трех обыкновенных полевков в 2010 г	МЖК СтавНИПЧИ
42.	C-825 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Восточно-Кавказском высокогорном очаге № 39 от <i>C. turbidus</i> , счесанных с обыкновенных полевков в 2010 г.	МЖК СтавНИПЧИ
43.	C-265 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Присеванском горном очаге № 05 от <i>Ct. wladimiri</i> в 1969 г	МЖК СтавНИПЧИ
44.	C-269 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Присеванском горном очаге № 05 от обыкновенной полевки в 1969 г.	МЖК СтавНИПЧИ
45.	C-288 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Присеванском горном очаге № 05 от обыкновенной полевки в 1969 г.	МЖК СтавНИПЧИ
46.	C-359 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1978 г из блох <i>Ct. teres</i> в Присеванском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
47.	C-661 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1988 г. из блох <i>F. elatae</i> в Ленинанском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
48.	C-664 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1988 г от обыкновенной полевки в Присеванском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
49.	C-666 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1988 г из блох <i>F. elatae</i> в Присеванском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
50.	C-77 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в 1962 г из блох <i>Ct. wladimiri</i> обыкновенной полевки в Присеванском горном очаге	МЖК СтавНИПЧИ
51.	C- 102 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге № 6 от <i>Ct. wladimiri</i> в 1964 г.	МЖК СтавНИПЧИ
52.	C-103 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге № 6 от от трупа обыкновенной полевки	МЖК СтавНИПЧИ
53.	C-197 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге № 6 от блохи из гнезд обыкновенной полевки в 1967 г.	МЖК СтавНИПЧИ
54.	C-267 (bv. caucasica)	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> ); выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге № 6 от блохи из гнезд обыкновенной полевки в 1967 г.	МЖК СтавНИПЧИ

1	2	3	4
55.	И-2231 (bv. ulegeica)	Выделен в Сайлюгемском очаге чумы М01 из суспензии блох <i>Amphalius runatus</i> в 1972 г.	ГКПМ- Оболенск
56.	И-2238 (bv. ulegeica)	Выделен в Сайлюгемском очаге чумы М01 от пищухи монгольской ( <i>Ochotona pricei</i> ) в 1972 г.	ГКПМ- Оболенск
57.	И-2239 (bv. ulegeica)	Выделен в Сайлюгемском очаге чумы М01 от пищухи монгольской <i>O. pricei</i> в 1972 г.	ГКПМ- Оболенск
58.	И-2422 (bv. ulegeica)	Выделен в 1974 г. от блох монгольской пищухи в Монголии	МЖК ИркНИПЧИ
59.	И-3189 (bv. ulegeica)	Выделен в Гурван-Сайханском М13 очаге чумы от пищухи монгольской <i>O. pricei</i> в 1986 г.	МЖК ИркНИПЧИ
60.	И-3190 (bv. ulegeica)	Выделен в Гурван-Сайханском М13 очаге чумы от пищухи монгольской <i>O. pricei</i> в 1986 г.	МЖК ИркНИПЧИ
61.	А-1820 (bv. talassica)	Выделен в Таласском высокогорном очаге чумы № 40	РКПБ «Микроб»
62.	А-1802 (bv. talassica)	Выделен в Таласском высокогорном очаге чумы № 40 от <i>C. caspia</i> из очеса красного сурка в 1980 г.	РКПБ «Микроб»
63.	А-1804 (bv. talassica)	Выделен в Таласском высокогорном очаге чумы № 40 от блохи <i>Pes. hemorosus</i> лесной мыши в 1980 г.	РостНИПЧИ
64.	А-1807 (bv. talassica)	Выделен в Таласском высокогорном очаге чумы № 40 от блохи <i>Neopsylla fereture</i> в 1980 г.	РостНИПЧИ
65.	И-3134 (bv. xilingolensis)	Выделен в М20 очаге на территории Баян Хонгорского аймака от полевки Брандта ( <i>Lasiopodomys brandti</i> ) в 1984 г.	МЖК ИркНИПЧИ
66.	А-1249 (bv. hissarica)	Выделен в Гиссарском высокогорном очаге чумы № 34 от арчевой полевки <i>Microti juldaschi</i> в 1970 г.	МЖК ИркНИПЧИ
67.	5307-Gis (bv. hissarica)	Выделен в Гиссарском высокогорном очаге чумы № 34 от <i>F. tlatavara</i> (из шерсти арчевой полевки) в 1979 г.	МЖК СтавНИПЧИ
68.	А-1725 (bv. hissarica)	Выделен в Гиссарском высокогорном очаге чумы № 34 от сурка красного <i>Marmota caudata</i> в 1972 г.	МЖК ИркНИПЧИ
69.	И-3455 (bv. altaica)	Выделен в Алтайском горном очаге № 36	ГКПМ- Оболенск
70.	И-2359 (bv. altaica)	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох <i>Neopsylla mana</i> из гнезда монгольской пищухи в 1973 г.	МЖК ИркНИПЧИ
71.	И-3214 (bv. altaica)	Выделен в Сайлюгемском очаге М01 от блохи <i>Amphipsylla primaris</i> в 1987 г.	МЖК ИркНИПЧИ
72.	И-3252 (bv. altaica)	Выделен в Сайлюгемском очаге М01 от блохи <i>A. runatus</i> с пищух монгольских в 1990 г.	ГКПМ- Оболенск

1	2	3	4
73.	2420 (bv. altaica)	Выделен в очаге М20 на территории Баян-Хонгорского аймака от полевки Брандта в 1956 г.	МЖК СтавНИПЧИ
74.	А-513 (bv. altaica)	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох пищевух в 1961 г.	РостНИПЧИ
<i>Делеционные мутанты Y. pestis</i>			
75.	<i>EVΔhtpG</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Tox<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>HtpG<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>-</sup></i>	НИ*
76.	<i>231ΔhtpG</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Ymt<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>HtpG<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>+</sup></i>	НИ
77.	<i>И-3189ΔhtpG</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Ymt<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>HtpG<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>+</sup></i>	НИ
78.	<i>EVΔglnA</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Ymt<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>GlnA<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>-</sup></i>	НИ
79.	<i>231ΔglnA</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Ymt<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>GlnA<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>+</sup></i>	НИ
80.	<i>EVΔglnALG</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Tox<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>GlnA<sup>-</sup>GlnL<sup>-</sup>GlnG<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>-</sup></i>	НИ
81.	<i>231ΔglnALG</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Tox<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>GlnA<sup>-</sup>GlnL<sup>-</sup>GlnG<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>+</sup></i>	НИ
82.	<i>EVΔmetQ</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Tox<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>HtpG<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>-</sup></i>	НИ
83.	<i>231ΔmetQ</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Ymt<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>MetQ<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>+</sup></i>	НИ
84.	<i>231ΔmetQ/ pACYC-metQ</i>	<i>Fra<sup>+</sup>Tox<sup>+</sup>Lcr<sup>+</sup>MetQ<sup>-</sup>Pla<sup>+</sup>Pgm<sup>+</sup>/MetQ<sup>+</sup></i>	НИ
<i>E. coli</i>			
85.	S17-1 $\lambda$ pir	<i>thi pro hsdR<sup>-</sup> hsdM<sup>+</sup> recA RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tp<sup>R</sup> Sm<sup>R</sup> Pm<sup>S</sup>)</i>	ГКПМ- Оболенск
86.	DH5 $\alpha$	<i>F<sup>-</sup> gyrA96(Nal<sup>R</sup>) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 (r<sub>km</sub><sup>+</sup>) glnV44 deoRA(lacZYA-argF) U169[Δ80dΔ(lacZ)M15]</i>	ГКПМ- Оболенск
87.	BL21	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>	Novagene
88.	BL21(DE3)/pET32b-Fba-His <sub>6</sub>	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) (DE3)/pET32b-Fba-His<sub>6</sub></i>	НИ
89.	BL21(DE3)/pET32b-HtpG-His <sub>6</sub>	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)/pET32b-HtpG-His<sub>6</sub></i>	НИ
90.	BL21(DE3)/pET32b-MetQ-His <sub>6</sub>	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)/pET32b-MetQ-His<sub>6</sub></i>	НИ
91.	BL21(DE3)/pET32b-GlnA-His <sub>6</sub>	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)/pET32b-GlnA-His<sub>6</sub></i>	НИ

\*НИ – настоящее исследование

## 2.2 Плазмиды

Таблица 2 – Список использованных в работе плазмид

Плазмида	Описание	Цель использования	Источник получения и (или) ссылка на литературу
1	2	3	4
pKD46	<i>bla</i> P <sub>BAD</sub> <i>gam bet exo</i> pSC101 <i>ori</i> TS	плазмида, экспрессирующая $\lambda$ Red рекомбиназу, Amp <sup>R</sup>	[71]
pKD3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1 PS2 <i>ori</i> R6K	RedGam мутагенез, Amp <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	[71]
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>kan</i> FRT PS1 PS2 <i>ori</i> R6K	RedGam мутагенез, Amp <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	[71]
pCP20	<i>bla cat cI857</i> $\lambda$ P <sub>R</sub> <i>flp</i> pSC101 <i>ori</i> TS	Вектор, экспрессирующий Flp-рекомбиназу	[64]
pCVD442	<i>ori</i> R6K <i>mob</i> RP4 <i>bla sacB</i>	суицидный вектор, Amp <sup>R</sup>	[79]
pACYC184	<i>oripA15cat tet</i>	Вектор для клонирования	GenBank X06403
pACYC- <i>metQ</i>	<i>oripA15 cat metQ</i>	Вектор для комплементации	НИ
pET32b(+)	Производное pBR322, f1, содержит T7 промотор, T7 терминатор, полилинкер, <i>lacI</i> , <i>bla</i> , Trx-Tag, His-Tag и S-Tag домены	Экспрессирующий вектор	Novagen
pET32b-HtpG-His <sub>6</sub>	Производное pET32b(+) клонированным геном <i>htpG</i>	с Продукция рекомбинантного белка	НИ
pET32b-MetQ-His <sub>6</sub>	Производное pET32b(+) клонированным геном <i>metQ</i>	с Продукция рекомбинантного белка	НИ
pET32b-GlnA-His <sub>6</sub>	Производное pET32b(+) клонированным геном <i>glnA</i>	с Продукция рекомбинантного белка	НИ
pET32b-Fba-His <sub>6</sub>	Производное pET32b(+) клонированным геном <i>fba</i>	с Продукция рекомбинантного белка	НИ

2.3 Праймеры<sup>a</sup>Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности использованных праймеров<sup>a</sup>

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
1	2
Праймеры, использованные для синтеза кассеты устойчивости к антибиотику, с короткими участками гомологии к ДНК-мишени <i>Y. pestis</i> <sup>b</sup>	
glnA1F	ATGCCTGAACACCATAAATGCAGTAAACACACGGTAATCGTTCCACGACGACGACTATGGGAATTAGCCATGGTCC
glnA1R	GTGTTGGCTGCTTTCGCTCGCCACCTTCCTACACCTTGAAATCTATTA GGTAACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
GlnLG1F	ATGGCAACAGGCACGCTGCCCGATGCTGGGCAGATCCTCAATACTCT CATTAATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
GlnLG1R	CTACTCCATCCCCAACTCTTTCAACTTCCGCGTTAATGTATTACGGCC CCAGCCCATGGGAATTAGCCATGGTCC
HtpG1F	ATGAATATGAAAGGTCAAGAAACCCGTGGATTCCAGTCTGAAGTAAA ACAGCTCCATGGGAATTAGCCATGGTCC
HtpG1R	TTAAGCCGTGAGTAACTGATTCATTCGACGAATAAACTGGTTAGGGT CTTCCAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
MetQ1F	ATGTCTTTAAAATTCAAATCTATCGCAGCAATTAGTGCCTGATTGGTACC TTGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
MetQ1R	TTACCAGCCTTTTACTGCGCCACCGTTGAATGCTTTATTTCGCTGCATCATA AACTATGGGAATTAGCCATGGTCC
Общие тест-праймеры <sup>b</sup>	
k1	CGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGT
k2	GACGACTGAACTCGGTGAGAATGG
c1	TTATACGCAAGGCGACAAGG
c2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG
Локус-специфичные тест-праймеры	
glnA2F	CGGTCGCATCCAGGTAAACG
glnA2R	GCGTTACGGGTGATATTACG
GlnLG2F	ATTTACGTAAACAGGCGCGCAA
GlnLG2R	CTTGATTCTATTGCAACGGAAC
CF-glnA	ACCAACATATGACAAATCCGGGAGATATAAG
CR-glnA	GCTCTCGAGTTAAACGCTGTAATACAGTTC
HtpG2F	CAGTTTGGCGGGCGTTATTT
HtpG2R	TCTGCCTGAGGAATGGTACG
MetQ2F	CACGCATGATCGTCGGCACA
MetQ2R	GAACCCTGACACACCGCTTGT
Праймеры для клонирования	
MetQNdeI	CGCCCGCATATGTCTTTAAAATTCAAATC
MetQSall	TTTGTGACTTACCAGCCTTTTACTGCGCCA
MetQXhoI	AAACTCGAGCCAGCCTTTTACTGCGCCAC

1	2
HtpG-NdeI	GGTGGCATATGAATATGAAAGGTCAAGAAACC
HtpG-XhoI	ATACTCGAGAGCCGTGAGTAACTGATTCATTC
FbaNdeI	GGCATATGTCTAAAATTTTTGATTTTCG
FbaXhoI	GGCTCGAGCAGTA GTCGATGGCGTTCAG
GlnANdeI	ACCAACATATGACAAATCCGGGAGATATAAG
GlnAXhoI	AAACTCGAGAACGCTGTAATACAGTTCGAAC

Примечание:

<sup>a</sup> Праймеры созданы на основе опубликованной полногеномной последовательности штамма *Y. pestis* CO92 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AL590842.1>].

<sup>b</sup> Праймеры, содержащие короткие участки гомологии к ДНК-мишени *Y. pestis*, использованные для синтеза кассеты устойчивости.

<sup>c</sup> Общие тест-праймеры для гена *kan* - k1 и k2, а для гена *cat* - c1 и c2.

## 2.4 Лабораторные животные

В экспериментах использовали нелинейных мышей породы Swiss Webster ( $19 \pm 2$ ) г, а также морских свинок ( $275 \pm 25$ ) 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). Работы выполняли в соответствии с руководством и правилами Евросоюза по обращению, уходу и защите лабораторных животных ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

## 2.5 Среды и условия культивирования

Микроорганизмы выращивали на жидких или плотных питательных средах Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ), ВНИ (Brain Heart Infusion производства NiaMedia, Индия), LB (Luria Bertani broth medium - триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л), pH 7,2 или минимальной среде M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 г/л, NaCl 0,5 г/л, NH<sub>4</sub>Cl 1 г/л, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, глюкоза 0,4%, CaCl<sub>2</sub> 100 mM) pH 7,4. 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. Для выделения ДНК в препаративных количествах клетки чумного микроба выращивали при температуре 28 °С, кишечной палочки - при температуре 37 °С, в течение 18-20 ч на жидких питательных средах в условиях аэрации. Штаммы, дефектные по синтезу глутамина, культивировали на средах с добавлением 20 мМ глутамин (Sigma-Aldrich, USA).

Динамику роста штаммов оценивали при выращивании в трех повторностях в 0,2 мл жидкой питательной среды в 96-луночных планшетах Costar (Corning Incorporated USA) в термостатируемом планшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, USA). Посевная доза составляла  $10^7$  КОЕ/мл. Для определения чувствительности штаммов к высокому содержанию соли в жидкую питательную среду добавляли хлорид натрия до 4 %. Бактериальные суспензии культивировали в течение 24 ч при температурах 28 °С и 37 °С. Оптическую плотность суспензий определяли при длине волны 620 нм.

Для определения выживания чумного микроба в присутствии перекиси водорода препарат серийно разводили в минимальной среде М9 до концентрации 200 мМ, 40,0 мМ, 8,0 мМ и 1,6 мМ. Для определения чувствительности к рН готовили среду М9 с рН 3,5 и рН 7,0 в качестве контроля. В среды добавляли  $10^7$  КОЕ/мл исследуемого штамма и исходного штамма. Бактериальные суспензии инкубировали при температуре 28 °С в течение 10 мин в присутствии  $H_2O_2$ , а также 30 и 60 мин – при разных значениях рН. Выживание оценивали путем высевов разведений культур на чашки с агаром Хоттингера с 1 % гемолизированной кровью.

## 2.6 Определение чувствительности штаммов к бактерицидному действию комплемента

Определение чувствительности к бактерицидному действию комплемента проводили путем сравнительной оценки воздействия нормальной человеческой сыворотки и сыворотки с инактивированным путем нагревания комплементом (тНЧС) на бактериальную взвесь исследуемых штаммов с концентрацией  $10^7$  КОЕ/мл по методу M.G. Barnes *et al* [30].

## 2.7 Генно-инженерные манипуляции

Для выделения ДНК из бактериальных культур использовали комплект реагентов для выделения ДНК из биопроб производства НПФ «Литех». Рестрикционно-лигазные работы выполняли по руководству Т. Maniatis [176]. Использовали ферменты производства НПО «Fermentas» (Lithuania).

Передачу рекомбинантных плазмид в штаммы *E. coli* осуществляли «кальциевым» методом трансформации по S.N. Cohen и A.C.Y. Chang [67], а в клетки *Y. pestis* – методом электростимулируемой трансформации [5], конъюгации [183] и криотрансформации [8].

### 2.7.1 Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси, содержащей 1,5 мМ хлорида магния ( $MgCl_2$ ), смесь дНТФ – по 2,5 мкМ каждого (Fermentas, Литва), по 10 пМ прямого и обратного соответствующих праймеров, 1 единицу Taq-полимеразы (Fermentas, Литва), 10 нг геномной ДНК соответствующего штамма. Реакцию проводили на амплификаторе GeneAmp PCRSystem 2700 (Applied Biosystems, США) в соответствующем режиме: предварительная денатурация ДНК при температуре 94 °С в течение 5 мин; 30 циклов, включающих в себя денатурацию ДНК при температуре 94 °С в течение 30 с; отжиг праймеров в течение 30 с; элонгацию комплементарной цепи ДНК при температуре 72 °С в течение достаточного для данного ампликона времени. После последнего цикла пробирки прогревали в течение 5 мин при температуре 72 °С. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с использованием DNA Extraction Kit (Fermentas UAB, Литва).

### 2.7.2 Клонирование генов в составе экспрессирующего вектора

Клонирование генов осуществляли в составе экспрессирующего вектора pET32b(+) (Novagen). При создании векторных плазмид, содержащих целевые гены, использовали праймеры, указанные в таблице 3. Полученные ПЦР-фрагменты

очищали с использованием DNA Extraction Kit (Fermentas UAB, Литва). Фрагменты ДНК обрабатывали последовательно фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и T4-полинуклеотидкиназой, лигировали "сами на себя", подвергали рестрикции эндонуклеазами NdeI и XhoI, лигировали с обработанным соответствующими рестриктазами и дефосфорилированным вектором pET32b(+). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5 $\alpha$ . Отбор трансформантов проводили по фенотипу Ap<sup>R</sup> на плотной питательной среде LB с ампициллином (100 мкг/мл). Скрининг рекомбинантных плазмид, содержащих фрагмент NdeI-XhoI, осуществляли в ПЦР и с помощью рестрикционного анализа. Далее проводили выделение рекомбинантной плазмидной ДНК из клонов *E. coli* DH5 $\alpha$  и вводили ее в штамм *E. coli* BL21(DE3).

Для индукции синтеза рассматриваемого антигена культуры *E. coli* BL21(DE3), содержащие рекомбинантные плазмиды, выращивали в течение ночи в среде LB с ампициллином (100 мкг/мл). Утром после десятикратного разведения культуру выращивали в 3 мл LB бульона с ампициллином (100 мкг/мл) на качалке при температуре 37 °C в течение 2 ч. Вносили 1 мМ ИПТГ (изопрропил- $\beta$ -D-тиогаллактопиранозид) и проводили индукцию в течение 3,5 ч. Затем 1 мл культуры центрифугировали при 15000  $\times$  g в течение 3,5 мин, удаляли прозрачную надосадочную часть и суспензировали клеточные осадки в 0,5 – 1,0 мл TE буфера. Объем буфера подбирали так, чтобы суспензия клеток соответствовала мутности 10 Ед. по ОСО 42-28-85-2013 (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»), после чего аликвоты объемом 0,03 мл кипятили для получения проб для ДСН-электрофореза.

## 2.8 Анализ белковых препаратов в полиакриамидном геле и методом иммуноблота

Электрофоретический анализ белковых препаратов проводили по Л.А. Остерману [9]. Фракций клеточных белков получали, как описано ранее [194, 194]. Пробы для вертикального электрофореза готовили смешиванием аликвот анализируемых образцов в соотношении 1:1 с буфером, содержащим 125 мМ трис-НС1, рН 6,8, 4 % додецилсульфата натрия (ДСН), 20 % глицерина, 10 % 2-

меркаптоэтанола и 0,02 % бромфенолового синего и нагревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин в микропробирках вместимостью 0,2 мл. Пробы охлаждали в течение 5 мин под током воздуха до полного образования конденсата внутри микропробирок, после чего центрифугировали при скорости вращения  $12000 \times g$  в течение 0,5 мин. Перед нанесением в колодцы концентрирующего геля содержимое каждой пробы тщательно перемешивали. Электрофорез проводили в гелях толщиной 1 мм при силе тока 20 мА на один столбик геля в аппарате «Mini VE, GE Healthcare» при комнатной температуре. Концентрация разделяющего геля составляла 12,5 %, концентрирующего геля – 3,5 %. Предел напряжения составлял 250 В.

Гели окрашивали Кумасси ярко-голубым G-250 в течение 0,5 ч, после чего окрашивающий раствор сливали, гель ополаскивали деионизованной водой и промывали на качалке горячим ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) раствором 7 % уксусной кислоты, содержащим 5 % этанол в течение 15 мин; раствор меняли еще 2 раза при тех же условиях. Отмытый гель заливали деионизованной водой на 5 мин и фотографировали цифровой камерой в проходящем свете.

Дополнительно клоны анализировали методом иммуноблота с использованием меченых пероксидазой хрена моноклональных антител против гексапептида (His)<sub>6</sub>, как описано ранее [272]. Реакцию визуализировали добавлением субстратной смеси (0,05 % раствор диаминобензидина в фосфатно-солевом буфере, рН 7,4, 1 мкл/мл 33 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 мг/мл NiCl<sub>2</sub>).

При наличии целевых белков перед этапом хроматографии определяли их клеточную локализацию. Для этого, микробные клетки из 1 мл культуры осаждали центрифугированием, суспензировали осадки в 0,5 мл ТЕ (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0) буфера и обрабатывали (лизировали) взвесь ультразвуком. Лизаты центрифугировали при  $15000 \times g$  в течение 20 мин, полностью отбирали надосадочную часть, к осадку добавляли 0,5 мл ТЕ буфера, суспензировали и готовили пробы для электрофореза из клеточного лизата, надосадочной фракции лизата и суспензии осадка.

## 2.9 Выделение рекомбинантных белков

Для выделения белков использовали 10 – 12 г влажного осадка клеток, из которого готовили суспензию в буфере следующего состава: 5 мМ имидазол, 500 мМ

NaCl, 20 mM трис, pH 7,9 и охлаждали ее до температуры 4 °C в водно-ледяной бане, после чего подвергали обработке ультразвуком (50 % мощности ультразвукового дезинтегратора «Vandelin Sonopulse») импульсами продолжительностью по 10 сек с равновеликими паузами до тех пор, пока показатель суммарной энергии обработки не составлял 60 кДж. Лизат помещали в центрифужные стаканы и центрифугировали при 14000 об/мин в роторе JA-20 (Beckman) в течение 25 мин при температуре 12 °C. Прозрачную надосадочную фракцию нагревали до комнатной температуры и пропускали через колонку, упакованную Ni<sup>++</sup>-NTA агарозой, предварительно уравновешенную буфером, содержащем 5 mM имидазола. После нанесения образца промывали колонку 5 объемами этого же буфера. Дальнейшие этапы очистки проводили при помощи такого же буфера, в составе которого варьировали концентрацию имидазола, составлявшую, соответственно, 60 mM и 600 mM. Пики «60 mM» и «600 mM» собирали фракциями объемом 5 мл, и немедленно анализировали методом электрофореза. Фракции, в которых находили целевые белки объединяли и диализовали при 4 °C против фосфатно-солевого буфера, диализный буфер меняли 3 раза. Диализаты центрифугировали и анализировали все фракции методом электрофореза. Белки хранили в замороженном виде при температуре – 80 °C в аликвотах по 1 мл.

## 2.10 Биоинформатический анализ

Аминокислотную последовательность белков анализировали с использованием программы BLAST на сайте NCBI. Молекулярную массу белка и теоретическую изоэлектрическую точку (pI) определили, используя блок Edit Seq программного обеспечения DNASTAR (Madison, WI, USA).

## 2.11 Конструирование мутантных штаммов и плазмид для комплементации

Для получения нокаутных мутантов на модели авирулентного штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV НИИЭГ использовали метод одношаговой инактивации путем RedGam мутагенеза [71]. Далее мутантную аллель клонировали в суицидном векторе pCVD442. Сконструированную плазмиду трансформировали в штамм *E. coli* S17( $\lambda$ pir). Донорный

штамм использовали для получения мутантов на модели вирулентных штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* 231, *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica* И-3189. Последующее удаление кассеты устойчивости к антибиотику в инактивированном гене выполняли с помощью вектора pCP20, как описано ранее [71].

Кодирующую последовательность гена *metQ* штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ амплифицировали в ПЦР с помощью праймеров MetQNdeI (5'-ttgatgcatatgaagaactggagaacgct-3') и MetQSalI (5'-ctgtcgcacttattgtggttgccattactac-3') с использованием Phusion HotStart II ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, USA). Ампликон обрабатывали рестриктазами NdeI и SalI и лигировали с обработанной теми же рестриктазами и щелочной фосфатазой SAP плазмидой pACYC-gfp [163]. Полученную плазмиду pACYC-*metQ* трансформировали в штамм *Y. pestis* 231 $\Delta$ *metQ*.

## 2.12 Подтверждение корректности мутаций

В качестве подтверждения корректности мутаций использовали метод ПЦР. Проводили две реакции с использованием фланкирующих локус-специфичных праймеров с соответствующими тест-праймерами (k1, k2, c1 или c2). Третью реакцию для подтверждения отсутствия исходного (не мутантного) фрагмента и присутствия нового фрагмента, специфичного для мутанта, выполняли с фланкирующими локус-специфическими праймерами. Для наглядной визуализации прошедшего мутагенеза контролем служил штамм дикого типа.

## 2.13 Проведение тестикулярных пассажей

Предварительный отбор штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* проводили при подкожном заражении беспородных мышей двухсуточной культурой в дозах  $10^2$  и  $10^3$  КОЕ (по две мыши на дозу). Культуры, выделенные от животных, павших в ранние сроки от меньшей дозы (наблюдение 10 сут) выбрали для проведения последовательных (4 этапа) тестикулярных пассажей на самцах морских свинок со снижением инфицирующей дозы после первых двух этапов с  $10^9$  до  $10^8$  КОЕ. Тестикулярные пассажи проводили под общей анестезией 0,2 % раствором «Рометара» (Bioveta, Чехия), вводимом в объеме 0,5 мл подкожно в паховую складку. Животных,

не погибших на 4-е сутки, гуманно умерщвляли ингаляцией углекислого газа. Животных вскрывали, органы и ткани подвергали бактериологическому исследованию.

#### 2.14 Культивирование штаммов *Y. pestis* в диализных камерах в организме морских свинок

Моделирование процессов жизнедеятельности микроорганизмов в условиях *in vivo* проводили с использованием диализных нитроцеллюлозных мешков (Sigma-Aldrich D9652-100FT) (размер пор 10500 НОММ, ширина 33 мм). Каждый мешок наполняли 5 мл бульона Хоттингера с 1 % БСА, содержащими  $10^7$  КОЕ *Y. pestis* в логарифмической фазе роста.

За сутки в месте оперативного вмешательства выбривали волосяной покров. Имплантацию диализного мешка (максимальный объем помещаемого мешка 10 мл) с культурой штаммов возбудителя чумы в брюшную полость морских свинок проводили под общей анестезией. Беспородных морских свинок в возрасте 5-6 мес анестезировали однократной внутривнутрибрюшинной инъекцией смеси (5:1) рометара (20 мг/мл) и Золитила-100 (100 мг/мл) по 0,75 мл/кг массы тела. Глубину анестезии контролировали отсутствием реакции на болевое раздражение. Животное помещали в положение на спине на стерильную салфетку. Кожу в месте разреза дезинфицировали 10 %-ным раствором Бетадина (Швейцария). При помощи стерильного скальпеля по средней линии живота делали разрез кожи длиной 5 см, отступив ~ 2,5 см ниже ребер, мечевидный отросток использовали в качестве ориентира. Анатомическим пинцетом кожу по обе стороны от разреза подтягивали вверх, фасцию, соединяющая кожу с брюшной стенкой, аккуратно подрезали с помощью скальпеля. Не меняя скальпель, делали небольшой надрез (~ 4 см) в брюшине, используя *linea alba* в качестве ориентира. С помощью анатомического пинцета одну сторону разреза приподнимали и помещали диализную камеру внутрь брюшной полости морской свинки. После сопоставления краев разрез ушивали послойно шовным материалом (кетгут для брюшины и апоневроза, стерилизованная хлопчатобумажная нить для кожи). На 3 сут после имплантации животное умерщвляли путем ингаляции  $\text{CO}_2$ . После дезинфекции кожи 10 %-ным раствором Бетадина (Швейцария) проводили повторный разрез с

помощью стерильных хирургических ножниц, диализный мешок извлекали с помощью пинцета с тупыми концами и помещали в стерильную пластиковую пробирку объемом 50 мл. Содержимое диализного мешка, отобранное путем аспирации с помощью стерильного шприца, использовали для протеомного анализа.

## 2.15 Протеомный анализ

### 2.15.1 Подготовка белковых экстрактов

В микроцентрифужную пробирку вместимостью 2,0 мл вносили 1 мл жидкой культуры. К суспензии добавляли 250 мкл 80 %-ной трихлоруксусной кислоты. Содержимое перемешивали с помощью пипетки и инкубировали 10 мин при температуре 4 °С. После центрифугирования в течение 5 мин при 13000 × g супернатант удаляли с помощью пипетки. Для удаления посторонних примесей к осадку добавляли 1,0 мл 90 %-ного водного раствора ацетона и после тщательного перемешивания с помощью пипетки, центрифугировали пробирку в течение 5 мин при 13000 × g с последующим удалением супернатанта с помощью пипетки. Эту стадию выполняли 2 раза. После двукратной отмывки добавляли 1000 мкл 90 %-ного водного раствора ацетона к осадку и тщательно перемешивали с помощью пипетки. 20 мкл полученной суспензии вносили в 2 мл физ. раствора и передавали на проверку стерильности. Оставшуюся пробу хранили до результатов проверки под ацетоном при температуре - 20 °С.

### 2.15.2 Двумерный гель-электрофорез в неравновесном градиенте рН

Анализ препаратов белка, выделенных из содержимого диализного мешка, осуществляли методом двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте рН (NEPHGE - non-equilibrium pH gradient electrophoresis), как описано ранее [118]. После электрофореза окрашивание гелей проводили в течение 3 ч в растворе Кумасси G-250, а избыток красителя удаляли раствором, состоящим из 7 % уксусной кислоты и 5 % этанола.

### 2.15.3 Цифровые изображений 2D гелей

Гели сканировали при помощи устройства гель-документации Gel Doc XR<sup>+</sup> Gel Documentation System в проходящем свете. Получали цифровые изображения гелей с параметрами: серая шкала, 8 бит, разрешение 300 dpi, линейные размеры 2D гелей точно соответствовали размерам гелей цифровых изображений. Изображения сравнивали с использованием программы InfoQuest™ FP (Bio-Rad) с ручной коррекцией относительно повторяющихся сквозных белковых пятен в разных областях. Выбранные пятна белков идентифицировали на 2D гелях и выкалывали полипропиленовыми одноразовыми пробойниками диаметром 3 мм, помещая кусочки в отдельные микропробирки, содержащие по 2,5 мкл деионизованной воды, плотно закрывали, после чего передавали их для масс-спектрометрического анализа.

### 2.15.4 Масс-спектрометрия

Для проведения масс-спектрометрического анализа использовали прибор Reflex IV MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия) в рефлекс-режиме, используя азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса 9 Нз в режиме положительных ионов. Для увеличения разрешения масс-спектры триптических фрагментов получали при 30–100 накоплениях.

Белки идентифицировали с помощью программного обеспечения Mascot Software (Matrix Science Ltd., London, UK) с параметрами поиска: одно пропущенное расщепление, возможность различных модификаций цистеинов акриламидом и окисления метионинов, и точность определения массы 100 миллионных долей, база данных белковых последовательностей NCBI, таксон *Bacteria (Eubacteria)*.

## 2.16 Иммунизация мышей белковыми препаратами

### 2.16.1 Подготовка препарата для иммунизации мышей

Хроматографические фракции, в которых содержание целевого белка составляло не менее 95 %, диализовали против 10 мМ фосфатно-солевого буферного

раствора (рН 7,2) с трехкратной сменой буфера, центрифугировали при скорости вращения 14000 об/мин в течение 20 мин и температуре 4 °С и повторно анализировали в ДСН-ПААГ. Для приготовления препарата использовали стерильные компоненты – суспензию гидроокиси алюминия, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора (рН 7,2), деионизованную воду и раствор белка. Все компоненты последовательно смешивали с учетом концентраций таким образом, чтобы один стерильный флакон препарата содержал 25 доз. Одна доза включала 10 мкг белка в 0,2 мл суспензии гидроокиси алюминия, содержащей 10 мМ фосфатно-солевого буферного раствора (рН 7,2) и 0,15 М натрия хлористого.

### 2.16.2 Иммунизация животных

Перед иммунизацией мышей белки стерилизовали через фильтры с порами 0,22 м и сорбировали на стерильной гидроокиси алюминия таким образом, чтобы в 0,2 мл суспензии препарата содержалось 10 мкг исследуемого белка. В качестве модельных животных использовали беспородных белых мышей (самцы/самки, 18-20 г). Экспериментальная группа грызунов, предназначенная для вакцинации, включала тридцать произвольно отобранных животных. Животным из экспериментальной группы вводили в область бедра препарат белка в объёме 0,2 мл двукратно подкожно с интервалом в 30 дней. Контрольным грызунам двукратно подкожно вводили 0,2 мл раствора гидроокиси алюминия без белка.

### 2.17 Иммуноферментный анализ

Для сенсibilизации планшет использовали растворы рекомбинантных белков *Y. pestis* 6 мкг/мл 0,1 М карбонат-бикарбонатного буфера (рН 9,6) по 100 мкл в лунку. В случае нерастворимых белковых антигенов сорбцию проводили, как описано ранее [10]. Для блокирования неспецифического связывания использовали 1 % раствор БСА в ФСБ. ФСБ с добавлением твина 20 (0,05 %) использовали для промывания планшет, разведения иммунных сывороток и конъюгата. Сыворотки мышей или морских свинок разводили с шагом 1 : 2. Выявление специфического связывания сенсibilизированных белков с антителами в сыворотках морских свинок проводили с

использованием anti-mouse или anti-guinea pig IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена в разведении 1 : 5000 (Sigma, USA) с последующим окрашиванием раствором хромогена ортофенилендиамина (Sigma, USA) – 0,04 % в 50 мМ цитрат-фосфатном буферном растворе (рН 5,0) в присутствии перекиси водорода – 0,012 %. Развитие окраски прерывали добавлением в лунки по 50 мкл 2,5 М раствора серной кислоты. Фотометрию планшет при 492 нм осуществляли с использованием анализатора Multiskan Labsystems (Финляндия). Титром антител считали величину наибольшего разведения иммунной сыворотки, которой соответствовала ОП, превосходящая контрольное значение на 0,1 единицы, при условии достижения значения ОП не меньше 0,2.

### 2.18 Заражение животных и определение вирулентности штаммов *Y. pestis*

Для получения иммунных сывороток морских свинок заражали подкожно штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 «дикого типа» в дозе 30 КОЕ.

Вирулентность сконструированных мутантов определяли по величине LD<sub>50</sub> по сравнению с исходными высоковирулентными штаммами на модели бубонной формы инфекции у беспородных белых мышей и морских свинок. Бактерии выращивали в течение 48 ч при температуре 28 °С. Заражение проводили введением под кожу бедра десятикратных разведений культуры *Y. pestis* в 0,9 %-ном растворе NaCl в объеме 0,2/0,5 мл на животное. Наблюдение длилось 21 сутки. Погибших и выживших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию.

### 2.19 Статистический анализ

Данные представляли как среднюю арифметическую, рассчитывая стандартную ошибку средней арифметической и доверительный интервал. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием критерия Стьюдента ( $p < 0,05$ ). Статистический анализ проводили, используя Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA), выполняя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Вычисление величин LD<sub>50</sub>, а также доверительных интервалов (для вероятности 95 %) проводили по методу Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Глава 3 ПОИСК ФАКТОРОВ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ *Yersinia pestis* subsp. *microti*

Для поддержания циркуляции в природных очагах возбудителю чумы необходим постоянный процесс размножения в организме восприимчивого хозяина, сопровождающийся преодолением защитных функций иммунитета и бактерицидных систем, обеспечивающим бактериемию, необходимую для дальнейшей передачи патогена через укусы блох следующим хозяевам. Каждый этап данного цикла существования чумного микроба обеспечивается множеством факторов, действующих в комплексе или самостоятельно. Именно совокупность этих факторов поддерживает кругооборот *Y. pestis* в природных очагах чумы [1, 2].

Наибольшее внутривидовое разнообразие, проявляющееся и в избирательной вирулентности отдельных филогенетических групп чумного микроба в отношении различных видов теплокровных животных (включая человека), выявлено в наиболее древних евроазиатских природных очагах чумы, для которых характерно разнообразие грызунов – основных хозяев *Y. pestis*. «Классические» штаммы чумного микроба (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 *Y. pestis*, выделенные из популяций различных видов полевок, и монгольских пищух высоковирулентны для своих основных хозяев и лабораторных мышей, но, как правило, авирулентны для морских свинок и человека. Однако описаны и единичные полевочьи штаммы высоковирулентные для морских свинок [22].

Цель настоящего раздела нашей работы состояла в отборе штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* или субкультур одного штамма, резко отличающихся по вирулентности для морских свинок, для дальнейшего сравнения их протеомов, направленного на поиск факторов избирательной вирулентности.

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

Поиск филогенетически родственных пар штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, отличающихся по вирулентности для морских свинок, осуществляли среди 52-х штаммов 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*.

Не вызывает сомнения факт, что при коллекционном хранении штаммы патогенных бактерий могут утрачивать некоторые фенотипические свойства, описанные при их выделении и идентификации. Прежде всего, это может проявляться в снижении в популяции доли микробных клеток, сохранивших вирулентность на уровне исходного штамма. Поэтому для предварительной оценки вирулентности каждым из штаммов подкожно заражали по четыре беспородные белые мыши (по 2 мыши на дозу  $10^2$  КОЕ и  $10^3$  КОЕ). В дальнейшие эксперименты из групп, где погибли все 4 мыши, брали культуры, выделенные от животных, павших от меньшей дозы в наиболее ранние сроки (время наблюдения 10 сут). Всего было отобрано 17 высоковирулентных для мышей штаммов: bv. *caucasica*: С-290, С-590, С-824, С-537, С-746, С-197, С-267, С-77, С-269; bv. *ulegeica*: И-2422, И-3189, И-3190, И-2239; bv. *xilingolensis* – И-3134, bv. *altaica* – И-3455, bv. *talassica* – А-1820 и bv. *hissarica* – А-513.

Следующим этапом работы была анимализация отобранных штаммов в организме морских свинок. Феномен переживания, впервые обнаруженный Н.Н. Гинсбургом [4] у сибирезвенного микроба, заключается в том, что при подкожном введении в одном шприце смеси вирулентных и авирулентных бактерий, при содержании в смеси первых менее  $1/10^3$ , процесс протекает не как инфекционный, а как вакцинальный, т.е. не сопровождается накоплением вирулентных бактерий. Для решения этой проблемы было решено использовать применяемый для повышения остаточной вирулентности/иммуногенности вакцинного штамма чумного микроба методический подход, заключающийся в последовательных тестикулярных пассажах микробной культуры через организм самцов морских свинок [11]. Известно, что гемато-тестикулярный барьер (ГТБ) препятствует развитию аутоиммунной реакции, т.к. предотвращает проникновение дифференцирующихся половых клеток в кровь и в лимфу [304]. Введенные интратестикулярно вирулентные бактерии способны на

первых этапах размножаться с опережением аттенуированных, накапливаться и вызывать генерализованную инфекцию, т.к. будут защищены ГТБ от иммунной системы хозяина. Пассажи выполняли четырехкратно со снижением инфицирующей дозы с  $10^9$  КОЕ до  $10^8$  КОЕ (Таблица 4). Если животные не гибли в течение 4-х сут, их подвергали эвтаназии. Для последующих пассажей по возможности брали культуры, выделенные из органов (мозг или селезенка), удаленных от места введения. Если не наблюдали генерализации инфекции в течении как минимум двух пассажей проводили эвтаназию, пассажи прекращали (штаммы *bv. caucasica* С-824, С-537, С-746, С-197, С-267, С-77, С-269, *bv. talassica* А-1820, *bv. hissarica* А-513).

У морских свинок при проведении тестикулярных пассажей наблюдали сходную патоморфологическую картину независимо от биоварной принадлежности заражающего штамма. У животных, павших на 1-2 сут после заражения, отмечали увеличение в размерах регионарных лимфатических узлов с геморрагической инфильтрацией; увеличение в размерах и полнокровие печени и селезенки. При гибели животных на 3-4 сут или при эвтаназии на 4 сут преобладали некротические изменения внутренних органов.

Анализ данных о способности культур чумного микроба вызывать после тестикулярного введения генерализацию инфекции и гибель морских свинок, а также тяжести патоморфологических изменений при чумной инфекции послужили основой для выбора штаммов для дальнейших исследований.

Штаммы *bv. ulegeica* И-2422, И-2239, И-3189 и *bv. caucasica* С-290, С-824, С-590, вызывавшие после тестикулярных заражений гибель морских свинок на 1-4 сут, были отобраны как потенциально высоковирулентные для сравнительного определения величин  $LD_{50}$ . Остальные штаммы, требующие эвтаназии животных при пассировании, остались авирулентными для морских свинок.

Таблица 4 – Высеваемость культур *Y. pestis* subsp. *microti* из внутренних органов морских свинок при тестикулярных пассажах

bv.		ulegeica				caucasica									xilingolensis	altaica	talassica	hissarica
штамм		И- 2422	И- 3189	И- 3190	И- 2239	С- 290	С- 590	С- 824	С- 537	С- 746	С- 197	С- 267	С- 77	С- 269	И-3134	И- 3455	А-1820	А-513
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
I пассаж	семенник	+/+	+/+	+/+	+/+	+	+	+	+	+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+	-
	л/у	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	НД*	НД	-	+
	кровь	+	-	+	+	+	+	+	+	НД	+	+	-	-	+	+	+	+
	печень	+	-	+	+	+	+	+	+	НД	+	+	+	-	НД	НД	+	+
	селезенка	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+/+	+/+	+	+
	мозг	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
II пассаж	семенник	±	+/+	+/+	-	+	+	+	+	+	+/+	+/+	+/+	+/+	±	±	+	+
	л/у	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	±	+	-
	кровь	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	±	±	+
	печень	+/+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	селезенка	+/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/+	-	+	+	+	+
	мозг	-	+	-	±/+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Продолжение Таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
III пассаж	семенник	+	+/+	+	+/+	+	+								+	+	-	
	л/у	+	+	+	+	+	+								±	+	-	
	кровь	+	+	+	+	+	+								+	+	-	
	печень	+	+	+	+	+	+								+	+	-	
	селезенка	+	+	+	+	+	+								-/+	+/+	-	
	мозг	-	+	-	+	+	+								-/+	-	-/-	
IV пассаж	семенник	+	+/+	+/	+	+	+								±	+		
	л/у	+	+	+	+	+	+								±	+		
	кровь	+	+	-	+	+	+								+	-		
	печень	+	+	-	+	+	+								+	+		
	селезенка	+	+	+	+	+	-								+	+		
	мозг	-	+	+	+	+	-								+	-		

Примечание: + - есть рост; - - рост отсутствует; ± - специфический рост, загрязненный посторонней микрофлорой; зеленым цветом обозначены высевы из животных, павших в результате пассажа культуры; серым цветом обозначены штаммы, пассажи которых прекратили в связи с отсутствием генерализации инфекции; \* НД - посев органа не осуществляли.

Величины LD<sub>50</sub> при подкожном заражении мышей для всех штаммов не превышали 10 КОЕ, а для морских свинок оказались вирулентными при подкожном заражении только субкультуры штаммов И-3189 (LD<sub>50</sub> = 68 (17-271) КОЕ) и И-2239 (LD<sub>50</sub> = 2 (1-9) КОЕ). Величины LD<sub>50</sub> всех остальных субкультур штаммов, подвергнутых тестикулярным пассажам, превышали максимальную из использованных для подкожного заражения морских свинок дозу – 10<sup>6</sup> КОЕ. Таким образом, прямая корреляция между способностью вызывать генерализованный инфекционный процесс (гибель) при тестикулярном и подкожном заражении морских свинок отсутствовала, но при тестикулярном пассировании в культуре бактерий было возможно накопление субпопуляции клеток, обладающей высокой вирулентностью и при подкожном заражении морских свинок.

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 успешно применен для дифференциации бактериальных культур чумного микроба по степени их избирательной вирулентности.

Сравнительный анализ полученных данных привел нас к убеждению в том, что при поиске потенциальных молекулярных мишеней для профилактики и лечения чумы лучше подвергать сравнительному исследованию изогенные пары «полевочьих» штаммов, первый из которых изначально авирулентен для морских свинок, а второй – субклон первого, повысивший после серийных пассажей на этом виде животных вирулентность до уровня, свойственного штаммам с «универсальной» вирулентностью. В этом случае придется анализировать минимальное количество отличий в геномах/протеомах/транскриптомах изогенных культур. Попытки использовать для сравнения не только *Y. pseudotuberculosis* O:1b 43-го MLST-типа или какой-либо из штаммов возбудителя чумы с универсальной вирулентностью, но и даже неизогенный штамм того же биовара представляются контрпродуктивными, так как у них слишком много отличий.

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

Для поиска новых детерминант вирулентности исследователи наиболее часто пытаются манипулировать условиями выращивания микроорганизмов *in vitro*, воспроизводя условия попадания бактерии в организм млекопитающего, например, повышая температуру культивирования и/или изменяя осмомолярность, ограничивая доступность железа, добавляя сыворотку крови. Однако выращивание чумного микроба на питательных средах *in vitro* даже с искусственным воспроизведением условий *in vivo* не может полностью отразить изменений, происходящих при попадании бактерии в организм теплокровного хозяина. Поэтому для характеристики изменений, проходящих с чумным микробом при адаптации к организму теплокровного хозяина мы использовали диализные камеры, имплантированные в перитонеальные полости морских свинок. Данный подход был разработан для изучения изменений, происходящих с возбудителем болезни Лайма – *B. burgdorferi* в организме млекопитающих [15, 54] и затем адаптирован для *Listeria interrogans* sv. *Copenhageni* [103, 185]. Малый размер пор диализной мембраны (8000 Да) позволяет питательным веществам из организма хозяина проникать внутрь камеры, но препятствует попаданию в камеры антител и эффекторных клеток иммунной системы и их прямому контакту с бактериями.

Первоначально изучили выживаемость и способность к размножению в диализных камерах, имплантированных в брюшные полости морских свинок, вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Диализные камеры, содержащие двусуточную культуру в 10 мл бульона Хоттингера с 1 % бычьего сывороточного альбумина, имплантировали двум морским свинкам. Спустя 2 сут, когда камеры удалили, отметили, что ни одна из них не вызвала очевидной воспалительной реакции в брюшной полости животных. Высев содержимого диализных камер показал увеличение значения КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в среднем на два порядка.

После этого в условиях BSL-3 провели эксперименты по внутрибрюшному культивированию двух субкультур (исходной аттенуированной и производной, повысившей вирулентность после тестикулярных пассажей) каждого из штаммов *Y. pestis* bv. *ulegeica* (И-3189 и И-2239) в диализных камерах. Диализный мешок,

содержащий  $\sim 10^7$  КОЕ двухсуточной культуры *Y. pestis* в 10 мл бульона Хотингера, помещали в брюшную полость трем морским свинкам (Рисунок 2).

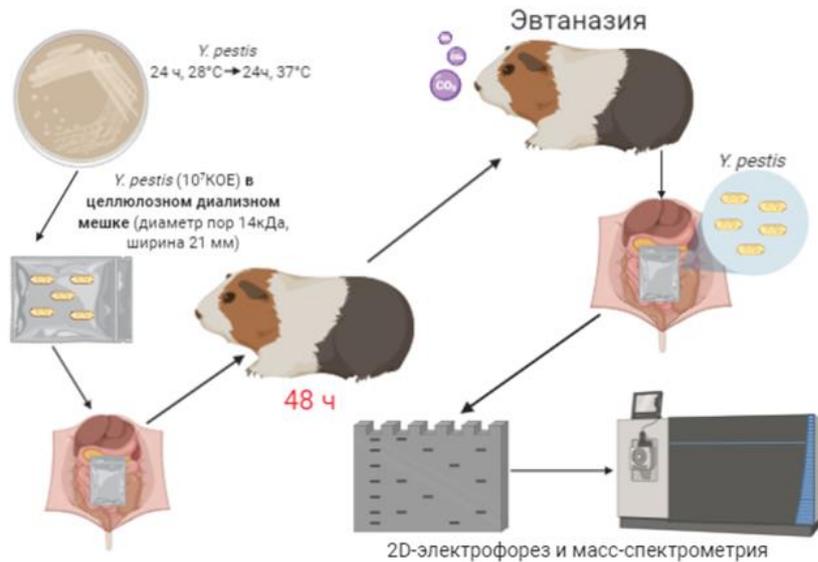


Рисунок 2 – Культивирование субкультур *Y. pestis* в диализных камерах в организме морских свинок для протеомного анализа

После имплантации мешка разрез ушивали. Спустя 2 дня диализный мешок извлекали, а его содержимое отбирали путем аспирации с помощью стерильного шприца и использовали для выделения белков, разделения их методом двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте рН и масс-спектрометрии отличающихся белковых пятен.

Проведенный высев содержимого диализной камеры подтвердил чистоту культуры штаммов *Y. pestis* bv. ulegeica И-3189 и И-2239 и продемонстрировал рост средней концентрации микробных суспензий приблизительно на два порядка (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнение штаммов *Y. pestis* bv. *ulegeica*; высев из диализных камер до и после инкубации в брюшной полости морских свинок

Штамм	Вариант	Средняя концентрация микробной суспензии (КОЕ/мл)	
		исходная	после инкубации
И-3189	Исходная	$0,65 \times 10^7$	$1,3 \times 10^9$
	После пассажей	$0,30 \times 10^7$	$1,8 \times 10^9$
И-2239	Исходная	$0,94 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$
	После пассажей	$0,80 \times 10^7$	$1,2 \times 10^9$

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

Высокоразрешающий двумерный электрофорез лежит в основе протеомных технологий, позволяющих идентифицировать и характеризовать белки микроорганизмов. Качество исследуемого образца, наряду с градиентом pH, обеспечивает высокое разрешение двумерных гелей и воспроизводимость результатов протеомного анализа [288]. Для получения таких образцов используют традиционные реагенты, осаждающие белки, например, трихлоруксусную кислоту, аммоний сернокислый. Загрязнение полученных белковых препаратов липополисахаридными и липидными компонентами клеточных лизатов микроорганизмов ухудшает разделение белков по изоэлектрическим точкам и по молекулярным массам. Уменьшить количество нежелательных примесей позволяет обработка образцов органическими растворителями [212-215]. Одновременное использование растворов трихлоруксусной кислоты и органических растворителей в высокой концентрации обеспечивает полноту осаждения белков и инактивирует бактериальные клетки, что важно учитывать при работе с возбудителями I-II группы патогенности.

### 3.3.1 Сравнительный протеомный анализ изучаемых пар культур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* И-2422 и И-3189, культивированных *in vitro*

В настоящем разделе работы описаны эксперименты по определению обеззараживающего действия химических реагентов, используемых при получении белковых препаратов из выращенных на плотных питательных средах вирулентных штаммов *Y. pestis*, и приведены данные по получению и контролю безопасных образцов, пригодных после разделения путем двумерного электрофореза для дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

После инкубации микробной суспензии в течение 10 мин в 15 %-ном растворе трихлоруксусной кислоты препарат достигал полной стерильности. После 7 сут на плотной и полужидкой питательных средах с высевами инактивированных белковых препаратов рост штаммов *Y. pestis* И-2422 и И-3189 отсутствовал. При этом на питательных средах с посевами неинактивированных микробных суспензий специфический рост *Y. pestis* присутствовал (Таблица 6). Постановка биопробы показала безвредность белковых препаратов *Y. pestis* И-2422 и И-3189 для лабораторных мышей. Признаков заболевания на протяжении срока наблюдения не было выявлено.

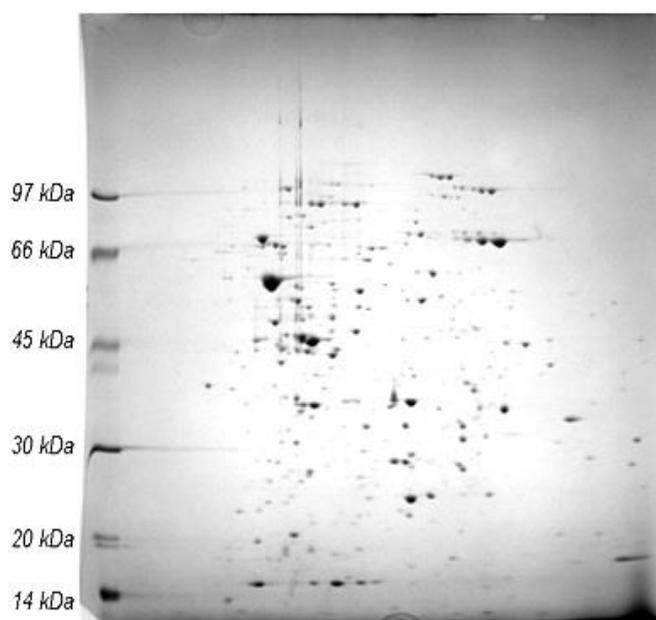
Таблица 6 – Контроль стерильности препаратов белков *Y. pestis* И-2422 и И-3189 посевом на питательные среды

Препарат/ штамм	Бактериальный рост, (КОЕ)									
	агар Хоттингера с 2 %-ной гемолизированной кровью					полужидкая тиогликолевая среда				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Неинактивированный / <i>Y. pestis</i> И-2422	81	99	102	96	83	+	+	+	+	+
Неинактивированный / <i>Y. pestis</i> И-3189	83	79	92	111	89	+	+	+	+	+
Инактивированный / <i>Y. pestis</i> И-2422	0	0	0	0	0	–	–	–	–	–
Инактивированный / <i>Y. pestis</i> И-3189	0	0	0	0	0	–	–	–	–	–

«+» - наличие роста; «–» - отсутствие роста.

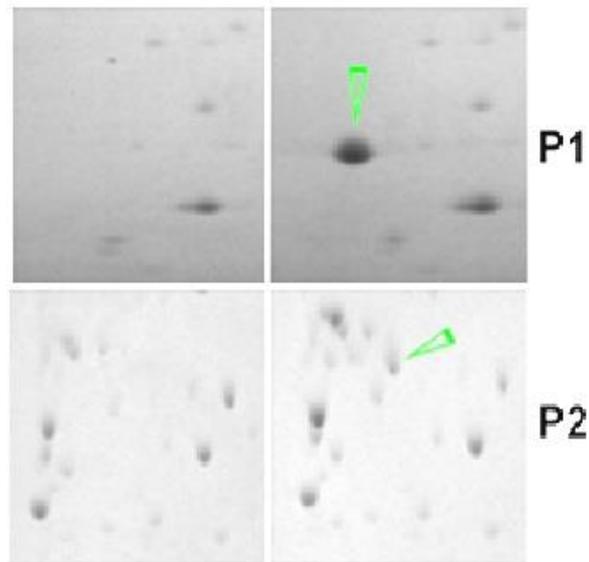
Белковые осадки после обеззараживания растворяли в буфере с детергентами и мочевиной. Для изофокусирования белков использовали капиллярные трубки с внутренним диаметром 1,5 мм и допустимой нагрузкой до 40 мкг белка на столбик геля для сохранения разрешающей способности. Как и для капилляров с гелями, несущими иммобилизованный градиент pH [118], увеличение нагрузки приводило к затруднениям при извлечении гелей.

При анализе двумерной электрофореграммы белков из штамма *Y. pestis* И-2422 (Рисунок 3) обнаружили репрезентативность образца и высокую степень разделения белков наряду с полным отсутствием «шлейфов», обусловленных примесью ЛПС. При сравнительном анализе электрофореграмм двух штаммов *Y. pestis* И-2422, не содержащего плазмиду pFra, и И-3189, содержащего данную плазмиду, с последующим масс-спектрометрическим определением природы пятен на различающихся участках геля, подтвердили приемлимость использования метода обеззараживания проб раствором трихлоруксусной кислоты для двумерного электрофореза (Рисунок 4, Таблица 7). Штамм *Y. pestis* И-3189 pFra<sup>+</sup> показал ожидаемое наличие белков: Caf1 и Ymt (мышинный токсин, фосфолипаза D).



Размеры маркера молекулярных масс LMW 170446-01 (Amersham Pharmacia, USA) обозначены слева от рисунка.

Рисунок 3 – Двумерный гель-электрофорез белков штамма *Y. pestis* И-2422



Белки P1 и P2 обозначены зелеными стрелками

Рисунок 4 – Отличающиеся по экспрессии белков фрагменты электрофореграмм штаммов *Y. pestis* И-2422 (левый столбец) и И-3189 (правый столбец)

Таблица 7 – Данные по масс-спектрометрии фрагментов 2D геля штамма *Y. pestis* И-3189

Обозначение белка	Молекулярная масса*, кДа	Данные, полученные в результате анализа аминокислотной последовательности белка (NCBI)			
		Молекулярная масса, кДа	Изоэлектрическая точка, pI	Название	% гомологии (MASCOT Search Results)
P1	18,1	15,6	4,4	CafI	91,3
P2	60,4	67,5	5,5	Фосфолипаза D	46,0

\* рассчитана по результатам ДСН-ПААГ

Предложенный метод получения белковых препаратов из штаммов чумного микроба обеспечивает их стерильность. Полученные белковые препараты могут быть использованы для анализа экспрессии белков штаммов *Y. pestis* с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии.

### 3.3.2 Сравнительный протеомный анализ изучаемых пар культур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, культивированных *in vivo*

Сравнительный анализ протеомов субкультур штаммов subsp. *microti* И-3189 и И-2239, принципиально отличающихся по вирулентности для морских свинок, культивированных *in vivo* в диализных камерах, методом двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте рН показал появление шести новых белковых пятен и исчезновение одного (бактериоцин – пестицин) у вирулентных для свинок субкультур по сравнению с авирулентными (Рисунок 5). Масс спектрометрия позволила идентифицировать эти белки. Среди них молекулярный шаперон, синтетаза одной из аминокислот, альдолаза, субстрат-связывающий белок и др. Уверенно читалось пятно, соответствующее по данным масс-спектрометрии глутаминсинтетазе, продукция которой увеличивалась примерно в 17-20 раз. Белок был представлен на 2D гелях в виде дублетов близкорасположенных пятен, обладающих одинаковыми молекулярными массами, но разными изоточками. Кроме того, в вирулентных культурах отметили увеличение в 5-7 раз продукции капсульного антигена Caf1. Проведенный поиск в PubMed показал, что у ряда патогенных бактерий эти белки связаны с вирулентностью:

1) WP\_050548832.1, молекулярный шаперон - белок теплового шока (Bacterial Stress-Responsive Hsp90 Chaperone (HtpG)) относится к классу функционально сходных белков, экспрессия которых усиливается при повышении температуры или при других стрессирующих клетку условиях. HtpG необходим для: продукции ряда факторов патогенности кишечной палочки [101], персистенции *Salmonella Typhimurium* в кишечнике свиней [279], вирулентности *Leptospira interrogans* [143] и патогенности *Edwardsiella tarda* [69].

2) EIR69411.1, глутаминсинтетаза. Наличие этого фермента необходимо для вирулентности *Leptospira interrogans* [305], *Streptococcus suis* [298], *Mycobacterium bovis* [57] и др.

3, 4) WP\_002209962.1, две изоформы фруктозо-бисфосфат альдолазы, необходимой для вирулентности *M. tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* и *Candida albicans* [249].

5) WP\_038931127.1, субстрат-связывающий белок MetQ ABC транспортера метионина. Метаболизм метионина связан с вирулентностью у *S. pneumoniae* [33].

6) WP\_016599821.1, гипотетический белок.

Интересно, что как минимум часть из этих белков относят к полифункциональным белкам "лунного света" (глутаминсинтетаза, фруктозо-бисфосфат альдолаза), функционирующим как в цитоплазме, так и на поверхности клетки [283, 284].



1 – молекулярный шаперон htpG [*Y. pestis*]; 2 – глутаминсинтетаза тип 1 [*Y. pestis* PY-25]; 3 – гипотетический белок [*Y. pestis*]; 4 – фруктозо-бисфосфат альдолаза [*Yersinia*];  
5 – субстрат-связывающий белок MetQ [*Y. pestis*]

Рисунок 5 – Двумерный электрофорез вирулентной для морской свинки субкультуры *Y. pestis*

Очевидно, что должны быть отличия в спектрах белков, синтезируемых патогеном в имплантированной диализной камере и при непосредственном контакте с тканями инфицированного хозяина. Тем не менее, данная модель гораздо ближе к условиям пребывания *Y. pestis* в организме инфицированного хозяина, чем культивирование на искусственных питательных средах. Казалось бы, выявленные ферменты аминокислотного обмена далеки от общепринятых представлений о

факторах патогенности, однако все большее количество публикаций свидетельствует о связи вирулентности патогенов с особенностями метаболизма как хозяина, так и паразита [130, 219, 240], а классические работы по микробиологии чумы [35, 50, 51, 80] подтверждают это.

### 3.4 Заключение по главе 3

В ходе выполнения настоящего раздела исследования мы показали, что при поиске факторов избирательной вирулентности «полевочьих» штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* целесообразно подвергать сравнительному исследованию изогенные пары субкультур одного штамма, первая из которых изначально авирулентна для морских свинок, а вторая – субклон первой, повысивший после серийных тестикулярных пассажей на этом виде животных вирулентность до уровня, свойственного штаммам *Y. pestis* subsp. *pestis*. В этом случае придется анализировать минимальное количество отличий в геномах/протеомах/транскриптомах изогенных культур. В ходе выполнения работы удалось отобрать для дальнейшего сравнения их протеомов по две субкультуры двух штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, субкультуры которых, резко отличались по вирулентности для морских свинок при подкожном заражении. Для воспроизведения изменений, происходящих при попадании возбудителя чумы в организм теплокровного хозяина, предложили метод культивирования бактерий в перитонеальной полости морских свинок в камерах из диализной мембраны. После этого в условиях BSL-3 провели эксперименты по внутрибрюшинному культивированию двух субкультур (исходной и после тестикулярных пассажей) каждого из штаммов *Y. pestis* bv. *ulegeica* (И-3189 и И-2239) в диализных камерах. Сравнительный анализ протеомов субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, принципиально отличающихся по вирулентности для морских свинок, методом высокоразрешающего двумерного электрофореза позволил выявить изменение уровня продукции нескольких белков, которые были затем идентифицированы методом масс-спектрометрии. Однако только нокаутный мутагенез генов, кодирующий синтез данных белков, с последующей комплементацией, может пролить свет на вклад данных молекул в патогенез и иммуногенез чумы. Полученные результаты послужили основой для следующего этапа наших исследований,

посвященного получению и фенотипической характеристике штаммов чумного микроба, дефектных по Fba, GlnA, MetQ и HtpG, что должно было подтвердить или опровергнуть их роль в «избирательной» вирулентности «полевочьих» штаммов чумного микроба.

## Глава 4. ПОЛУЧЕНИЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОКАУТНЫХ МУТАНТОВ *Yersinia pestis*

### 4.1 HtpG<sup>-</sup> штаммы *Y. pestis*

Hsp90 (heat shock protein 90 - *hsp90*) – молекулярный шаперон, необходимый для поддержания, активации, стабилизации или созревания белков, экспрессия которого усиливается при повышении температуры или других стрессирующих клетку условиях окружающей среды. Hsp90 обладает АТФ-азной активностью и вовлечен в различные клеточные процессы, в том числе фолдинг белков, передачу сигналов и пролиферацию клеток [282]. Установлено, что HtpG прокариот кодирует гомолог белка теплового шока 90 эукариот [28]. Показано, что гены, кодирующие белки теплового шока, индуцируются на поздних стадиях течения инфекционного процесса, что отражает роль кодируемых продуктов в защите бактерий от стрессовых факторов и защитных механизмов, а именно оксидативного стресса, кислых значений рН, дефензинов или бактерицидной активности сыворотки [104], устойчивость к которым необходима патогенному микроорганизму для выживания в организме хозяина. Hsp90 эукариот – белок, необходимый для жизнеспособности клеток [97] и играющий множество функций в фолдинге белков наряду с растущим числом кошаперонов [282]. С другой стороны, у бактерий утрата HtpG может не оказывать губительного влияния на клетку. HtpG<sup>-</sup> фенотип может варьировать от небольших дефектов в росте культуры при повышенной температуре и/или устойчивости к холодовому шоку до чувствительности к оксидативному стрессу [65, 69, 263]. Установлено, что HtpG необходим для продукции ряда факторов патогенности *E. coli* [101], персистенции *Salmonella Typhimurium* в кишечнике свиней [279], а также играет важную роль в патогенезе инфекций, вызываемых *Francisella tularensis* [287], *Leptospira interrogans* [144] и *Edwardsiella tarda* [69].

Цель настоящего этапа работы - сконструировать  $\Delta htpG$  мутанты *Y. pestis* и провести сравнительную оценку вирулентности изогенных штаммов *Y. pestis*,

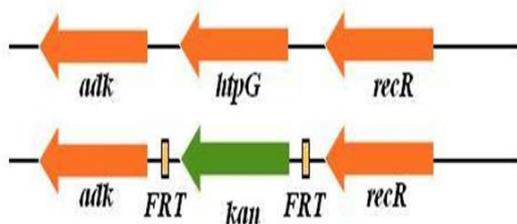
отличающихся по способности синтезировать HtpG, при подкожном способе заражения двух видов лабораторных животных.

#### 4.1.1 Биоинформатический анализ *htpG*

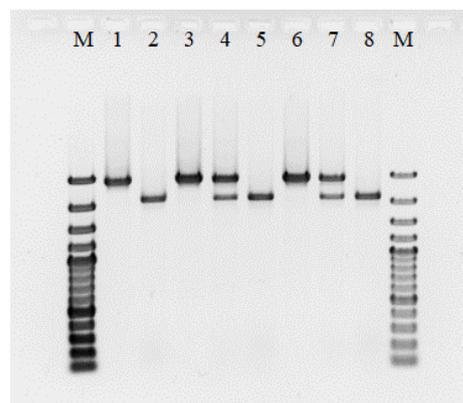
Открытая рамка считывания *htpG* (YPO3119 у *Y. pestis* CO92) длиной 1869 п.о. кодирует белок HtpG, состоящий из 622 аминокислотных остатков. HtpG *Y. pestis* предположительно имеет молекулярную массу 70,8 кДа и pI = 5,03. Внутри вида *Y. pestis* белок высоко консервативен – BLASTp показал 100 % гомологию у штаммов различных биоваров чумного микроба. Гомология с белком HtpG энтеропатогенных иерсиний составила 99 % для *Y. pseudotuberculosis* (WP\_106464413.1) и 96 % для *Y. enterocolitica* (WP\_072089333.1). Кроме того, BLASTp анализ HtpG выявил, что белок обладает значительным подобием с остальными HtpG и Hsp90 белками. Предположительно, АТФ-азный домен локализован на N-конце белка, где присутствуют 14 консервативных остатков, необходимых для связывания АТФ (E34, N38, D41, L78, D80, G82, G84, M85, G124, V125, G126, F127, V139, T141), в том числе два G-X-G мотива (82GIG84 и 124GVG126) [69, 221]. Кроме того, HtpG *Y. pestis* структурно гомологичен C-концевому региону белков семейства HtpG (остатки 186–622).

#### 4.1.2 Конструирование HtpG<sup>-</sup> варианта штаммов *Y. pestis*

Методом одноэтапной инактивации хромосомных генов с помощью ПЦР-продуктов [71] на основе вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ был получен мутант, в котором кодирующую последовательность гена *htpG* заменили на кассету устойчивости к хлорамфениколу (Рисунок 6). После введения методом электропорации 100 нг ПЦР-продукта, представляющего собой ген *cat*, ограниченный FRT сайтами и фланкированный с двух сторон короткими участками гомологии (55 п.н.) гена *htpG*, в штамм *Y. pestis* EV/pKD46, содержащий хелперную плазмиду pKD46, получили 11 Cm<sup>R</sup>Ap<sup>R</sup> колоний.



А



Б

Б: 2 – *Y. pestis* EV $\Delta$ *htpG*::*cat* (мутантная аллель, размер ампликона 2198 п.н.); 3 – исходный штамм *Y. pestis* EV («дикая» аллель, размер ампликона 2882 п.н.); 4 – *Y. pestis* 231 $\Delta$ *htpG*::*cat*; 5 – 231/pCVD442 $\Delta$ *htpG*::*cat* (мерозигота); 6 – исходный штамм *Y. pestis* 231 $\Delta$ *htpG*::*cat*; 7 – *Y. pestis* И-3189 $\Delta$ *htpG*::*cat*; 8 – И-3189/pCVD442 $\Delta$ *htpG*::*cat* (мерозигота); 9 – исходный штамм *Y. pestis* И-3189 $\Delta$ *htpG*::*cat*; М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Рисунок 6 – Схема конструирования HtpG<sup>-</sup> варианта штамма *Y. pestis* (А) и скрининг мутантных клонов в ПЦР с праймерами HtpG2F и HtpG2R (Б)

ПЦР верификация с использованием локус-специфичных праймеров показала, что все полученные Cm<sup>R</sup>Ap<sup>R</sup> колонии (Рисунок 6Б) содержат вставку кассеты устойчивости к антибиотику и локус-специфичный фрагмент ожидаемой длины (2198 п.н. в мутантном штамме по сравнению с 2882 п.н. в штамме «дикого» типа).

Для получения мутантов с инактивированным геном *htpG* на модели вирулентных штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 и *Y. pestis* bv. *ulegeica* И-3189 в качестве донора использовали сконструированный нами штамм *E. coli* S17-1  $\lambda$ *pir*/pCVD442 $\Delta$ *htpG*::*cat*. На первом этапе аллельного обмена отбирали штаммы-реципиенты *Y. pestis* 231 и И-3189 с интегрированной в хромосому плазмидой pCVD442 $\Delta$ *htpG*::*cat* путем посева на питательную среду, содержащую хлорамфеникол (20 мкг/мл) и полимиксин В (50 мкг/мл) элиминации донорного штамма *E. coli* S17-1  $\lambda$ *pir*/pCVD442 $\Delta$ *htpG*::*cat*. На втором этапе рекомбинации удаление интегрированной плазмиды проводили в присутствии 5 % сахарозы [79]. Полученные колонии с

фенотипами  $Suc^R Cm^R Ap^S$  отбирали, наличие вставки определяли методом ПЦР (Рисунок 6).

Таким образом, проведенный сайт-направленный мутагенез гена *htpG* в вакцинном штамме EV НИИЭГ, а также в вирулентных штаммах *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 и bv. *ulegeica* И-3189 позволил получить мутанты  $EV\Delta htpG$ ,  $231\Delta htpG$ , И-3189 $\Delta htpG$ .

#### 4.1.3 Эффект делеции *htpG* на рост мутантного штамма, устойчивость к оксидативному и осмотическому стрессу

HtpG – высоко консервативный молекулярный шаперон, обнаруживаемый у всех бактерий и участвующий в фолдинге белков в условиях стресса [20]. Утрата белка может оказывать различные эффекты на бактериальные клетки, в том числе приводить к дефектам роста при высоких температурах и повышению чувствительности к оксидативному стрессу [69, 113, 263]. Для определения потенциальной функции HtpG в ходе повышения температуры культивирования, оксидативного и осмотического стресса, определили рост и выживание мутантных штаммов в данных условиях. Согласно полученным результатам при температуре культивирования 28 °C профиль роста исходного и мутантного штамма совпадали. Повышение температуры выращивания до 37 °C приводило к запаздыванию скорости роста мутантного штамма в позднюю логарифмическую и стационарную фазу по сравнению с исходным (Рисунок 7А).

Осмотический стресс является одним из условий, к которым бактерии должны адаптироваться в ходе инфекционного процесса. Установлено, что экспрессия молекулярных шаперонов, отвечающих за синтез белков теплового шока, растет при осмотическом шоке [113].

Исходный и мутантный штаммы выращивали в условиях нормальной (0,5 % NaCl) и повышенной осмомолярности (4 % NaCl). Различий в скорости роста при 4 % NaCl в среде культивирования не наблюдали, что говорит об отсутствии чувствительности мутантного штамма к осмотическому стрессу (рисунок 7Б).

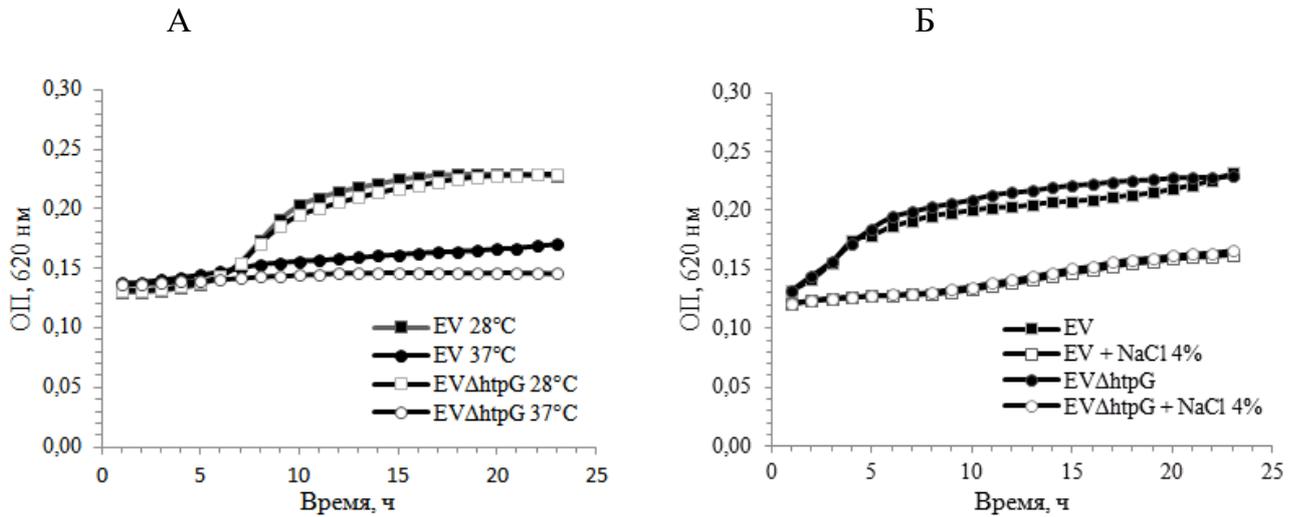


Рисунок 7 – Рост штамма «дикого» типа и мутанта *EVΔhtpG* *in vitro*: А – при температурах 28 °С и 37 °С; Б - в условиях нормальной (0,5 % NaCl) и повышенной (4 % NaCl) осмомолярности

При анализе выживания в присутствии  $H_2O_2$  (40 mM) установили снижение жизнеспособности мутантного штамма *EVΔhtpG* (86,3 %) по сравнению с исходным штаммом *EV* (95,2 %) ( $p < 0,001$ ). Число бактерий исходного и мутантного штаммов, переживших инкубацию в среде при pH 3,5 не отличалось (Таблица 4).

Таблица 4 – Чувствительность экспериментальных штаммов к перекиси водорода и pH среды

Штамм	Число живых бактерий (lg КОЕ/мл) после 1 ч инкубации в $H_2O_2$				Число живых бактерий (lg КОЕ /мл) после инкубации при pH		
	40 mM	8 mM	1,6 mM	0 mM	7	3,5 (30 мин)	3,5 (60 мин)
<i>EV</i>	7,573	7,827	7,840	7,955	7,955	7,733	7,470
<i>EVΔhtpG</i>	6,746	7,662	7,681	7,816	7,816	7,595	7,294

#### 4.1.4 Устойчивость к нормальной человеческой сыворотке

Система комплемента является одним из ключевых факторов врожденного иммунитета хозяина. Ранее мы показали, что штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* устойчивы к действию комплемента [21]. Согласно полученным результатам клетки исходного штамма *Y. pestis* 231, выращенные при температуре 25 °С, переживали действие комплемента 80 % НЧС. Инкубация в течение 1 ч в 80 %-ной НЧС штамма 231 с делектированным геном *htpG* так же не приводила к достоверному снижению числа жизнеспособных микробных клеток ( $\lg 6,24 \pm 0,56$  КОЕ) по сравнению с инкубацией в тНЧС ( $\lg 6,5 \pm 0,15$  КОЕ).

#### 4.1.5 Эффект делеции *htpG* на вирулентность для мышей и морских свинок

Сравнительная оценка вирулентности исследуемых штаммов *Y. pestis* для беспородных мышей при подкожном способе заражения не выявила достоверных различий в величинах LD<sub>50</sub> штаммов "дикого" типа, а также всех сконструированных нами HtpG<sup>-</sup> вариантов (таблица 5). Средние сроки жизни мышей, погибших в результате заражения штаммами 231 и И-3189 или их изогенными производными, достоверно не отличались (Рисунок 8, Таблица 5).

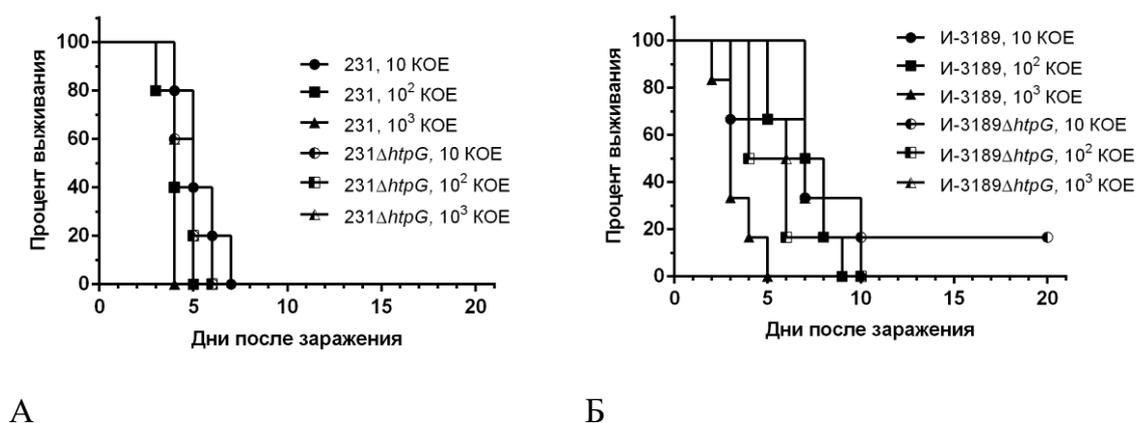


Рисунок 8 – Выживаемость беспородных мышей после подкожного заражения экспериментальными штаммами: А – *Y. pestis* 231 и 231Δ*htpG*; Б – *Y. pestis* И-3189 и И-3189Δ*htpG*

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

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

Выживаемость морских свинок после подкожного введения 10<sup>2</sup> КОЕ тестируемых культур чумного микроба составила 66 % для исходного штамма *Y. pestis* 231 против 50 % у его делеционного мутанта и 33 % для исходного штамма *Y. pestis* И-3189 против 50 % у его делеционного мутанта. При введении 10<sup>6</sup> КОЕ всех исходных и мутантных штаммов не выжила ни одна морская свинка.

Взаимосвязь между HtpG и патогенностью бактерий остается, в большей степени, не охарактеризованной. У прокариот гомологи HtpG идентифицировали у большого числа бактериальных видов и, в противоположность белку Hsp90 эукариот, делеция *htpG* не всегда летальна [28, 243]. У *E. coli* и *Actinobacillus actinomycetemcomitans* делеция *htpG* ведет к появлению дефектов роста при повышенных, но не при низких температурах [265, 292], при этом у цианобактерий мутация в гене *htpG* ведет к снижению устойчивости к изменению температуры культивирования [85, 121, 263]. В нашем исследовании мы обнаружили, что по сравнению со штаммом «дикого» типа мутант проявлял незначительное снижение скорости роста в позднюю логарифмическую и стационарную фазу и что его способность переживать и расти в присутствии 40 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> была снижена,

подтверждая, что у чумного микроба HtpG вовлечен в преодоление стрессовых состояний, вызванных воздействием активных форм кислорода и высокой температуры. При этом  $\Delta htpG$ -мутант чумного микроба был также устойчив к действию комплемента нормальной человеческой сыворотки, как и исходный штамм. Ясно, что столь незначительное снижение устойчивости чумного микроба к условиям стресса не могло существенно отразиться на вирулентности делеционных мутантов. В отличие от  $\Delta htpG$ -мутантов *Salmonella* Typhimurium [279], *L. interrogans* [144] и *E. tarda* [69] делеция гена *htpG* не ведет к аттенуации штаммов чумного микроба при подкожном введении беспородным мышам и морским свинкам.

Таким образом, утрата способности продуцировать HtpG не влияет на вирулентность  $\Delta htpG$  мутантов *Y. pestis* для мышей и морских свинок, что свидетельствует о неперспективности его использования в качестве молекулярной мишени для терапии и/или вакцинопрофилактики чумы.

#### 4.2 GlnA и GlnALG<sup>-</sup> штаммы *Y. pestis*

Азот – важный для жизни элемент, содержащийся во многих клеточных макромолекулах. Центральными молекулами в обмене азота в клетке являются глутамин и глутамат. Глутамин служит донором азота для многих азотсодержащих молекул в клетке и синтезируется с помощью фермента глутаминсинтетазы (ГС) из L-глутамата, аммиака и АТФ [227]. Показано, что для *Salmonella enterica* serovar Typhimurium внутриклеточное содержание L-глутамина является сенсором внеклеточного ограничения азота [123]. ГС - фермент в единственно известном пути биосинтеза глутамина, отвечающий наряду с глутаматсинтетазой за ассимиляцию аммиака в условиях роста клетки при ограничении азота. У энтеробактерий фермент глутаматдегидрогеназа может ассимилировать аммиак непосредственно в глутамат при высоких концентрациях аммиака. Однако для таких бактерий, как *M. tuberculosis*, у которых отсутствует глутаматдегидрогеназа, ГС и глутаматсинтетаза являются единственными ферментами ассимиляции аммиака. Благодаря своей центральной роли в обмене азота ГС подвергается разнообразным и сложным формам транскрипционной и посттрансляционной регуляции, а также ингибированию по типу обратной связи несколькими продуктами метаболизма глутамина [91, 227]. Существует по меньшей

мере четыре основные формы ГС [182]. У энтеробактерий единственный ген *glnA* кодирует фермент ГС типа I (ГС1), а делеционные мутанты по данному гену приобретают ауксотрофность в отношении глутамина [182, 277].

Известно, что приспособительная реакция к изменениям внеклеточного содержания азота у бактерий координируется двухкомпонентной системой GlnLG, ранее называемой NtrBC. GlnL (NtrB) - это сенсорная гистидинкиназа, которая воспринимает и затем трансдуцирует сигнал азотного голодания, при котором происходит ее фосфорилирование и последующая активация связывающего ДНК транскрипционного фактора GlnG (NtrC) [131]. GlnG является членом специализированного семейства транскрипционных активаторов, так называемых бактериальных энхансер-связывающих белков (*bacterial enhancer binding proteins* - bEBPs), которые активируют альтернативный механизм транскрипции, направляемый Сигма-фактором  $\sigma_{54}$ , в ответ на различные стимулы окружающей среды [110, 289]. Данная реакция позволяет клеткам быстро воспринимать недостаток азота и адаптироваться к изменившимся условиям путем активного поиска его альтернативных источников через активацию транскрипции генов, кодирующих переносчики источников азота, катаболические ферменты и опероны биосинтеза аминокислот [309]. Высоко-афинная система транспорта глутамина, кодируемая опероном *glnHPQ*, также находится под контролем двухкомпонентной системы GlnLG: уровни периплазматического глутамин-связывающего белка GlnH координационно регулируются с уровнями глутаминсинтетазы.

Цель настоящего этапа работы - получить  $\Delta glnA$  и  $\Delta glnALG$  мутанты *Y. pestis* и провести сравнительную оценку вирулентности и других характеристик изогенных штаммов *Y. pestis*, отличающихся по способности синтезировать ГС.

#### 4.2.1 Биоинформатический анализ региона *glnALG*

Генетический локус *glnALG* (Рисунок 9) располагается у чумного микроба, как у кишечной палочки и сальмонелл между генами *typA* и *hemN* (рисунок 12). 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.) (Таблица 6).

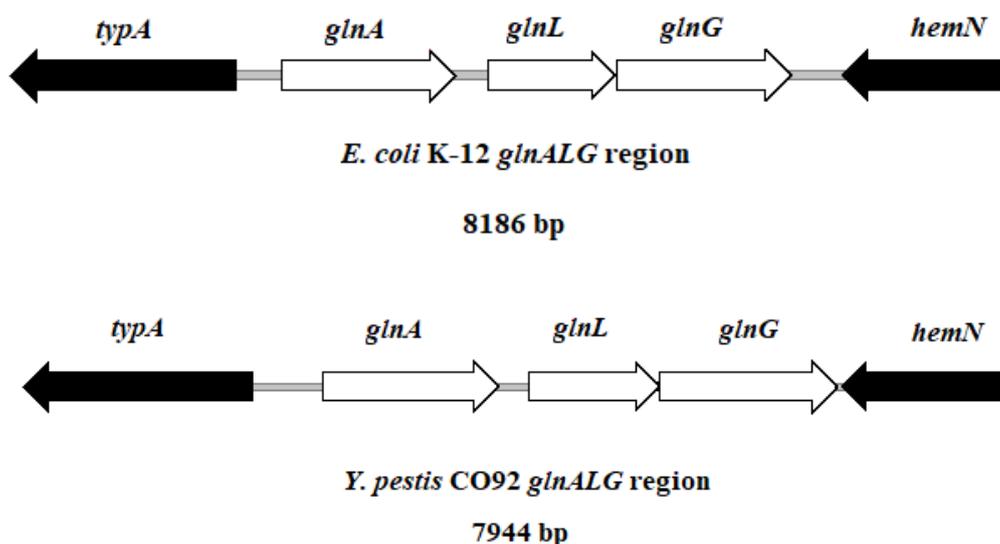


Рисунок 9 – Генетическая организация региона *glnALG* у чумного микроба и кишечной палочки

Таблица 6 – Характеристика белков GlnA GlnL и GlnG чумного микроба

Белок	Длина, а.о.	Молекулярный вес, кДа	Изоэлектрическая точка	Заряд при pH 7
GlnA	469	51730,92	5,20	-19,79
GlnR	349	38343,68	5,36	-10,32
GlnG	470	52369,22	6,08	-6,77

Внутри вида *Y. pestis* белки высоко консервативны – BLASTp показал 99,5-100 % гомологию у штаммов различных биоваров чумного микроба (Таблица 7). 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.

Таблица 7 – Процент гомологии аминокислотных последовательностей белков внутри вида, рода и семейства *Enterobacteriaceae* в BLASTp

Белок	<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia</i> sp.	<i>Enterobacteriaceae</i>
GlnA	99,57-100	96,38-100	93,39-100
GlnR	99,71-100	99,71-100	93,12-100
GlnG	99,79-100	94,04-99,79	93,19-94,47

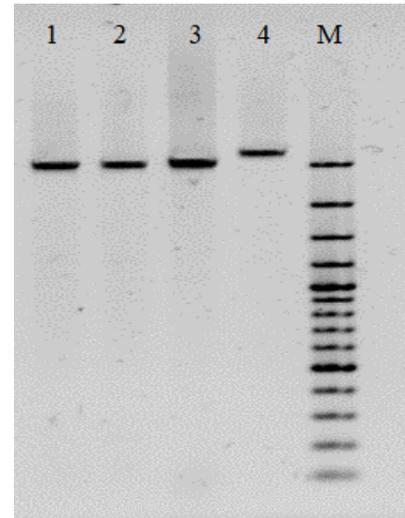
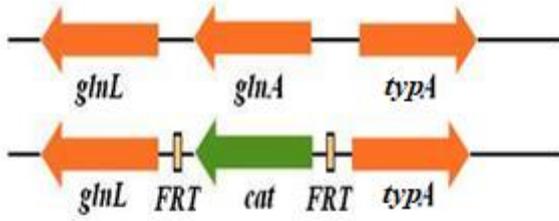
#### 4.2.2 Конструирование GlnA<sup>-</sup> и GlnALG<sup>-</sup> вариантов штаммов *Y. pestis*

Конструирование GlnA<sup>-</sup> и GlnALG<sup>-</sup> вариантов аттенуированного и вирулентных штаммов *Y. pestis* проводили аналогично описанному ранее получению делеционных мутантов по гену *htpG* (раздел 4.1).

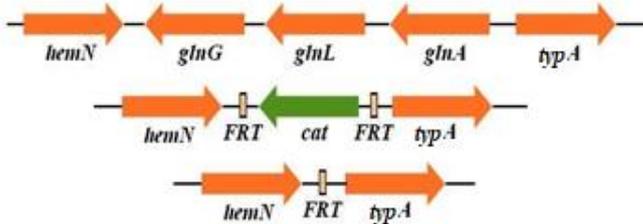
Проведенный сайт-направленный мутагенез гена *glnA* и трех генов *glnALG* в вакцинном штамме EV НИИЭГ, а также в вирулентном штамме *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 позволили получить мутанты EVΔ*glnA*, EVΔ*glnALG*, 231Δ*glnA* и 231Δ*glnALG* (Рисунок 10).

#### 4.2.3 Эффект делеции *glnA* и *glnALG* на рост мутантного штамма

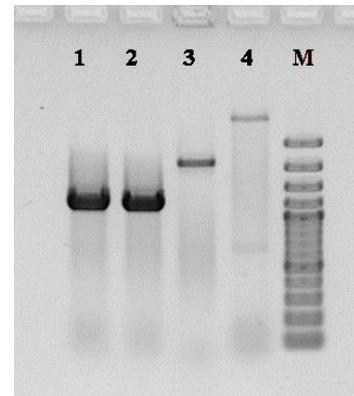
Рост Δ*glnA* и Δ*glnALG*-мутантов изучили на агаре и в бульоне Хоттингера. При температуре культивирования 28 °С мутантные штаммы не формировали колонии на плотной питательной среде без добавления глутамин (Рисунок 11), рост в жидкой питательной среде без глутамин также отсутствовал (Рисунок 12Б).



А



В



Б

Г

В: 1-3 – *Y. pestis* EVΔ*glnA*::*cat* (мутантная аллель, размер ампликона 3031 п.н.); 4 – исходный штамм *Y. pestis* EV («дикая» аллель, размер ампликона 3432 п.н.); М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Г: 1,2 – *Y. pestis* EVΔ*glnALG* (мутантная аллель после удаления маркера антибиотикоустойчивости, размер ампликона 1100 п.н.); 3 – *Y. pestis* EVΔ*glnALG*::*cat* (мутантная аллель, размер ампликона 2188 п.н.); 4 – исходный штамм *Y. pestis* EV («дикая» аллель, размер ампликона 5256 п.н.); М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Рисунок 10 – Схема конструирования GlnA<sup>-</sup> (А) и GlnALG<sup>-</sup> (Б) вариантов штаммов *Y. pestis*. Скрининг мутантных клонов в ПЦП с праймерами *glnA2F/glnA2R* (В) и с праймерами *glnA2F/glnLG2F* (Г)

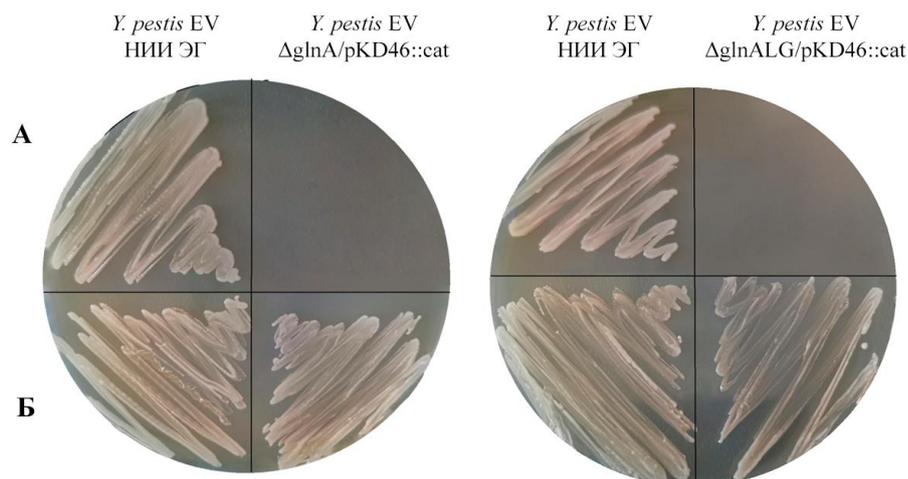


Рисунок 11 – Рост штамма «дикого» типа и мутантов  $EV\Delta glnA$  и  $EV\Delta glnALG$  на плотной питательной среде

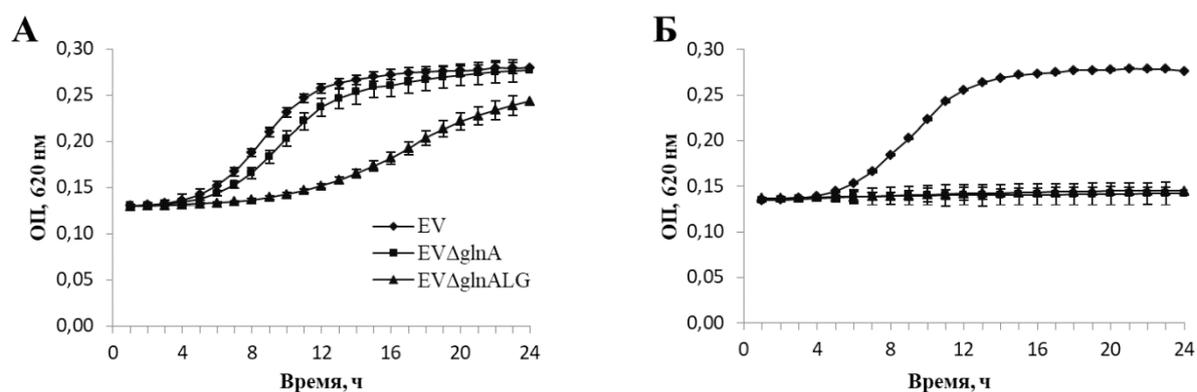


Рисунок 12 – Рост штамма «дикого» типа и мутантов  $EV\Delta glnA$  и  $EV\Delta glnALG$  в жидкой питательной среде *in vitro* при температуре 28 °C: А – в присутствии 20 мМ глутамина; Б – без глутамина

У энтеробактерий глутаминсинтетаза является единственным ферментом, способным синтезировать глутамин [165]. Мы проанализировали рост колоний дикого типа, *glnA*- и *glnALG* мутантов на агаре и в бульоне Хоттингера с глутамином и без его добавления. Мутанты *glnA* и *glnALG* росли сравнимо со штаммом «дикого» типа при добавлении глутамина в бульоне Хоттингера и на агаре Хоттингера, без глутамина рост отсутствовал (Рисунок 11 и Рисунок 12). Эти результаты показывают, что ограничение

доступности глутамина, вызванное отсутствием функциональной глутаминсинтетазы, объясняет ауксотрофность по данной аминокислоте у мутантных по *glnA* и *glnALG* штаммов чумного микроба.

#### 4.2.4 Эффект делеции *glnA* и *glnALG* на вирулентность для мышей и морских свинок

Глутамин – один из двух центральных продуктов в процессе ассимиляции азота, функционирующий как донор амидных групп в большинстве реакций биосинтеза [277]. Т.о., дефект в биосинтезе глутамина и потенциально ассоциированное с этим нарушение метаболизма азота, может существенно изменять взаимоотношения патоген-хозяин.

Вирулентность сконструированных мутантов *Y. pestis* 231 $\Delta$ *glnA* и 231 $\Delta$ *glnALG* определяли по величине LD<sub>50</sub> по сравнению с исходным высоковирулентным штаммом *Y. pestis* 231 (Таблица 8) для беспородных мышей и морских свинок, зараженных подкожно.

Таблица 8 – Вирулентность экспериментальных штаммов *Y. pestis* при подкожном заражении беспородных мышей и морских свинок

Штаммы <i>Y. pestis</i>	мыши		морские свинки	
	LD <sub>50</sub> , КОЕ *	средние сроки гибели, сут	LD <sub>50</sub> , КОЕ *	средние сроки гибели, сут
231	1 (1 ÷ 2)	5,4 ± 0,5	15 (4 ÷ 58)	8,5 ± 0,8
231 $\Delta$ <i>glnA</i>	5 (1 ÷ 20)	6,5 ± 0,4	10 (0 ÷ 10)	8,4 ± 0,6
231 $\Delta$ <i>glnALG</i>	> 10 <sup>5</sup> (слишком велик)		> 10 <sup>7</sup> (слишком велик)	

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

Сравнительная оценка вирулентности для беспородных мышей и морских свинок не выявила достоверных различий в величинах LD<sub>50</sub> штамма "дикого" типа, а также сконструированного нами GlnA<sup>-</sup> варианта (Таблица 8). Средние сроки жизни животных, погибших в результате заражения штаммами 231 или его изогенным производным, достоверно не отличались (Рисунок 13, Таблица 8).

Штамм с делетированными генами *glnALG* при подкожном способе введения был авирулентен для мышей в дозе  $10^5$  и морских свинок в дозе  $10^7$  КОЕ (Рисунок 13). Все животные в течение срока наблюдения (21 сут) после введения максимальной дозы мутантного штамма не проявляли признаков заболевания. После заражения исходным штаммом *Y. pestis* 231 в дозах  $10$ - $10^3$  КОЕ мыши пали к 4-6 дню, а морские свинки, зараженные  $10^2$ - $10^3$  КОЕ, пали к 10-12 дню наблюдения (Рисунок 13).

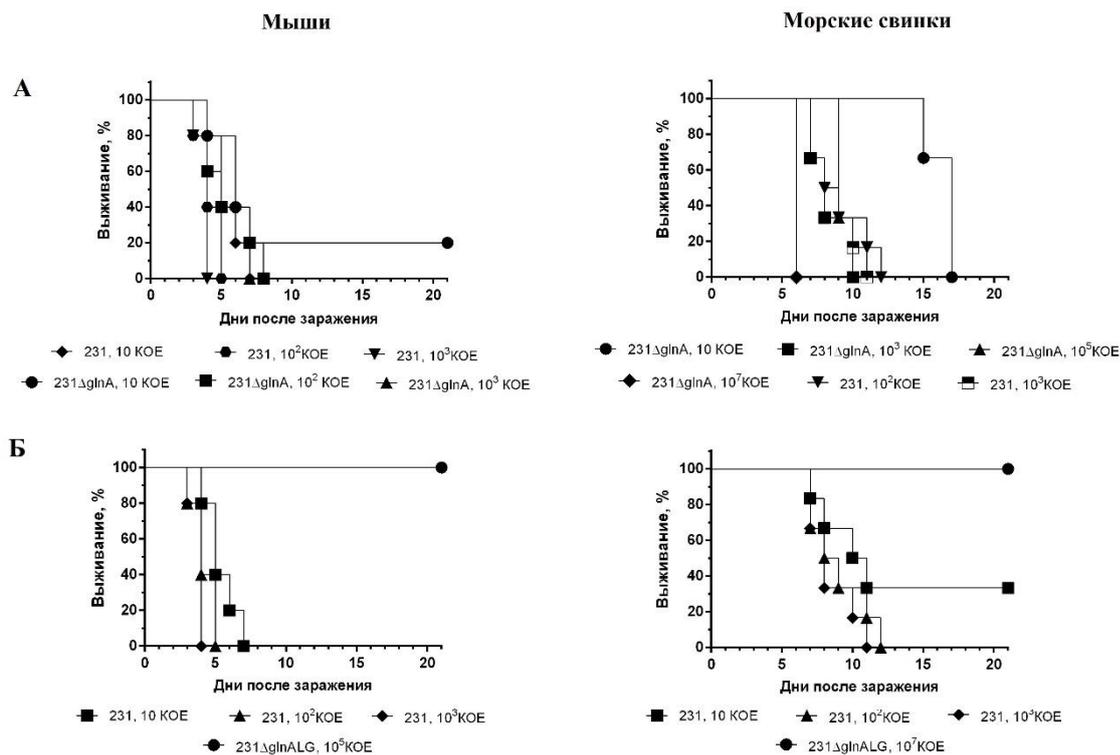


Рисунок 13 – Выживаемость беспородных мышей и морских свинок после подкожного заражения штаммами *Y. pestis* 231ΔglnA (А) или ΔglnALG (Б)

Подкожное введение штамма 231ΔglnALG не вызывало гибели мышей, а при иммунизирующей дозе  $10^5$  КОЕ обеспечивало 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 (Рисунок 14). При использовании более низких иммунизирующих доз ( $10^2$ - $10^4$ ) выживаемость животных составляла от 40 % до 80 %. Мыши контрольной группы (неиммунные) пали к 4 дню наблюдения. Все морские свинки, иммунизированные штаммом 231ΔglnALG в дозах  $10^4$ - $10^7$  пережили последующее заражение вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 (рисунок 14). Неиммунный контроль пал к 6 дню наблюдения.

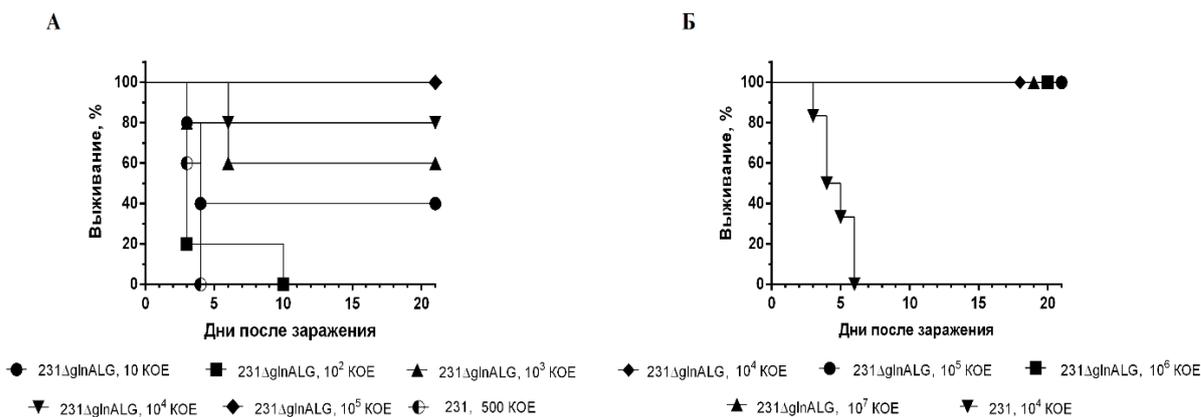


Рисунок 14 – Выживаемость беспородных мышей (А) и морских свинок (Б), вакцинированных подкожно штаммом *Y. pestis* Δ*glnALG*, после подкожного заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 231

Глутаминсинтетаза - основной фермент в усвоении азота, преобразующий глутамат и аммиак в глутамин в реакции, управляемой АТФ [182]. Глутамин является центральным звеном азотного обмена и служит индикатором наличия азота в клетках сальмонелл. Причем, когда внешние источники азота ограничены, внутренний пул глутамина уменьшается, в то время как пул глутамата остается стабильным [123]. *glnA*-мутанты *S. Typhimurium* имитируют внутриклеточное ограничение азота даже тогда, когда азот извне доступен в избытке. Считается, что снижение пула глутамина в условиях ограничения азота отвечает за медленный рост сальмонелл [123]. Упомянутые данные согласуются с полученными нами наблюдениями о том, что штаммы чумного микроба, дефектные по генам *glnA* или *glnALG* не растут на плотной и в жидкой питательной среде даже богатого состава (агар и бульон Хоттингера) без добавления глутамина (Рисунки 11 и 12). Добавление глутамина в среду культивирования вызывает реверсию данного фенотипа. Следовательно, АВС-транспортер глутамина, кодируемый группой генов *glnHPQ*, функционирует в нокаутных по генам *glnA* или *glnALG* мутантах на уровне, необходимом для восстановления его внутриклеточного содержания.

Амидная группа в глутамине является источником азота для ранних стадий синтеза мономерных блоков большинства клеточных макромолекул: белков, нуклеиновых кислот и поверхностных полимеров. Поэтому можно ожидать, что

фенотипы мутантов *glnA* и *glnALG* могут сильно отличаться от фенотипа штамма дикого типа. Например, по данным P. Aurass *et al.* [27] *glnA* мутант *S. enterica* serovar Typhimurium обладал сниженной способностью к внедрению в макрофаги. Показано, что одиночные мутанты по *glnA* *S. enterica* serovar Typhimurium не обладали сниженной вирулентностью при внутрибрюшинном заражении мышей BALB/c [146]. Однако комбинированный нокаут *glnA* и генов транспортной системы глутамина *glnH* и *glnQ* или генов двухкомпонентной регуляторной системы азота (*glnLG*), отвечающей за транскрипцию генов-переносчиков глутамина, привел к значительному снижению диссеминации мутантных штаммов в организме мышей и нарушению внутриклеточной выживаемости в макрофагах J774, свидетельствуя, что степень поглощения глутамина хозяином играет важную роль в развитии инфекционного процесса [146]. Мы также обнаружили, что одиночный *glnA* мутант чумного микроба не был аттенуирован при подкожном заражении белых мышей и морских свинок (Рисунок 13). Однако мутантный штамм с делецией гена глутаминсинтетазы (*glnA*) и генов двухкомпонентной регуляторной системы азота (*glnLG*) драматически снижал вирулентность при подкожном заражении мышей и морских свинок. Полученные результаты подтверждают, что в организме хозяина доступность глутамина для чумного микроба зависит от двухкомпонентной регуляторной системы *glnLG*, которая, по-видимому, необходима для транскрипции генов транспорта глутамина.

Нокаут генов, отвечающих за транспорт или синтез веществ, необходимых для жизнедеятельности микроорганизма, является перспективным подходом при создании вакцинных штаммов против многих инфекционных заболеваний. Мы предварительно оценили иммуногенность сконструированного штамма *Y. pestis* 231Δ*glnALG* для мышей и морских свинок. Δ*glnALG*-мутант не вызывал гибели мышей при подкожном введении  $10 \cdot 10^5$  КОЕ и морских свинок при подкожном введении  $10^4 \cdot 10^7$  КОЕ, а в дозах  $10^5$  КОЕ для мышей и  $10^4 \cdot 10^7$  КОЕ для морских свинок обеспечивал 100 %-ную защиту животных при последующем подкожном введении 200 DCL вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Иммуногенность штамма 231Δ*glnALG* была более выражена на модели морских свинок. Т.о., аттенуированный штамм *Y. pestis* 231Δ*glnALG* может рассматриваться как перспективный кандидатный вакцинный штамм. Полная оценка характеристик полученного штамма *Y. pestis* 231Δ*glnALG* 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. 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, связанных с патогенностью, не повреждается и полный антигенный состав доступен для узнавания иммунной системой и формирования иммунного ответа хозяина.

Кроме того, направлением дальнейших исследований может быть изучение влияния мутаций по генам, продукты которых отвечают за синтез и высокоаффинный транспорт питательных веществ, на патогенность как внутриклеточных, так и внеклеточных микроорганизмов. Для этого необходимо сконструировать парные мутации по генам, отвечающим за биосинтез-транспорт питательных веществ или, в качестве альтернативы, провести делеции генов транспортных систем в ауксотрофных патогенах, которые полагаются на поглощение питательных веществ из организма хозяина.

#### 4.3 MetQ<sup>-</sup> штаммы *Y. pestis*

Поглощение и синтез метионина необходимы для вирулентности многих бактериальных патогенов, таких как *S. enterica* [82], *Haemophilus influenzae* [58] и *S. pneumoniae* [29]. Большинство микроорганизмов способны синтезировать метионин *de novo* из аспарагина в ходе ряда реакций, включающих ассимиляцию неорганических сульфатов и синтез цистеина или гомоцистеина [90]. Известно, что штаммы основного подвида чумного микроба не способны к самостоятельному синтезу метионина вследствие делеции одного нуклеотида (-G) в позиции 988 гена *metB*, кодирующего цистетинин-γ-синтазу и проявляют ауксотрофность по данной аминокислоте [195].

Основными системами поглощения метионина у бактерий являются ABC-транспортеры, в том числе MetNIQ (MetD) у *E. coli* [135, 136, 181] и MetQNP *S. pneumoniae* [31] и *N. gonorrhoeae* [244]. Обычно три функции ABC-транспортера могут выполнять один или более белков: пермиаза, АТФ-аза и субстрат-связывающий домен [47, 132].

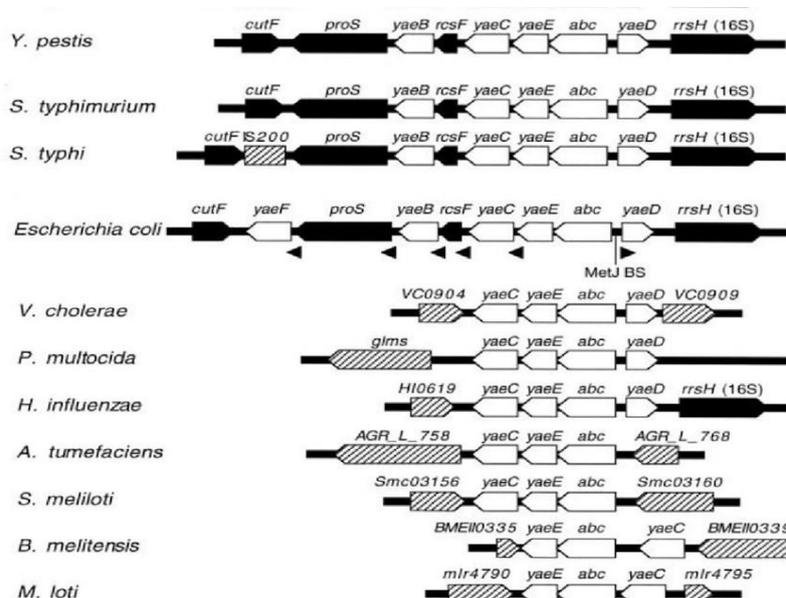
В данном разделе работы для понимания фундаментальных аспектов взаимодействия в системе «паразит-хозяин» мы рассмотрели влияние метаболизма метионина на универсально вирулентный для млекопитающих штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* 231, не способный к самостоятельному синтезу метионина из аспарагина.

##### 4.3.1 Биоинформатический анализ *metQ*

Генетический локус, предположительно кодирующий ABC-транспортер метионина, располагается у чумного микроба, как и у кишечной палочки между генами *rscF* и *gmhB* (Рисунок 15). 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 липопроtein MetQ (CAL19737.1), состоящий из 271 аминокислотных остатков. 1-22 а.о. в структуре белка относятся к сигнальному пептиду. MetQ *Y. pestis* предположительно имеет молекулярную массу 29,4 кДа и

pI = 5,21. MetQ аннотирован как гипотетический липопротеин и входит в TIGRFAM семейство липопротеинов “TIGR00363.”



Функционально не охарактеризованные гены обозначены белым, гены с известной функцией в соответствующей позиции – черным, гены, не имеющие ортолога в данной позиции – косой полосой. 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 YPO1069, YPO1071, YPO1072, YPO1074 для *Y. pestis* - *yaeB*, *yaeC*, *yaeE*, *yaeD*; VC905, VC906, VC907 и VC908 у *V. cholerae*; *plpB*, PM1729, PM1728 и PM1727 у *Pasteurella multocida*; HI0620, HI0620a, HI0621 и HI0261.1 у *H. influenzae* обозначены как *yaeC*, *yaeE*, *abc* и *yaeD*. AGR\_L\_761, AGR\_L\_763 и AGR\_L\_765 у *Agrobacterium tumefaciens*; Smc03157, Smc03158 и Smc03159 у *Sinorhizobium meliloti*; BMEII0338, BMEII0336 и BMEII0337 у *Brucella meliloti*; *mll4794*, *mll4791* и *mll4792* у *Mesorhizobium loti* являются ортологами генов *yaeC*, *yaeE* и *abc*.

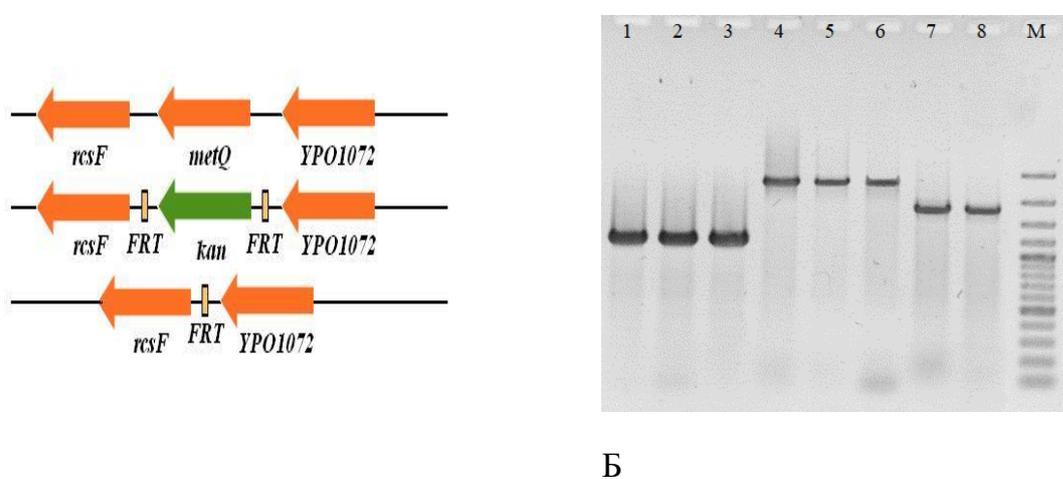
Рисунок 15 – Генетическая организация региона *metNIQ* у *Y. pestis* и других бактерий

Внутри вида *Y. pestis* белок высоко консервативен – BLASTp показал 100 % гомологию у штаммов различных биоваров чумного микроба. Гомология с белком MetQ энтеропатогенных иерсиний составила 99 % для *Y. pseudotuberculosis* (WP\_011192855.1) и 96 % для *Y. enterocolitica* (WP\_005163992.1). Для продукта

ортолога гена *metQ* *E. coli* (WP\_052928221) с охарактеризованной функцией гомология составляет 90,7 %.

#### 4.3.2 Конструирование $\text{MetQ}^-$ вариантов штаммов *Y. pestis*

Методом одноэтапной инактивации хромосомных генов с помощью ПЦР-продуктов [71] на основе вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ был получен мутант, в котором кодирующую последовательность гена *metQ* заменили на кассету устойчивости к канамицину (Рисунок 16).



А Б

Б: 1,2,3 – *Y. pestis* 231 $\Delta$ *metQ* (мутантная аллель после удаления маркера антибиотикоустойчивости, размер ампликона 1189 п.н.); 4,5,6 – *Y. pestis* 231 $\Delta$ *metQ*::*kan* (мутантная аллель, размер ампликона 2588 п.н.); 7,8 – исходный штамм *Y. pestis* 231 («дикая» аллель, размер ампликона 1798 п.н.); М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Рисунок 16 – Схема конструирования  $\text{MetQ}^-$  вариантов штаммов *Y. pestis* (А) Скрининг мутантных клонов в ПЦР с праймерами *metQ*2F/*metQ*2R (Б)

Мутанты, дефектные по синтезу *MetQ*, на модели высоковирулентного штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 получали методом сайт-направленного мутагенеза с использованием суицидного вектора pCVD442. Для комплементации мутации кодирующую последовательность гена *metQ* клонировали в низкокопийном векторе

pACYC-*gfp*. Сконструированный вектор для комплементации pACYC-*metQ* вводили в штамм *Y. pestis* 231 $\Delta$ *metQ::kan* методом криотрансформации.

Проведенный сайт-направленный мутагенез гена *metQ* в вакцинном штамме *Y. pestis* EV НИИЭГ, а также в вирулентном штамме *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 позволил получить мутанты EV $\Delta$ *metQ*, 231 $\Delta$ *metQ* (Рисунок 4). Введение сконструированного вектора pACYC-*metQ* в штамм *Y. pestis* 231 $\Delta$ *metQ::kan* позволило получить комплементированный штамм 231 $\Delta$ *metQ*/pACYC*metQ*.

#### 4.3.3 Эффект делеции *metQ* на рост мутантного штамма

Для исследования важности получения метионина для чумного микроба рост исходного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и мутанта *Y. pestis* EV $\Delta$ *metQ* сравнили в жидких питательных средах: «голодной» среде М9, среде М9 с добавлением незаменимых аминокислот (метионин, треонин, фенилаланин, цистеин, аргинин, лейцин) и бульоне Хоттингера (Рисунок 17). 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 $\Delta$ *metQ* уступал по скорости роста штамму «дикого» типа. Отличие проявилось спустя 6 ч после инокуляции и сохранялось на протяжении всего времени наблюдения (24 ч).

Полученные результаты подтверждают, что MetQ необходим для получения метионина штаммам *Y. pestis* subsp. *pestis*, проявляющим ауксотрофность по данной аминокислоте [195].

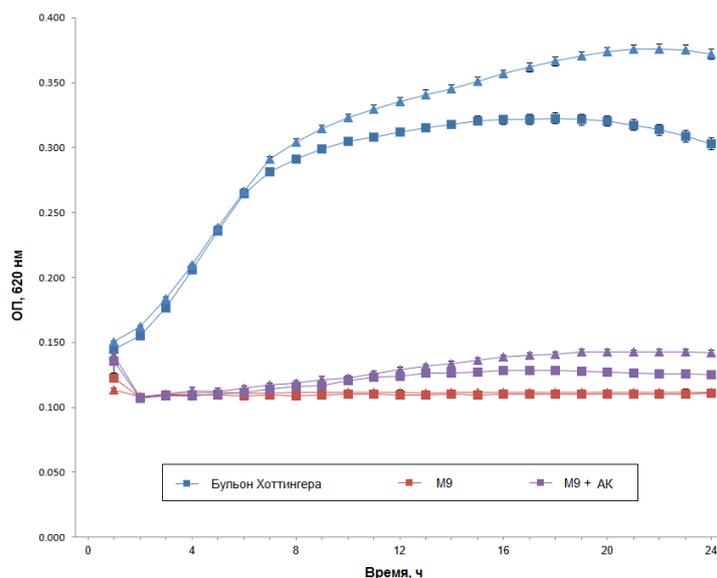


Рисунок 17 – Рост штамма «дикого» типа *Y. pestis* EV (треугольник) и мутанта *Y. pestis* EV $\Delta$ metQ (квадрат) в жидких питательных средах *in vitro* при температуре 28 °С

#### 4.3.4 Чувствительность к нормальной человеческой сыворотке

Клетки исходного штамма *Y. pestis* EV, выращенные при температуре 25 °С, переживали действие комплемента 80 % НЧС. Инкубация в течение 1 ч в 80 %-ной НЧС штамма EV с делетированным геном *metQ* так же не приводила к значительному снижению числа жизнеспособных микробных клеток ( $\lg 6,6 \pm 0,02$  КОЕ) по сравнению с инкубацией в тНЧС ( $\lg 6,9 \pm 0,01$  КОЕ), подтверждая, что не активация системы комплемента вовлечена в снижение уровня выживания  $\Delta$ metQ штамма.

#### 4.3.5 Эффект делеции на вирулентность для мышей и морских свинок при подкожном заражении

Вирулентность сконструированного набора изогенных вариантов штамма *Y. pestis* 231, отличающихся по продукции MetQ, определяли по величине LD<sub>50</sub> на модели бубонной формы инфекции у беспородных белых мышей и морских свинок (Таблица 9).

Таблица 9 - Вирулентность изогенных штаммов *Y. pestis* при подкожном заражении беспородных мышей и морских свинок

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

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

Все мыши пережили заражение 10<sup>5</sup> КОЕ штамма *Y. pestis* 231Δ*metQ* и в течение срока наблюдения (21 сут) после введения максимальной дозы мутантного штамма не проявляли признаков заболевания. После заражения исходным штаммом *Y. pestis* 231 в дозах 10-10<sup>3</sup> КОЕ мыши пали к 4-6 дню наблюдения (Рисунок 18).

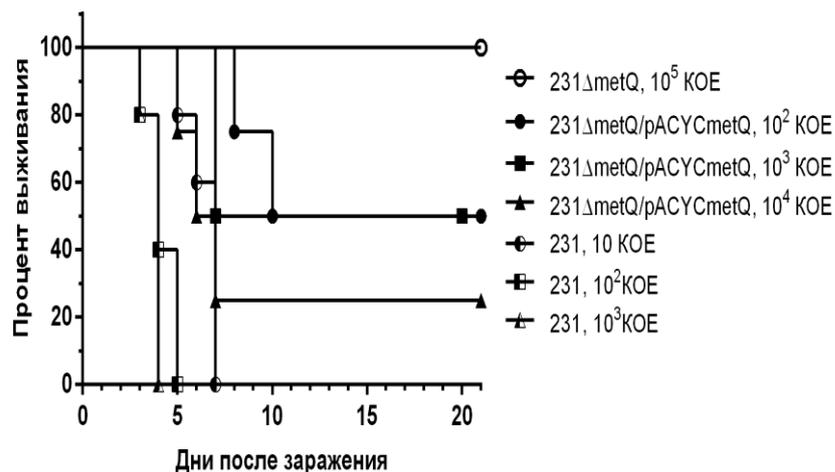


Рисунок 18 – Выживаемость беспородных мышей после подкожного заражения мутантным штаммом *Y. pestis* 231Δ*metQ*, комплементированным штаммом *Y. pestis* 231Δ*metQ*/pACYS*metQ* и штаммом *Y. pestis* 231 «дикого типа»

Делеция гена *metQ* приводила к аттенуации штамма *Y. pestis* 231 и для морских свинок (рисунок 19). Комплементация делеционного мутанта восстанавливала его вирулентность как для мышей, так и морских свинок (Рисунок 19).

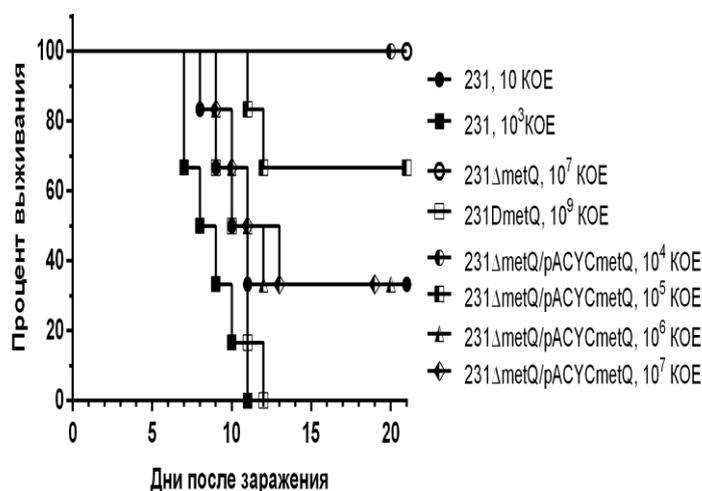


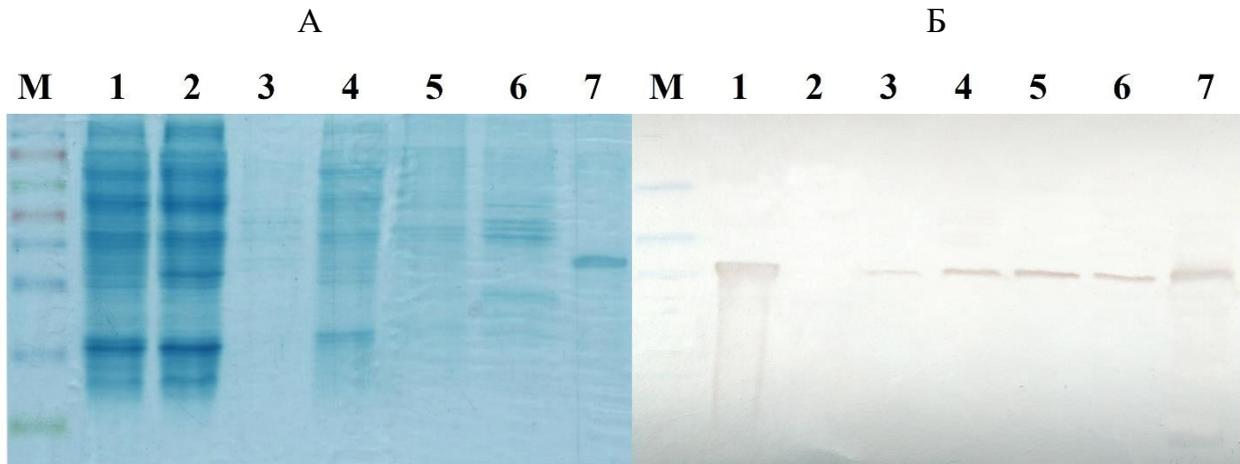
Рисунок 19 – Выживаемость морских свинок после подкожного заражения мутантным штаммом *Y. pestis* 231Δ*metQ*, комплементированным штаммом *Y. pestis* 231Δ*metQ*/pACYC*metQ* и штаммом *Y. pestis* 231 «дикого типа»

#### 4.3.6 Определение локализации MetQ в клетке чумного микроба

Большинство субстрат-связывающих белков ABC-транспортеров расположено в периплазме грамотрицательных бактерий [228], однако существуют свидетельства поверхностной локализации для некоторых из них [48, 151, 160, 198]. Например, при проведении протеомного анализа MetQ идентифицировали в препаратах белков и везикул наружной мембраны *N. gonorrhoeae* [307, 308] и *N. meningitidis* [153].

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 20). MetQ обнаруживался в клеточном лизате штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и отсутствовал в штамме EV НИИЭГΔ*metQ* (Рисунок 20). Белок присутствовал в наружной и

внутренней мембранах, цитоплазматической фракции и в периплазме чумного микроба.



М – маркер Spectra BR ThermoScientific multicolor (260, 140, 95, 72, 52, 42, 34, 26, 17, 10 кДа) 1 – лизат *Y. pestis* EV НИИЭГ; 2 – лизат *Y. pestis* EV НИИЭГΔ*metQ*; 3 – периплазматическая фракция; 4 – цитоплазматическая фракция; 5 – внутренние мембраны; 6 – внешние мембраны; 7 – рекомбинантный белок MetQ.

Рисунок 20 – 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 ( $5760 \pm 691$ ), что также подтверждает в том числе и поверхностное расположение белка.

Механизмы поглощения микроорганизмами питательных веществ, опосредуемые АВС-транспортерами, часто связаны с патогенезом бактериальных инфекций [164], поскольку дефицит некоторых из них требует присутствия специфичных и высокоаффинных рецепторов внешней мембраны и транспортных систем для перемещения этих соединений в периплазматическое пространство.

Проведенный нами анализ аминокислотных последовательностей выявил высокий уровень сходства между субстрат-связывающими доменами АВС-транспортера метионина MetQ чумного микроба, энтеропатогенных иерсиний, а также *E. coli*. В отличии от *E. coli* [135, 136, 244] и *N. gonorrhoeae* [244] сконструированный штамм

*Y. pestis* EVΔ*metQ* проявлял дефект роста в бульоне Хоттингера. Вероятно, в условиях снижения концентрации метионина в среде выращивания его количество становится не достаточным для поддержания роста *in vitro* при условии нарушения высокоаффинного транспорта.

Роль ABC транспортеров в патогенности бактерий, связанную с необходимостью поглощения клеткой различных питательных веществ, идентифицируют с помощью метода мутагенеза с сигнатурной меткой (STM), разработанного для полногеномного скрининга аттенуированных бактериальных мутантов [114]. Например, данный подход позволил выявить клоны с ослабленной вирулентностью, несущие мутации в генах *S. pneumoniae*, гомологичных генам *potA* и *potF* *E. coli* (участвующих в транспорте полиаминов), генах *glnH* и *glnQ* *B. subtilis* (участвуют в транспорте глутамина), а также *msmK* стрептококков (участвует в транспорте сахара) [247]. Для *Y. enterocolitica* [70] и *Y. pseudotuberculosis* [138] показали влияние мутаций в генах, кодирующих предполагаемые ABC-транспортеры фосфора и азота, на вирулентность штаммов для мышей.

Как упоминалось в главе 1 до настоящего момента в развитии инфекционного процесса при чуме была установлена роль ABC-транспортеров *Y. pestis*, отвечающих за транспорт только ионов металлов, таких как железо, цинк, марганец. Мы впервые показали влияние экспрессии субстрат-связывающего ABC-транспортера метионина MetQ на вирулентность штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* при подкожном заражении двух видов лабораторных животных. Делеция гена *metQ* приводила к аттенуации ауксотрофного по метионину штамма *Y. pestis* 231 как для мышей, так и для морских свинок, а комплементация восстанавливала вирулентность. Метионин является одной из наименее распространенных аминокислот в физиологических жидкостях макроорганизма (около 33,4 мМ L-метионина в сыворотке крови человека), но он необходим для многих клеточных функций. Известно, что метионин играет важную роль в процессах жизнеобеспечения бактериальной клетки, являясь ключевым метаболитом, участвующим в реметилировании и трансметилировании белков, неотъемлемым компонентом S-аденозилметионина (SAM: основной биологический донор метильной группы, необходимый для биосинтеза фосфолипидов и нуклеиновых кислот), а также может выступать в качестве эндогенного антиоксиданта благодаря своей способности подвергаться обратимому окислению и восстановлению [90, 93,

239, 250]. Прямая функция и механизм действия белка MetQ *Y. pestis* subsp. *pestis* в ходе взаимодействия и выживания *Y. pestis* subsp. *pestis* в организме млекопитающего остаются неизвестными, но можно предположить, что белок играя важную роль в связывании метионина, обеспечивает жизнедеятельность прокариотической клетки и/или нужен для осуществления антиоксидантной функции или, возможно, выполняет какую-либо другую, неохарактеризованную роль.

Локализацию MetQ на наружной мембране подтвердили в вестерн-блоттинге препаратов наружной мембраны штамма дикого типа с антителами, полученными после иммунизации мышей рекомбинантным белком MetQ. Вестерн-блоттинг показал, что MetQ обнаруживается на поверхности штаммов «дикого» типа, но не мутантного штамма *Y. pestis*  $\Delta metQ$ .

Связь некоторых ABC-транспортёров с вирулентностью и выживанием патогенов в организме хозяина, их локализация в клеточной стенке и факт, что гомологичные белки не обнаруживают в клетках млекопитающих, делает их идеальной мишенью для новых антимикробных препаратов при лечении инфекционных заболеваний [294]. Успех разработки противомикробных препаратов, нацеленных на ABC-транспортёры, вероятно, будет зависеть от знания их структур и молекулярных механизмов действия. На сегодняшний день несмотря на трудности, связанные с выделением и кристаллизацией мембранных белков, уже существует несколько доступных структур ABC-транспортёров. Кроме того, существует и альтернативный подход, в котором предлагается использовать ABC-транспортёры в качестве системы для доставки антимикробных препаратов в бактериальную клетку [1, 27]. Искусственно созданные препараты, в которых антибактериальное соединение связано с естественным субстратом для транспортёра, были названы контрабандистами [205] и предлагались в течение нескольких десятилетий. Одним из наиболее элегантных примеров этого подхода был синтез аналога 3-дезоксиде-манно-окт-2-улозоновой кислоты, присоединенной к дипептиду. Полученное соединение было активным в отношении грамотрицательных бактерий и обладало способностью блокировать связывание липида А с кором липополисахарида [106].

Таким образом, проведенный цикл исследований позволил выявить ген *metQ* и/или кодируемый им белок в качестве потенциальной молекулярной мишени для ингибиторов вирулентности *Y. pestis*.

#### 4.4 Fba<sup>-</sup> штамм *Y. pestis*

Известно, что один из гликолитических ферментов – фруктозо-бисфосфатальдолаза (Fba), является потенциальным фактором патогенности различных микроорганизмов [201]. Хотя выполняемая в цитозоле клетки роль фермента в гликолизе и гликонеогенезе давно известна, все чаще появляются сообщения о его дополнительных или так называемых «moon-lighting» (лунного света) функциях. В частности, несмотря на отсутствие идентифицированных путей секреции, гликолитические ферменты обнаруживают на поверхности бактериальных клеток, где они непосредственно взаимодействуют с растворимыми белками хозяина и поверхностными лигандами. У *S. pneumoniae* поверхностно-ассоциированный Fba, как было показано, связывается с рецептором с семью трансмембранными доменами, принадлежащим к суперсемейству кадгеринов [41]. Было также показано, что белок Fba обладает иммуногенностью для людей и способен вызывать защитный иммунный ответ против *S. pneumoniae* у мышей [168]. Кроме того, было обнаружено, что Fba *S. suis* является иммуногенным поверхностно-локализованным белком [55], и также сообщалось о возможной роли Fba в иммунном ответе к *Onchocerca volvulus* [178].

Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза катализирует обратимое расщепление фруктозо-1,6-бисфосфата на дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат [226, 299]. Fba класса I использует в активном центре остаток лизина и обычно обнаруживается у высших эукариотических организмов (животных и растений). Fba класса II абсолютно нуждается в двухвалентном ионе, чаще всего в цинке [299], и обычно обнаруживается у бактерий, архей и низших эукариот, включая грибы и некоторые зеленые водоросли, выращенные в гетеротрофных условиях [226]. Поскольку Fba класса II не обнаруживаются у животных, было высказано предположение, что они могут служить возможной терапевтической или вакциной мишенью [226].

Цель настоящего раздела нашей работы заключалась в оценке возможности использования белка Fba *Y. pestis* в качестве молекулярной мишени для вакцинопрофилактики и/или терапии чумы.

#### 4.4.1 Биоинформатический анализ *fba*

Открытая рамка считывания *fba* (YPO0920 у *Y. pestis* CO92) длиной 1869 п.о. кодирует белок фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазу класса II Fba (CAL19587.1), состоящий из 359 аминокислотных остатков. Белок Fba *Y. pestis* предположительно имеет молекулярную массу 39,1 кДа и pI = 5,67. Внутри вида *Y. pestis* белок высоко консервативен – BLASTp показал 100 % гомологию у штаммов различных биоваров чумного микроба. Гомология с белком Fba энтеропатогенных иерсиний составила 99 % для *Y. pseudotuberculosis* (WP\_012413932.1) и 98 % для *Y. enterocolitica* (WP\_174847801.1), а для белка *E. coli* (WP\_040046200.1) - 93 %.

#### 4.4.2 Получение штаммов *Y. pestis*, дефектных по продукции Fba

В вакцинном штамме *Y. pestis* EV линии НИИЭГ мы пытались заменить кодирующую последовательность гена *fba* на кассету устойчивости к канамицину методом одноэтапной инактивации гена с помощью ПЦР-продукта [63]. Однако несмотря на несколько попыток штамм, дефектный по гену *fba*, получить не удалось. Это косвенно свидетельствует о летальности или условной летальности данной мутации.

При проведенном анализе литературных источников мы обнаружили, что с использованием транспозонного мутагенеза ген *fba* чумного микроба предположительно идентифицирован Z.R. Yang *et al.* [296] как «essential», т.е. безусловно необходимый или существенный для жизнедеятельности. Позднее N.J. Senior *et al.* [245] подтвердили эту находку, показав с использованием интегрированного компьютерно-экспериментального подхода, что продукт гена *fba* безусловно необходим для роста штамма *Y. pestis* CO92 при температурах 28 °С и 37 °С. Интересно, что данная мутация не является летальной для *M. tuberculosis* [222] и *Neisseria meningitidis* [275].

Считается, что продукты «essential» генов являются лучшими мишенями при разработке новых антимикробных препаратов широкого спектра действия. Однако существенность каждого гена должна быть подтверждена экспериментально, т.к. может являться порождением среды существования микроорганизма. Ген *fba* чумного

микроба высококонсервативен, его продукт является ферментом в ключевом пути метаболизма, что делает его притягательной противомикробной мишенью. Чтобы окончательно подтвердить существенность этого гена необходимо получить условно-летальный мутант *Y. pestis*, в котором плазмидная копия удаленного гена будет экспрессироваться под контролем индуцибельного промотора. Дальнейшие исследования должны пролить свет на перспективность использования гена *fba* чумного микроба или его продукта в качестве молекулярной мишени для терапии чумы.

#### 4.5 Заключение по главе 4

Т.о. в ходе выполнения настоящего раздела диссертационной работы провели биоинформатический анализ регионов, кодирующих синтез белка теплового шока HtpG, глутаминсинтетазы GlnA и двухкомпонентной регуляторной системы GlnLG, ABC-транспортера метионина MetQ и фруктозо-бисфосфаталядолазы Fba. Показана высокая консервативность аминокислотных последовательностей белков HtpG, GlnA, MetQ и Fba чумного микроба, различных представителей вида *Y. pestis* и энтеропатогенных бактерий рода *Yersinia*. Получены штаммы *Y. pestis*, дефектные по генам *htpG*, *glnA* и *metQ*. Установлено, что утрата способности продуцировать HtpG не влияет на вирулентность  $\Delta$ *htpG* мутантов *Y. pestis* для мышей и морских свинок, что свидетельствует о неперспективности его использования в качестве молекулярной мишени для терапии и/или вакцинопрофилактики чумы. Показано, что одиночный *glnA* мутант чумного микроба не был аттенуирован при подкожном заражении белых мышей и морских свинок, однако мутантный штамм с делецией гена глутаминсинтетазы (*glnA*) и генов двухкомпонентной регуляторной системы азота (*glnLG*) драматически снижал вирулентность при подкожном заражении мышей и морских свинок. В ходе оценки иммуногенности установили, что аттенуированный штамм *Y. pestis* 231 $\Delta$ *glnALG* может рассматриваться как перспективный кандидатный вакцинный штамм, т.к. после однократной подкожной иммунизации мышей и морских

свинок штамм обеспечивал защиту животных при последующем подкожном введении значительных доз вирулентного штамма *Y. pestis* 231.

Показали, что делеция гена *metQ* приводила к аттенуации ауксотрофного по метионину штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 как для мышей, так и для морских свинок, а проведенная транс-комплементация восстанавливала вирулентность. В ходе определения локализации MetQ в клетке чумного микроба выявили его присутствие на наружной мембране бактерии. Связь ABC-транспортера метионина с вирулентностью чумного микроба и выживанием патогена в организме хозяина, его локализация в клеточной стенке бактерии и отсутствие гомологичных белков в клетках млекопитающих, делает метионин-связывающий транспортер MetQ потенциальной мишенью для новых препаратов для лечения и иммунопрофилактики чумы.

Несмотря на несколько попыток штамм, дефектный по гену *fba* с заменой кодирующей последовательности гена на кассету устойчивости к канамицину, получить не удалось, что косвенно может свидетельствовать о летальности или условной летальности данной мутации для чумного микроба.

Оценка вклада продуктов генов *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* в иммуногенез чумы является целью следующего этапа настоящей диссертационной работы.

## Глава 5. ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ И ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ *Yersinia 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* [19] и существования высоковирулентных природных штаммов возбудителя чумы, лишенных способности продуцировать F1 антиген [22]. Таким образом, поиск дополнительных протективных антигенов чумного микроба продолжает сохранять свою актуальность.

Целью настоящего раздела работы была оценка вклада продуктов генов *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* в иммуногенез чумы.

### 5.1 Молекулярное клонирование генов *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* *Y. pestis* в *E. coli*

При анализе генома *Y. pestis* CO2 с использованием Интернет-ресурса NCBI выявлены открытые рамки считывания: 1) *fbaA* (accession no. GenBank: YPO0920), кодирующая фруктозо бифосфат альдозазу класса II Fba; 2) *metQ* (YPO1071 у *Y. pestis* CO92), кодирующая субстрат-связывающую субъединицу ABC транспортёра метионина MetQ; 3) *htpG* (YPO3119 у *Y. pestis* CO92), кодирующая белок теплового шока HtpG; 4) *glnA* (YPO0024 у *Y. pestis* CO92), кодирующая глутаминсинтетазу GlnA.

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 (Таблица 3) в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, США). Хромосомная ДНК данного штамма несет ген T7 РНК-полимеразы под контролем изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ)-индуцибельного *lacUV5*

промотора. Созданные плазмиды обозначили рЕТ32-*glnA* (А) и рЕТ32-*metQ* (Б), рЕТ32-*fbaA* (В) и рЕТ32-*htpG* (Г) (Рисунок 21).

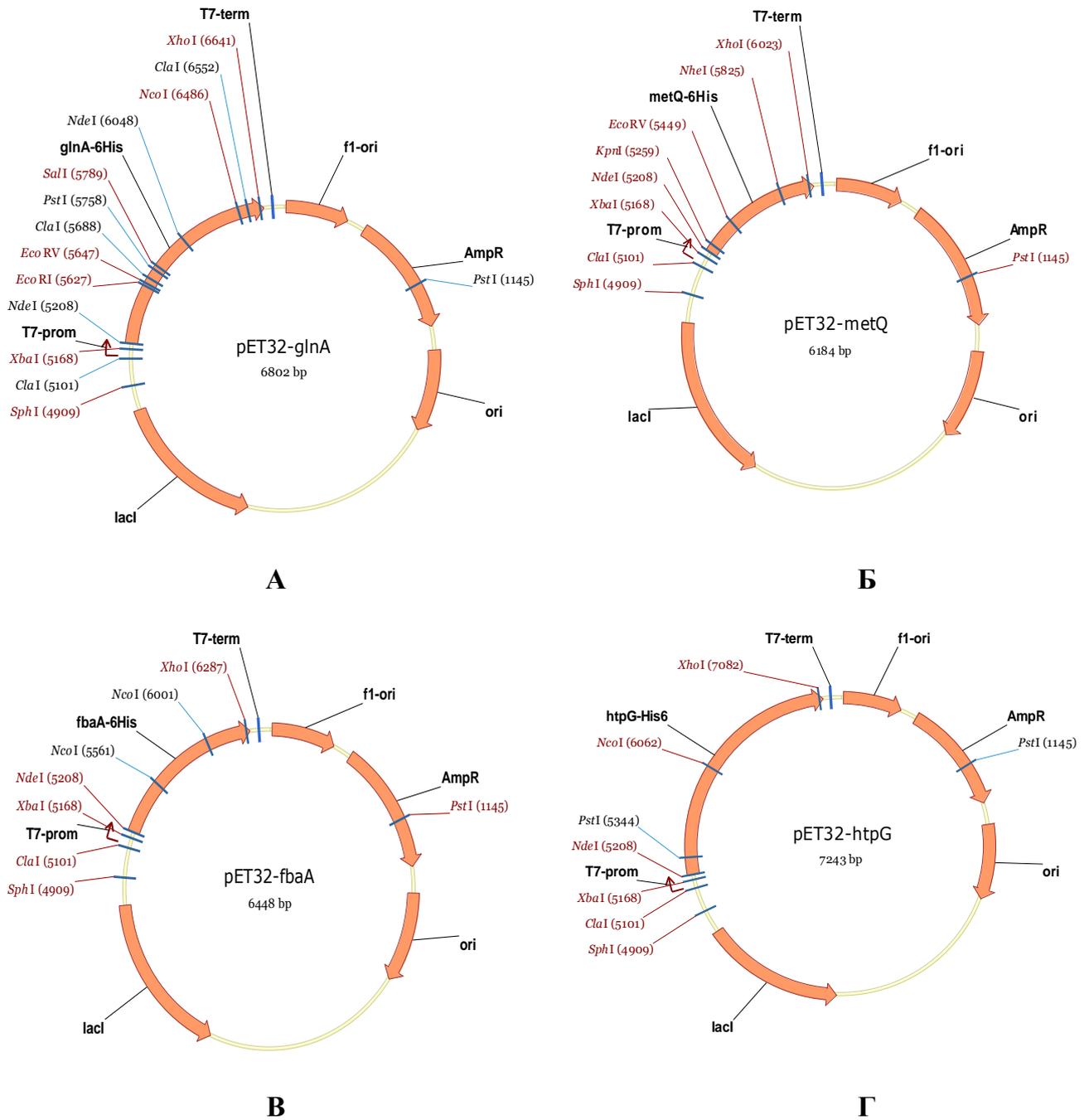
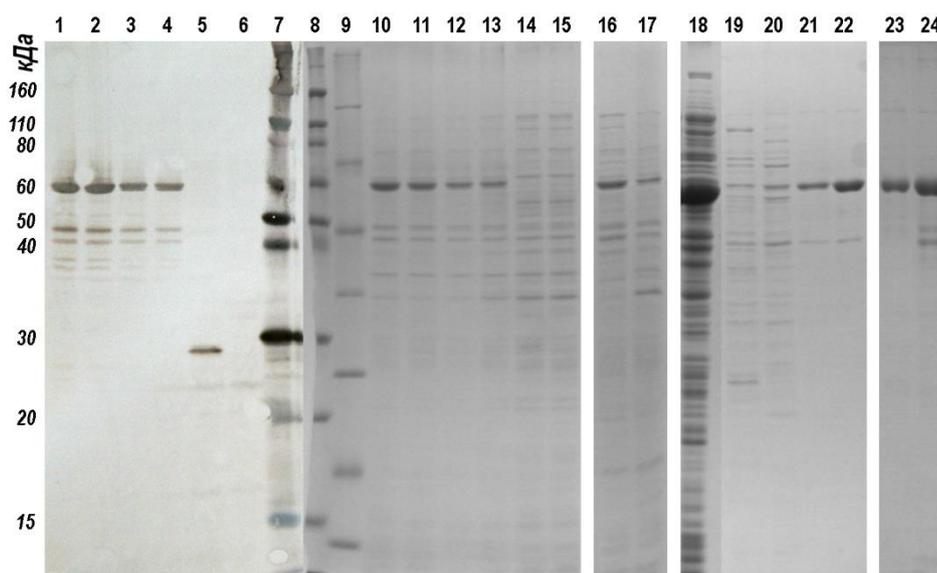


Рисунок 21 – Карты экспрессирующих векторов рЕТ32-*glnA* (А), рЕТ32-*metQ* (Б), рЕТ32-*fbaA* (В) и рЕТ32-*htpG* (Г)

## 5.2 Аналитическая индукция синтеза, выделение и очистка рекомбинантных белков

Молекулярные массы белков в индуцированной культуре штамма *E. coli* BL21 BL21(DE3)/pET32b-GlnA-His<sub>6</sub> различных клонов совпадали и составляли (60,50±0,16) кДа (Рисунок 22). Содержание белка GlnA-His<sub>6</sub> в клонах, представленных на электрофореграмме линиями 10, 11, 12 и 13 составляло, соответственно 60,0 %, 52,1 %, 51,5 % и 37,5 %. Установлено, что 71 % белка GlnA-His<sub>6</sub> локализовано в растворимой фракции и 29 % в осадочном материале (Рисунок 22, линии 16, 17).

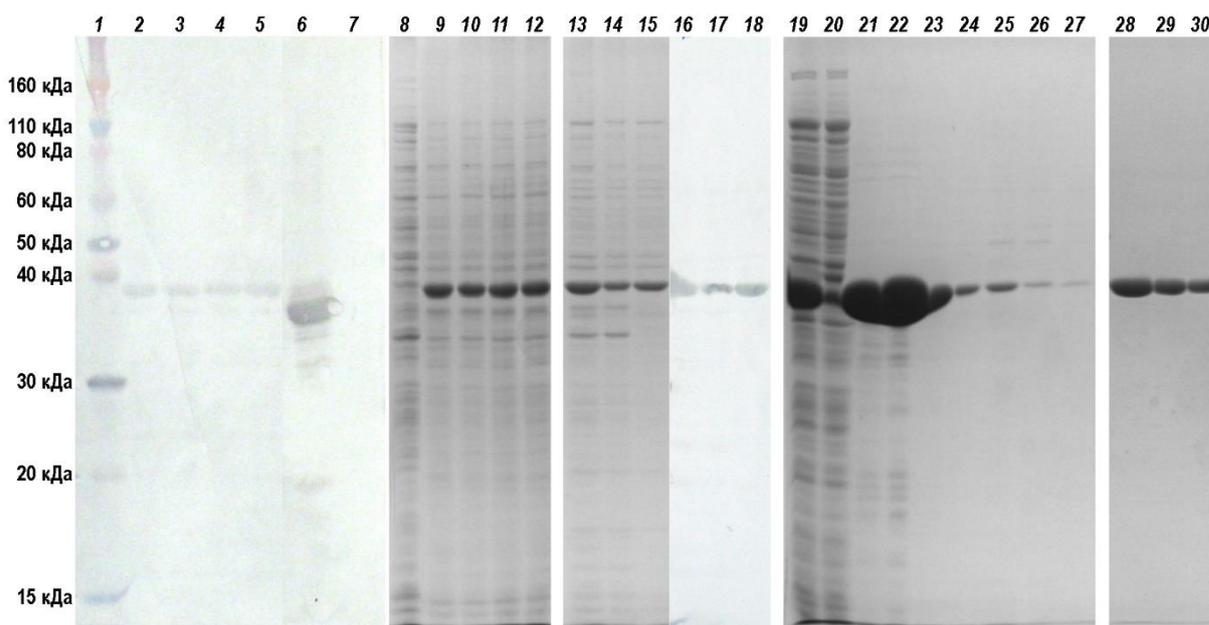
Таким образом, исследованные клоны могут быть использованы для наработки больших объемов культур и выделения белка GlnA-His<sub>6</sub> аффинной хроматографией из растворимого контента микробных клеток.



ДСН-ПААГ электрофорез – линии 8-24; иммуноблот (анти-His<sub>6</sub> антитела) – линии 1-7; анализ клонов – линии 1-15, K(+) – линии 5, 14; K(-) – линии 6, 15; определение локализации белка: осадок - линия 17; супер - линия 16; очистка белка из супера – линии 18-22; очищенный, растворимый и диализованный препарат для иммунизации - линия 23; осадок после диализа - линия 24, супер – линия 23.

Рисунок 22 – Анализ клонов *E. coli* BL21(DE3)/pET32-GlnA-His<sub>6</sub> с помощью иммуноблота и ДСН-ПААГ электрофореза

Молекулярные массы белков в индуцированной культуре штамма *E. coli* BL21 BL21(DE3)/pET32b-Fba-His<sub>6</sub> различных клонов совпадали и составляли  $(39,50 \pm 0,10)$  кДа (Рисунок 23).

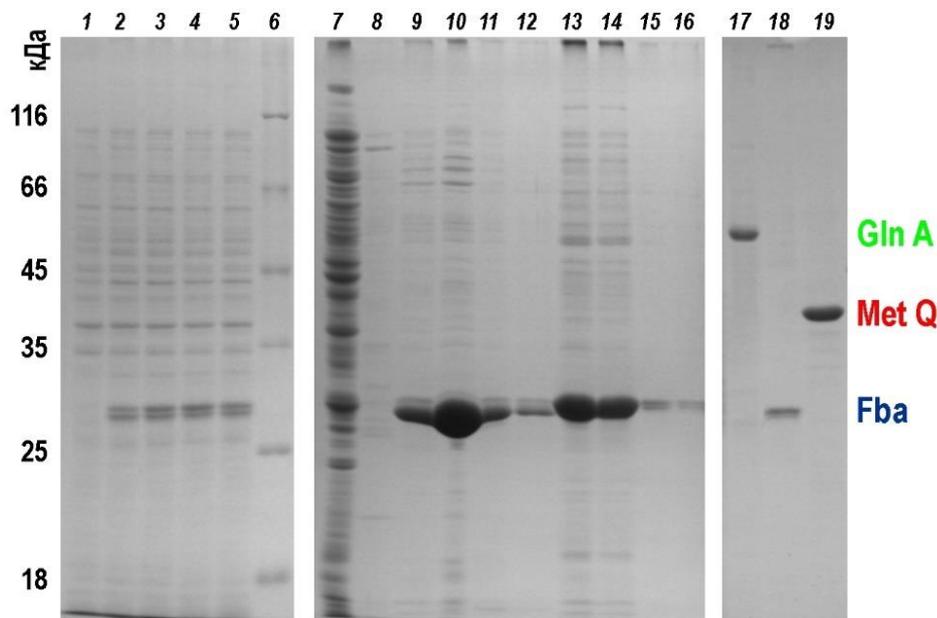


ДСН-ПААГ электрофорез – линии 8-15, 19-30; иммуноблот (анти-His<sub>6</sub> антитела) – линии 1-7, 16-18; анализ клонов – линии 1-12. К(+) – линия 6; К(-) – линия 7; определение локализации белка: лизат - линии 13, 16; осадок - линии 14, 17; супер - линии 15, 18; очистка белка из супера – линии 19-27; очищенный, растворимый, диализованный препарат для иммунизации - линии 28-30.

Рисунок 23 – Анализ клонов *E. coli* BL21(DE3) pET32- Fba-His<sub>6</sub> с помощью иммуноблота и ДСН-ПААГ электрофореза

Содержание белка Fba-His<sub>6</sub> в клонах, представленных на электрофореграмме линиями 9, 10, 11, 12, составляло, соответственно 52,8 %, 47,9 %, 47,2 % и 45,6 %. Установлено, что 48 % белка Fba-His<sub>6</sub> локализовано в растворимой фракции и 52 % в осадочном материале (Рисунок 23, линии 14, 15). Таким образом, исследованные клоны могут быть использованы для наработки больших объемов культур и выделения белка Fba-His<sub>6</sub> аффинной хроматографией из растворимого контента микробных клеток.

Молекулярные массы белков в индуцированной культуре штамма *E. coli* BL21 BL21(DE3)/pET32b-MetQ-His<sub>6</sub> различных клонов совпадали. При анализе клонов было видно, что белок клеточных лизатов представлен двойной полосой, линии 2-5 (Рисунок 24).

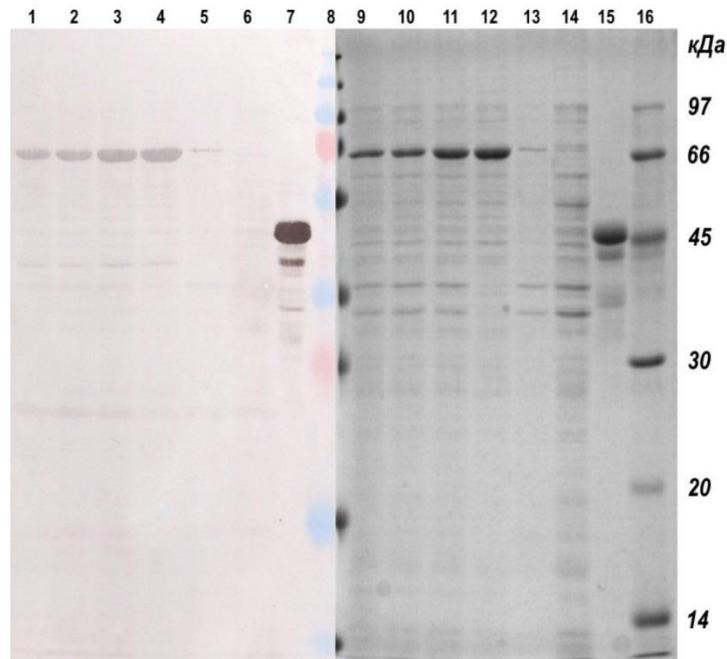


ДСН-ПААГ электрофорез – линии 1-19; анализ клонов – линии 1-6, К(-) – линия 1; очистка белка из супера – линии 7-16; очищенный растворимый диализованный препарат MetQ для иммунизации - линия 18; очищенный растворимый диализованный препарат GlnA- линия 17; очищенный растворимый диализованный препарат Fba- линия 18.

Рисунок 24 – Анализ клонов *E. coli* BL21(DE3) pET32-*metQ* с помощью иммуноблота и ДСН-ПААГ электрофореза

Содержание белка MetQ-His<sub>6</sub> в клонах, представленных на электрофореграмме линиями 2, 3, 4, 5, 6, составляло, соответственно 34,6 %, 38,9 %, 45,2 % и 38,2 %. Установлено, что более 80 % белка MetQ-His<sub>6</sub> локализовано в осадочном материале. При хроматографии белок разделился на укороченный (линии 9-12, молекулярная масса 27,5 кДа) и полноразмерный (Рисунок 24, линии 13-16, молекулярная масса 28,5 кДа) варианты. Исследованные клоны могут быть использованы для наработки больших объемов культур и выделения белка MetQ-His<sub>6</sub> методом аффинной хроматографии из растворенного контента микробных клеток.

Количественный анализ цифровых изображений показал, что молекулярные массы белка HtpG-His<sub>6</sub> различных линий совпадали и составляли (65,50±0,16) кДа (Рисунок 25).



Иммуноблот, линии 1-8; электрофорез, линии 8-16. Лизаты клонов *E. coli* BL21(DE3) pET32- HtpG, линии 1-4, 9-12; отрицательный контроль (-), линии 6, 14; суммарные надосадочные фракции, линии 4, 12; суммарные фракции осадков, линии 5, 13; маркеры молекулярных масс LMW (GEHealthcare), линия 16; маркеры молекулярных масс Sm 1811 (Fermentas), линия 8. Положительный контроль (+), белок GlnA-His<sub>6</sub>, линии 7, 15.

Рисунок 25 – Анализ клонов *E. coli* BL21(DE3) pET32- HtpG с помощью иммуноблота и ДСН-ПААГ электрофореза

Содержание белка HtpG в клонах, представленных на электрофореграмме линиями 9, 10, 11, составляло, соответственно 42,3 %, 40,6 % и 51,7 %. Установлено, что более 65 % белка HtpG локализовано в растворимой фракции (Рисунок 25, линия 12), но не в осадочном материале. Следует отметить существенное различие интенсивности окраски пятна положительного контроля, белка GlnA-His<sub>6</sub> и белка HtpG

в иммуноблотах клонов 1, 2 и 3 (Рисунок 25, линии 1-3 и 7) по сравнению с окраской тех же пятен в полиакриламидном геле. Это может указывать на различие связывающей способности белков, несущих последовательность His<sub>6</sub>. Таким образом, исследованные клоны могут быть использованы для наработки больших объемов культур и выделения белка HtpG аффинной хроматографией из растворимого контента микробных клеток.

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<sup>++</sup>-хелатной хроматографии.

### 5.3 Оценка иммуногенной активности рекомбинантных белков

Для определения формирования гуморального иммунного ответа на введение рекомбинантных GlnA, Fba, MetQ и HtpG беспородных белых мышей иммунизировали подкожно двукратно с интервалом в 21 день 10 мкг препарата соответствующего белка, сорбированного на гидроокиси алюминия. Средние титры антител представлены в таблице 9. Наибольшую иммуногенную активность показал липопротеин MetQ и белок теплового шока HtpG, титры IgG антител к которым достигали (242286 ± 54684) и (230400 ± 65466), соответственно (Таблица 10). Титры антител к Fba не превышали (53500 ± 3200). Наиболее низкие титры антител обнаружили к белку GlnA. После двукратной подкожной иммунизации мышей белками Fba, GlnA, MetQ и HtpG, сорбированными на гидроокиси алюминия, антительный ответ у вакцинированных животных был неоднородным.

Таблица 10 – Иммунологическая активность рекомбинантных белков Fba, GlnA, MetQ и HtpG

Препарат	Реципрокные значения титров антител после 2-ой иммунизации мышей	LD <sub>50</sub> <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ	Индекс иммунитета (LD <sub>50</sub> для иммунизированных / LD <sub>50</sub> для интактных животных)
Fba	53500 ± 3200	8 (2-30)	2,67
GlnA	< 100	68 (17-271)	22,67
MetQ	242286 ± 54684	3 (1-10)	1
HtpG	230400 ± 65466	22 (6-89)	7,33
Контроль 1 (AL(OH) <sub>3</sub> )	-	3 (1-12)	1
Контроль 2 (интактные)	-	3 (1-12)	1

Напряженность иммунитета, индуцированного введением препаратов Fba, GlnA, MetQ и HtpG, определяли по способности предохранять от гибели беспородных белых мышей после заражения массивной дозой вирулентного штамма *Y. pestis* 231 и выражали в LD<sub>50</sub> и индексе иммунитета (Таблица 10). Двукратная иммунизация GlnA, Fba, MetQ и HtpG не предоставляла значительной защиты от гибели при подкожном заражении беспородных мышей вирулентным штаммом *Y. pestis* 231. LD<sub>50</sub> вирулентного штамма *Y. pestis* 231 для мышей, иммунизированных данными препаратами, не отличалась от LD<sub>50</sub> для двух контрольных групп мышей (не иммунизированных или после введения AL(OH)<sub>3</sub>).

Неиммунные мыши контрольных групп, зараженные *Y. pestis* 231 пали к 5-10 дню наблюдения в зависимости от заражающей дозы (Рисунок 26).

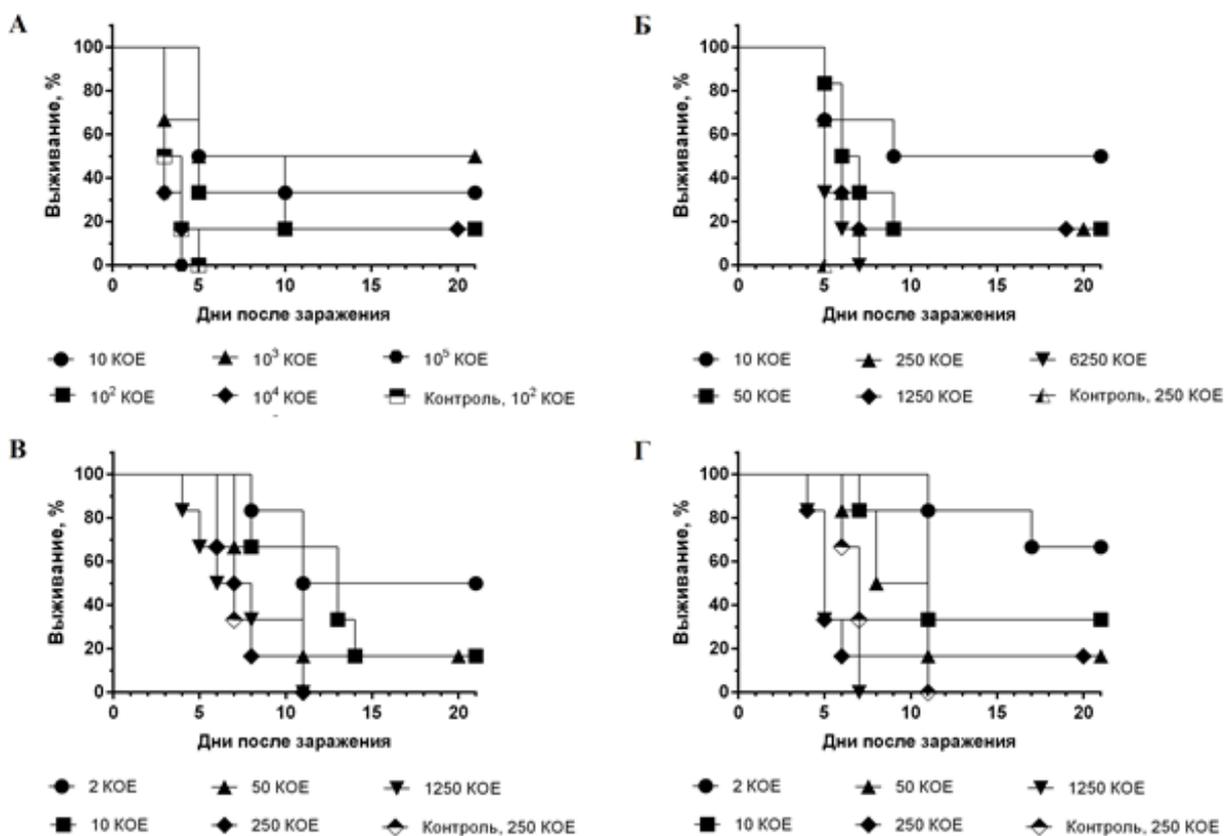


Рисунок 26 – Выживаемость иммунизированных белками GlnA (А), HtrG (Б), MetQ (В) и Fba (Г) мышей после подкожного введения вирулентного штамма *Y. pestis*

Ранее белок теплового шока HtrG чумного микроба был признан одним из иммунодоминантных антигенов, способным стимулировать Т- и В-клеточный иммунный ответ [165]. Внутримышечная иммунизация белком предоставляла частичную защиту от гибели при заражении малыми дозами *Y. pestis* (20 LD<sub>50</sub>) на модели бубонной чумы у мышей линии BALB/c, но не при заражении высокой дозой *Y. pestis* (200 LD<sub>50</sub>). По нашим данным двукратная иммунизация белком HtrG защищала 50 % беспородных мышей от гибели при подкожном заражении 10 КОЕ штамма *Y. pestis* 231 ( $\approx 3$  LD<sub>50</sub>). При более высоких заражающих дозах, не смотря на способность белка стимулировать продукцию специфичных антител в высоких титрах, выживало только 10 % вакцинированных животных. Полученные незначительные отличия в протективности белка могут быть связаны с использованием в экспериментах линейных и беспородных мышей.

Иммуногенность остальных белков GlnA, Fba, MetQ чумного микроба до настоящего исследования была неизвестна.

Противоречивые данные получены об иммуногенности липопротеина MetQ на модели других инфекционных заболеваний. Например, внутрибрюшинная вакцинация рекомбинантным белком MetQ, сорбированным на гидроксиде алюминия, не предотвращала гибель мышей при в/б заражении *S. pneumoniae*, несмотря на стимуляцию выраженного специфического IgG ответа [33]. Другие исследователи использовали липопротеин MetQ с субъединицей В холерного токсина в качестве адъюванта для интраназальной вакцинации мышей и последующего интраназального заражения *S. pneumoniae* D39. Авторы наблюдали снижение бактериальной колонизации носоглотки, хотя эффект не был статистически достоверен. Иммунизация индуцировала высокие уровни IgG в крови мышей [280]. В случае гонорейной инфекции рекомбинантный MetQ с адъювантом CpG индуцировал протективный иммунный ответ и достоверно снижал колонизацию нижнего генитального тракта мышей *N. gonorrhoeae* [159]. Подкожная иммунизация рекомбинантным липопротеином MetQ, сорбированным на гидроокиси алюминия, стимулировала продукцию IgG в крови мышей, но не предоставляла защиты от подкожного заражения *Y. pestis* 231.

Известно, что белок Fba *S. pneumoniae* иммуногенен для людей и способен вызывать защитный иммунный ответ против пневмококков у мышей [168]. Кроме того, белок Fba *S. suis* является иммуногенным поверхностно-локализованным белком [295].

Сообщалось о возможной роли Fba в иммунном ответе к *Onchocerca volvulus* [178]. Подкожная иммунизация рекомбинантным Fba чумного микроба, сорбированным на гидроокиси алюминия, стимулировала высокие уровни IgG в крови мышей, но не предоставляла защиты от подкожного заражения *Y. pestis* 231.

#### 5.4 Заключение по главе 5

Т.о. в ходе выполнения настоящего раздела диссертационной работы проведено клонирование генов *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* *Y. pestis* в составе векторной плазмиды pET32b(+) в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3). Выделены и

очищены препаративные количества рекомбинантных белков GlnA, Fba, MetQ и HtpG методом аффинной Ni<sup>++</sup>-хелатной хроматографии. Для трех белков Fba, MetQ и HtpG показана способность стимулировать продукцию специфических антител после двукратной подкожной иммунизации беспородных мышей. Установлено отсутствие протективной активности для всех белков при последующем подкожном заражении вирулентным штаммом чумного микроба.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Классической моделью при изучении взаимоотношений с организмами хозяина и переносчика является чумной микроб – *Y. pestis*. Реализация патогенных свойств чумного микроба в организме восприимчивого хозяина требует присутствия целого набора функционально разнонаправленных факторов патогенности, а также обеспечивающих их координированную экспрессию систем регуляции. В основе системного подхода при изучении патогенности и вирулентности *Y. pestis* лежит детальный анализ каждого из этих факторов и комбинаций их сочетаний, что позволяет определять потенциальные молекулярные мишени для иммунопрофилактики и терапии чумы.

Представленные в настоящем исследовании данные имеют общебиологическое значение и направлены на получение новых сведений о факторах избирательной вирулентности полевоочьих штаммов *Y. pestis* и оценки перспективности их использования в качестве молекулярных мишеней для профилактики и терапии чумы.

На первом этапе мы провели селекцию субкультур штаммов, *Y. pestis* subsp. *microti*, вирулентность которых при подкожном заражении морских свинок соответствовала или приближалась к таковой у штаммов основного подвида. После анимализации путем подкожных пассажей 54-х штаммов 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. Затем провели четыре последовательных тестикулярных пассажа микробных культур через организм морских свинок. ГТБ, защищая бактерии от иммунной системы хозяина, позволил именно вирулентным бактериям размножиться с опережением, накапливаться и вызывать генерализованную инфекцию. В ходе выполнения этой части исследования отобрали два штамма *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica* И-3189 и И-2239, вирулентность которых при подкожном заражении морских свинок ( $LD_{50} = 68$  (17–271) КОЕ и  $LD_{50} = 2$  (1–9) КОЕ, соответственно) была близка к таковой для штаммов основного подвида чумного микроба. Полногеномное секвенирование сравниваемых бактериальных субкультур изогенных пар, отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок более чем в  $10^5$  раз, показало отсутствие отличий на уровне нуклеотидных последовательностей геномов, что

свидетельствовало о наличии у чумного микроба механизмов регуляции вирулентности на уровне экспрессии отдельных или групп генов. Выполненный подбор пар штаммов, отличающихся по вирулентности для морских свинок, был необходим для проведения дальнейшего протеомного сравнения.

Следующий этап нашей работы был посвящен определению инактивирующего действия химических реагентов, используемых для выделения белковых препаратов из выращенных на плотных питательных средах вирулентных штаммов *Y. pestis*, для получения безопасных образцов, пригодных после разделения путем двумерного гелелектрофореза в неравновесном градиенте рН для дальнейшего масс-спектрометрического анализа. Экспериментально установлено, что после экспозиции микробной суспензии вирулентных штаммов чумного микроба в течение 10 мин в 15 %-ном растворе трихлоруксусной кислоты достигается полная стерильность исследуемого образца. В ходе исследования оптимизировали условия проведения двумерного гелелектрофореза в неравновесном градиенте рН. Использование двух штаммов *Y. pestis*, содержащего и не содержащего плазмиду pFra, предполагало «запрограммированное» наличие, или отсутствие белков, кодируемых данной плазмидой, что после подтверждения методом масс-спектрометрии, представило удобный инструмент для валидации предложенного метода обеззараживания инфекционного материала, а также приготовления проб для двумерного электрофореза.

Учитывая, что степень экспрессии отдельных генов *in vitro* и *in vivo* может отличаться, на следующем этапе нашего исследования, была предпринята попытка адаптировать предложенный ранее для *B. burgdorferi* и *L. interrogans* технический подход, заключающийся в культивировании вирулентных штаммов в перитонеальной полости морских свинок с использованием камер из диализной мембраны. Две субкультуры (исходная авирулентная для морских свинок и селектированная в ходе тестикулярных пассажей с вирулентностью на уровне подвида *pestis*) каждого из штаммов *Y. pestis* bv. *ulegeica* культивировали в течение двух дней в жидкой питательной среде в диализных камерах, имплантированных в брюшную полость морских свинок. Малый размер пор диализной мембраны позволял питательным веществам из организма хозяина проникать внутрь камеры и препятствовал попаданию антител и эффекторных клеток его иммунной системы. Данная модель была более

близка к реальному инфекционному процессу при чуме. У вирулентных для морских свинок субкультур штаммов *subsp. microti* по сравнению с авирулентными выявили появление шести новых белковых пятен и исчезновение одного, соответствующего бактериоцину – пестицину. С использованием масс спектрометрии идентифицировали следующие белки: белок теплового шока HtpG (WP\_050548832.1), глутаминсинтетаза 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" (глутаминсинтетаза, фруктозо-бисфосфат альдолаза), функционирующим как в цитоплазме, так и на поверхности клетки.

Нокаутный мутагенез генов, кодирующих выбранные белки - кандидаты на роль факторов «избирательной» вирулентности полевочных штаммов чумного микроба с последующей комплементацией мог пролить свет на их вклад в патогенез чумы. Поэтому следующий этап нашего исследования был посвящен получению делеционных мутантов и комплементации генов части из обнаруженных белков, а именно HtpG, GlnA, GlnALG и MetQ.

HtpG (высокотемпературный белок G - *high-temperature protein G*) – бактериальный гомолог высоко консервативного молекулярного шаперона Hsp90 эукариот, играющий важную роль в защите от стресса у многих бактерий. Роль продукта гена *htpG*, кодирующего синтез высокотемпературного белка HtpG прокариот, в патогенезе бактериальных инфекций до настоящего времени остается неясной. 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). 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*. Штаммы *Y. pestis* с делецией *htpG* проявляли чувствительность к температурному и оксидативному стрессу, обладая фенотипом общим для *htpG* мутантов других бактериальных видов. Однако мутанты не были чувствительны к осмотическому стрессу и комплементу сыворотки крови человека. Утрата чумным микробом способности к синтезу *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.

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. Известно, что приспособительная реакция к изменениям внеклеточного содержания азота у бактерий координируется двухкомпонентной системой GlnLG. 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 два набора изогенных мутантов: EV $\Delta$ *glnA*, EV $\Delta$ *glnALG*, 231 $\Delta$ *glnA* и 231 $\Delta$ *glnALG*. Созданные мутантные штаммы приобрели ауксотрофность по глутамину и не росли на плотных и в жидких питательных средах в его отсутствии. Дефект в биосинтезе глутамина и потенциально ассоциированное с этим нарушение метаболизма азота, может повреждать взаимоотношения патоген-хозяин. Утрата чумным микробом способности к синтезу GlnA не оказывала влияния на вирулентность и средние сроки жизни мышей и морских свинок при подкожном способе заражения. Однако  $\Delta$ *glnALG* штамм 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. Таким образом, проведенный цикл исследований позволил выявить *glnALG* - новую потенциальную молекулярную мишень для создания аттенуированных штаммов – кандидатов в живые чумные вакцины чумы.

Поглощение и синтез метионина необходимы для вирулентности многих бактериальных патогенов. Штаммы основного подвида чумного микроба не способны к самостоятельному синтезу метионина вследствие делеции одного нуклеотида (-G) в позиции 988 гена *metB*, кодирующего цистетионин- $\gamma$ -синтазу. АВС-транспортеры являются основными системами поглощения метионина у бактерий. Проведенный биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей выявил высокий уровень сходства между субстрат-связывающим доменом АВС-транспортера метионина MetQ чумного микроба, энтеропатогенных иерсиний, а также *E. coli*. Сайт-направленный мутагенез гена *metQ* в вакцинном штамме EV НИИЭГ, а также в

вирулентном штамме *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 позволили получить мутанты EV $\Delta$ *metQ* и 231 $\Delta$ *metQ*. Введение сконструированного вектора pACYC-*metQ* в штамм *Y. pestis* 231 $\Delta$ *metQ* привело к комплементации мутации. Штаммы *Y. pestis* с делецией *metQ* отставали по скорости роста в жидкой питательной среде спустя 6 ч после начала выращивания, что свидетельствует о недостаточности концентрации метионина для поддержания роста *in vitro* при условии нарушения его высокоаффинного транспорта. При этом мутанты не были чувствительны к комплементу сыворотки крови человека. Локализацию MetQ на наружной мембране подтвердили в вестерн-блоттинге препаратов наружной мембраны штамма дикого типа с антителами, полученными после иммунизации мышей рекомбинантным белком MetQ. Делеция гена *metQ* приводила к аттенуации штамма *Y. pestis* 231 как для мышей, так и для морских свинок, а комплементация восстанавливала вирулентность. Таким образом, проведенный цикл исследований позволил выявить *metQ* - новую потенциальную молекулярную мишень для лечения чумы.

Штамм, дефектный по гену *fba*, получить не удалось, что косвенно может свидетельствовать о летальности или условной летальности данной мутации для чумного микроба.

В ходе выполнения следующего этапа нашего исследования, направленного на изучение вклада белков GlnA, Fba, HtpG и липопротеина MetQ в иммуногенез чумы, проведено клонирование генов *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* *Y. pestis* в составе векторной плазмиды pET32b(+) в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3). Выделены и очищены препаративные количества рекомбинантных белков GlnA, Fba, MetQ и HtpG методом аффинной Ni<sup>++</sup>-хелатной хроматографии. Для трех белков Fba, MetQ и HtpG показана способность стимулировать продукцию специфических антител после двукратной подкожной иммунизации беспородных мышей. Установлено отсутствие протективной активности для всех белков при последующем подкожном заражении вирулентным штаммом чумного микроба.

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 феномен для патогенеза чумы, и как теоретические знания о конкретных феноменах могут быть использованы в совершенствовании профилактики и лечения 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<sub>50</sub> 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, фруктозобисфосфат альдолаза Fba; WP\_038931127.1, субстрат-связывающий белок ABC-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 рН 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 231Δ*glnALG* на предмет его соответствия критериям отбора вакцинных штаммов чумного микроба.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ  
И ТЕРМИНОВ

а.о. – аминокислотный остаток

АТФ – аденозинтрифосфат

ГС – глутаминсинтетаза

ГКПБ - Государственная коллекция патогенных бактерий

ГКПМ – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов

ГТБ – гемато-тестикулярный барьер

ДСН-ПААГ – додецилсульфат натрия-полиакриламидный гель

ИПТГ - изопропил- $\beta$ -Д-тиогалактопиранозид

кДа- килодальтон

КОЕ – колониеобразующая единица

НИ – настоящее исследование

НИР – научно-исследовательская работа

НИИЭГ – Научно-исследовательский институт экспериментальной гигиены

НЧС - нормальная человеческая сыворотка

МЖК СтавНИПЧИ – музей живых культур Ставропольского Научно-исследовательского противочумного института

МЖК ИркНИПЧИ – музей живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института

тНЧС – термоинактивированная нормальная человеческая сыворотка

РостНИПЧИ – Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

СП – Санитарно-эпидемиологическими правила

ФБУН ГНЦПМБ – Федеральное бюджетное учреждение науки государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии

ФГБУН НЦБМТ ФМБА – Федеральное государственное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медику-биологического агентства»

ВНИ – среда, содержащая сердечно-мозговой экстракт (Brain heart infusion)

Ar<sup>R(S)</sup> – устойчивость (или чувствительность) к ампициллину

*bla* – ген, определяющий устойчивость к ампициллину

BLASTp – Basic Local Alignment Search Tool protein

BSL – biosafety level

bv. – биовар

Caf1 – капсульный антиген чумного микроба

*cat* – ген, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу

Cm<sup>R(S)</sup> – устойчивость (или чувствительность) к хлорамфениколу

DCL – доза, летальная для 100 % животных (*dosis certe letalis*)

*in vitro* – эксперимент “в пробирке”, без использования животных

*in vivo* – эксперимент на животных

Fra<sup>+</sup> / Fra<sup>-</sup> – способность к синтезу капсульного антигена “фракция I” и образованию капсулы или ее отсутствие

*kan* – ген, кодирующий аминогликозидфосфотрансферазу

Km<sup>R(S)</sup> – устойчивость (или чувствительность) к канамицину

LCR – (low calcium response) потребность в ионах кальция для роста *in vitro* при температуре 37 °C в сочетании со способностью продуцировать при этой же температуре V антиген и белки внешних мембран

LB – Luria Bertani broth medium

LD<sub>50</sub> – доза, летальная для 50 % животных (*dosis letalis 50*)

MLST – Multilocus sequence typing

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NEPHGE - non-equilibrium pH gradient electrophoresis

Pgm – сочетанное проявление фенотипов Hms и Pst<sup>S</sup>

Pla – активатор пламиногена, определяющий фибринолитическую и плазмокоагулазную активности возбудителя чумы

Pst – признак продукции пестицина

SAM – S-aденозилmетионин

subsp. – подвид (“subspecies”)

TEMED – Tetramethylethylenediamine

Tox (FII, Ymt) – признак синтеза “мышинного” токсина (“fraction II”, *Yersinia murine toxin*)

TLR-2 – Toll-Like Receptor

TraSH – transposon site hybridization

Ymt (FII) – "мышинный" токсин ("fraction II", *Yersinia murine toxin*)

Yops – белки внешних мембран иерсиний (Yersinia outer membrane proteins)

Yscs – компоненты аппарата, отвечающего за секрецию Yops

2DE – 2-dimensional electrophoresis

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Анисимов, А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных сообществ. Сообщение 1 / А.П. Анисимов // Молекул. генетика. – 2002а. - № 3. – Р. 3-23.1
2. Анисимов, А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 2 / А.П. Анисимов // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. - 2002. - № 3. - Р. 3-23.
3. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях/ И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. - Л.: Государственное издательство медицинской литературы, 1962. - Р. 85-104.
4. Гинсбург, Н.Н. Живые вакцины. История, элементы теории, практика / Н.Н. Гинсбург. - М.: Медицина, 1969. Р. 304-313.
5. Еремин, Р.А. Изучение электростимулируемой трансформации ДНК гетерогенных и собственных плазмид в клетки чумного микроба / Р.А. Еремин, И.Г. Дроздов, И.Н. Ежов // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. – Саратов, 1991. – Р. 55-62.
6. Козлов, М.П. Чума (природная очаговость, эпизоотология, эпидемиологические проявления) / М.П. Козлов. - М.: Медицина, 1979. – 192 с.
7. Кокушкин, А.М. Социальные и биологические аспекты эпидемиологии чумы: дисс. ... докт. мед. наук / Александр Михайлович Кокушкин. - Саратов, 1995. – 392 с.
8. Кокушкин, А.М. Трансформирующая активность плазмид чумного микроба: специальность 03.00.07: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Кокушкин Александр Михайлович; РосНИПЧИ «Микроб». – Саратов, 1983. – 183 с.
9. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
10. Патент RU № 2019140904 Способ сенсibilизации планшета для иммуноферментного анализа нерастворимыми белковыми антигенами / П.Х. Копылов, Е.А. Красильникова, А.Р. Трунякова, Р.В. Дентовская, А.П. Анисимов. – 2020.
11. Патент RU № 2510825. Способ получения препарата на основе вакцинного штамма чумного микроба: 2012. Оpubл. 10.04.2014, Бюл. № 10.

12. Achouak, W. Multiple facets of bacterial porins / W. Achouak, T. Heulin, J.M. Pagès // *Protein Sci.* – 2001.-. Vol. 199, no. 1. - P. 1-7.
13. Achtman, M. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* / M. Achtman, K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, E. Carniel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1999. - Vol. 96. - P. 14043-14048.
14. Ackermann N. Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica* / N. Ackermann, M. Tiller, G. Anding, A. Roggenkamp, J. Heesemann // *Journal of bacteriology.* – 2008. - Vol. 190, P. 5031-5043.
15. Akins, D.R. A new animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host-adapted state / D.R. Akins, K.W. Bourell, M.J. Caimano, M.V. Norgard, J.D. Radolf // *J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol. 101(10). – P. 2240-50.
16. Aliprantis, A.O. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2 / A.O. Aliprantis, R.B. Yang, M.R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J.D. Radolf, G.R. Klimpel, P. Godowski, A. Zychlinsky // *Science.* – 1999. - Vol. 285. - P. 736-739.
17. Anderson, E.S. The manganese transporter MntH is a critical virulence determinant for *Brucella abortus* 2308 in experimentally infected mice / E.S. Anderson, J.T. Paulley, J.M. Gaines, M.W. Valderas, D.W. Martin, E. Menscher, T.D. Brown, C.S. Burns, R.M. Roop // *Infect. Immun.* – 2009. - Vol. 77. - P. 3466–3474.
18. Andrews, G.P. Protective efficacy of recombinant *Yersinia* outer proteins against bubonic plague caused by encapsulated and non-encapsulated *Yersinia pestis* / G.P. Andrews, S.T. Strachan, G.E. Benner // *Infect. Immun.* – 1999. - Vol. 67. - P. 1533-1537.
19. Anisimov, A.P. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein / A.P. Anisimov, S.V. Dentovskaya, E.A. Panfertsev, T.E. Svetoch, B.W. Segelke, A. Zemla, M.V. Telepnev, V.L. Motin // *Infect. Genet. Evol.* – 2010. – Vol. 10. –P. 137-145.
20. Anisimov, A.P. Factors providing the blocking activity of *Yersinia pestis* / A.P. Anisimov // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* – 1999. - Vol. 4. - P. 11-15.
21. Anisimov, A.P. Intraspecies and temperature-dependent variations in susceptibility of *Yersinia pestis* to the bactericidal action of serum and to polymyxin B / A.P. Anisimov, S.V. Dentovskaya, G.M. Titareva, I.V. Bakhteeva, R.Z. Shaikhutdinova, S.V.

Balakhonov, B. Lindner, N.A. Kocharova, S.N. Senchenkova, O. Holst, G.B. Pier, Y.A. Knirel // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73. – P. 7324–7331.

22. Anisimov, A.P. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* / A.P. Anisimov, L.E. Lindler, G.B. Pier // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2004. – Vol. 17. – P. 434–464.

23. Anisimov, A.P. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics / A.P. Anisimov, K.K. Amoako / *J. Med. Microbiol.* – 2006. - Vol. 55. - P. 1461-1475.

24. Ansong, C. A multi-omic systems approach to elucidating *Yersinia* virulence mechanisms / C. Ansong, A.C. Schrimpe-Rutledge, H.D. Mitchell, S. Chauhan, M.B. Jones, Y.M. Kim, K. McAteere, B.L. Deatherage Kaisera, J.L. Duboisf, H.M. Brewerg, B.C. Frankd, J.E. McDermottb, T.O. Metz, S.N. Peterson, R.D. Smitha, V.L. Motinc, J.N. Adkins // *Molecular bioSystems.* – 2013. – Vol. 9. – No. 1. – P. 44-54. DOI: 10.1039/c2mb25287b.

25. Arirachakaran, P. Manganese affects *Streptococcus mutans* virulence gene expression / P. Arirachakaran, E. Benjavongkulchai, S. Luengpailin, D. Ajdić, J.A. Banas // *Caries Res.* – 2007. - Vol. 41. - P. 503-11.

26. Auerbuch, V. Ena/VASP proteins contribute to *Listeria monocytogenes* pathogenesis by controlling temporal and spatial persistence of bacterial actin-based motility / V. Auerbuch, J.J. Loureiro, F.B. Gertler, J.A. Theriot, D.A. Portnoy // *Mol. Microbiol.* – 2003. - Vol. 49. - P. 1361-1375.

27. Aurass, P. *glnA* truncation in *Salmonella enterica* results in a small colony variant phenotype, attenuated host cell entry, and reduced expression of flagellin and SPI-1-associated effector genes / P. Aurass, J. Düvel, S. Karste, U. Nübel, W. Rabsch, A. Flieger // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2018. – Vol. 84. – No. 2. DOI: 10.1128/AEM.01838-17

28. Bardwell, J.C. Ancient heat shock gene is dispensable / J.C. Bardwell, E.A. Craig // *J. Bacteriol.* – 1988. – Vol. 170. – P. 2977–2983.

29. Bardwell, J.C. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli* / J.C. Bardwell, E.A. Craig // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 1987. – Vol. 84. – P. 5177–5188.

30. Barnes, M.G. BrkA Protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition / M.G. Barnes, A.A. Weiss // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 3067-3072.

31. Bartra, S.S. Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein / S.S. Bartra, K.L. Styer, D.M. O'Bryant, M.L.

Nilles, B.J. Hinnebusch, A. Aballay, G.V. Plano // *Infect. Immun.* – 2008. - Vol. 76. - P. 612-622.

32. Bartra, S.S. The outer membrane protein A (OmpA) of *Yersinia pestis* promotes intracellular survival and virulence in mice / S.S. Bartra, X. Gong, C.D. Lorica, C. Jain, M.K. Nair, D. Schifferli, L. Qian, Z. Li, G.V, Plano K. Schesser // *Microb. Pathog.* – 2012. - Vol. 52. - P. 41-46.

33. Basavanna, S. The effects of methionine acquisition and synthesis on *Streptococcus pneumoniae* growth and virulence / S. Basavanna, S. Chimalapati, A. Maqbool, B. Rubbo, J. Yuste, R.J. Wilson, A. Hosie, A.D. Ogunniyi, J.C. Paton, G. Thomas, J.S. Brown // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – No. 1. – P. e49638. DOI: 10.1371/journal.pone.0049638.

34. Bearden, S.W. An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11 / S.W. Bearden, T.M. Staggs, R.D. Perry // *J. Bacteriol.* – 1998. - Vol. 180. - P. 1135–1147.

35. Bearden, S.W. Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase / S.W. Bearden, C. Sexton, J. Pare, J.M. Fowler, C.G. Arvidson, L. Yerman, R.E. Viola, R.R. Brubaker // *Microbiology.* - 2009. -Vol. 155, P. 198–209.

36. Bearden, S.W. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague / S.W. Bearden, R.D. Perry // *Mol. Microbiol.* – 1999. - Vol. 32. - P. 403–414.

37. Behrens, S. The role of SurA factor in outer membrane protein transport and virulence / S. Behrens, S. Kneip // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2010. - Vol. 300. - P. 421-428.

38. Behrens, S. The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity / S. Behrens, R. Maier, H. de Cock, F.X. Schmid, C.A. Gross // *EMBO J.* – 2001. - Vol. 15. - P. 285-294.

39. Berry, A.M. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae* / A.M. Berry, J. Paton // *Infect. Immun.* – 1996. - Vol 64. - P. 5255–5262.

40. Bierne, H. WASP-related proteins, Abi1 and Ena/VASP are required for *Listeria* invasion induced by the Met receptor / H. Bierne, H. Miki, M. Innocenti, G. Scita, F.B. Gertler, T. Takenawa // *J Cell Sci.* – 2005. - Vol. 118. -P. 1537-1547.

41. Blau, K. Flamingo cadherin: a putative host receptor for *Streptococcus pneumoniae* / K. Blau, M. Portnoi, M. Shagan, A. Kaganovich, S. Rom, D. Kafka, V. Chalifa

Caspi, A. Porgador, N. Givon-Lavi, J.M. Gershoni, R. Dagan, M.Y. Nebenzahl // *The Journal of infectious diseases*. – 2007. – Vol. 195. – No. 12. – P. 1828-1837.

42. Blaylock, B. YopR impacts type III needle polymerization in *Yersinia* species / B. Blaylock, B.J. Berube, O. Schneewind // *Mol. Microbiol.* – 2010. - Vol. 75. - P. 221–229.

43. Bobrov, A.G. Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis* / A.G. Bobrov, O. Kirillina, D.A. Ryjenkov, Waters C.M., P.A. Price, J.D. Fetherston // *Mol. Microbiol.* – 2011. - Vol. 79. - P. 533-551.

44. Bobrov, A.G. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to Zinc acquisition and the development of lethal septicemic plague in mice / A.G. Bobrov, O. Kirillina, J.D. Fetherston, M.C. Miller, J.A. Burlison, R.D. Perry // *Mol. Microbiol.* – 2014. - Vol. 93. - P. 759–775.

45. Bobrov, A.G. Zinc transporters YbtX and ZnuABC are required for the virulence of *Yersinia pestis* in bubonic and pneumonic plague in mice / A.G. Bobrov, O. Kirillina, M.Y. Fosso, J.D. Fetherston, M.C. Miller, T.T. van Cleave // *Metallomics*. – 2017. - Vol. 21. - P. 757–772.

46. Boyer, E. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / E. Boyer, I. Bergevin, D. Malo, P. Gros, M.F.M. Cellier // *Infect. Immun.* – 2002. - Vol. 70. - P. 6032–6042.

47. Braibant, M. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis* / M. Braibant, P. Gilot, J. Content // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2000. – Vol. 24. – No. 4. – P. 449-467.

48. Briles, D.E. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* / D.E. Briles, E. Ades, J.C. Paton, J.S. Sampson, G.M. Carlone, R.C. Huebner, A. Virolainen, E. Swiatlo, S.K. Hollingshead // *Infection and immunity*. – 2000. – Vol. 68. – No. 2. – P. 796-800.

49. Brubaker, R.R. Factors promoting acute and chronic diseases caused by *Yersinia* // R.R. Brubaker // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1991. – Vol. 4. – P. 309-324.

50. Burrows, T.W. Host specificity of Brazilian strains of *Pasteurella pestis* / T.W. Burrows, W.A. Gillett // *Nature*. - 1971. - Vol. 229. – P. 51-52.

51. Burrows, T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* / T.W. Burrows // Nature. – 1957. - Vol. 179. - P 1246-1247.
52. Busby, S. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP) / S. Busby, R.H. Ebright // J. Mol. Biol. – 1999. - Vol. 293. - P. 99-213.
53. Butler, T. Experimental *Yersinia pestis* infection in rodents after intragastric inoculation and ingestion of bacteria / T. Butler, Y.S. Fu, L. Furman, C. Almeida, A. Almeida // Infect. Immun. – 1982. -Vol. 36 - P. 1160-1167.
54. Caimano, M.J. Generation of Mammalian Host-Adapted *Borrelia burgdorferi* by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats / M.J. Caimano // Methods Mol Biol. – 2018. – Vol. 1690. – P. 35-45.
55. Cao, Z.F. Standardization for sharing and utilization of Chinese genetic resources / Z.F. Cao, Y.R. Cao, L.G. Ma, Z.Q. Peng, X.H. Hu, Y.Y. Wang, J.J. Xu, X. Ma // Yi Chuan= Hereditas. – 2008. – Vol. 30. – No. 1. – C. 51-58.
56. Cavanaugh, D.C. The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of fleaborne plague // D.C. Cavanaugh, R. Randall // J. Immunol. – 1959. - Vol. 83. - P. 348-371.
57. Chandra, H. Glutamine synthetase encoded by *glnA-1* is necessary for cell wall resistance and pathogenicity of *Mycobacterium bovis* / H. Chandra, S.F. Basir, M. Gupta, N. Banerjee // Microbiology. - 2010. - Vol. 156. – P. 3669–3677.
58. Chanyangam, M. Contribution of a 28-kilodalton membrane protein to the virulence of *Haemophilus influenzae* / M. Chanyangam, A.L. Smith, S.L. Moseley, M. Kuehn, P. Jenny // Infect. Immun. – 1991. – Vol. 59. – No. 2. – P. 600-608.
59. Chapman, E. Global aggregation of newly translated proteins in an *Escherichia coli* strain deficient of the chaperonin GroEL / E. Chapman, G.W. Farr, R. Usaite, K. Furtak, W.A. Fenton, T.K. Chaudhuri, E.R. Hondorp, R.G. Matthews, S.G. Wolf, J.R. Yates, M.Pypaert, A.L. Horwich // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103. – No. 43. – P. 15800-15805. DOI: 10.1073/pnas.0607534103.
60. Charnetzky, W.T. Survival and growth of *Yersinia pestis* within macrophages and an effect of the loss of the 47-megadalton plasmid on growth in macrophages / W.T. Charnetzky, W.W. Shuford // Infect. Immun. – 1985. - Vol. 47. - P. 234-241.

61. Chavali, A.K. A metabolic network approach for the identification and prioritization of antimicrobial drug targets / A.K. Chavali, K.M. D'Auria, E.L. Hewlett, R.D. Pearson, J.A. Papin // Trends in microbiology. – 2012. – Vol. 20. – No. 3. – P. 113-123.
62. Chen, Y. Homology analysis and cross-immunogenicity of OmpA from pathogenic *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* / Y. Chen, R. Duan, X. Li, K. Li, J. Liang, C. Liu, H. Qiu, Y. Xiao, H. Jing, X.Wang // Mol. Immunol. – 2015. - Vol. 68. - P. 290-299.
63. Chen, Z. Quorum sensing affects virulence-associated proteins F1, LcrV, KatY and pH6 etc. of *Yersinia pestis* as revealed by protein microarray-based antibody profiling / Z. Chen, B. Li, J. Zhang, L. Qin, D. Zhou, Y. Han, Z. Du, Z. Guo, Y. Song, R. Yang // Microbes and infection. – 2006. – Vol. 8. – No. 9-10. – P. 2501-2508. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.06.007.
64. Cherepanov, P.P. Disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant / P.P. Cherepanov, W. Wackernagel // Gene. – 1995 – Vol. 158. – P. 9-14.
65. Choi, S. Identification of the *Vibrio vulnificus* htpG gene and its influence on cold shock recovery / S. Choi, K. Jang, H.J. Yun D.H., Kang // J. Microbiol. 2012 – Vol. 50. – P. 707–711.
66. Chromy, B.A. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence / B.A. Chromy, M.W. Choi, G.A. Murphy, A.D. Gonzales, C.H. Corzett, B.C. Chang, J.P. Fitch, S.L. McCutchen-Maloney // Journal of bacteriology. – 2005. – Vol. 187. – No. 23. – P. 8172-8180. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005
67. Cohen, S. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro* / S. Cohen, A. Chang, H. Boyer, R. Heling // Proc Natl Acad Sci. – 1973. – Vol. 70. – P. 3240-3244.
68. Corbin, B.D. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses / B.D. Corbin, E.H. Seeley, A. Raab, J. Feldmann, M.R. Miller, V.J. Torres // Science. – 2008. - Vol. 319. - P. 962–965.
69. Dang, W. HtpG is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda* / W. Dang, Y.H. Hu, L. Sun // Vet. Microbiol. – 2011. – Vol. 152. – P. 394–400.

70. Darwin, A.J. Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis / A.J. Darwin, V.L. Miller // *Molecular microbiology*. – 1999. – Vol. 32. – No. 1. – P. 51-62.
71. Datsenko, K.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K.A. Datsenko, B.L. Wanner // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97. – № . 12. – P. 6640-6645.
72. de Godoy, L.M. Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system / L.M. de Godoy, J.V. Olsen, G.A. de Souza, G. Li, P. Mortensen, M. Mann // *Genome biology*. – 2006. – Vol. 7. – No. 6. – P. 1-15. DOI: 10.1186/gb-2006-7-6-r50.
73. Delcour A. Function and modulation of bacterial porins: insight from electrophysiology / A. Delcour // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. - Vol. 151. - P. 115-125.
74. Dentovskaya, S. Functional characterization and biological significance of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide biosynthesis genes / S. Dentovskaya, A. Anisimov, A. Kondakova // *Biochemistry (Moscow)* – 2011. – Vol. 76(7). – P. 808-822.
75. Dentovskaya, S.V. Selective protective potency of *Yersinia pestis* *AnlpD* mutants / S.V. Dentovskaya, S.A. Ivanov, P.Kh. Kopylov, R.Z. Shaikhutdinova, M.E. Platonov, T.I. Kombarova, T.V. Gapelchenkova, S.V. Balakhonov, A.P. Anisimov // *Acta Naturae*. – 2015. - Vol. 7, no. 1. - P. 24.
76. Dentovskaya, S.V. Two Isoforms of *Yersinia pestis* Plasminogen Activator Pla: Intraspecies Distribution, Intrinsic Disorder Propensity, and Contribution to Virulence / S.V. Dentovskaya, M.E. Platonov, T.E. Svetoch, P.Kh. Kopylov, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, R.Z. Shaikhutdinova, L.V. Kolombet, S. Chauhan, V.G. Ablamunits // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. - e0168089.
77. Derbise, A. Inheritance of the lysozyme inhibitor Ivy was an important evolutionary step by *Yersinia pestis* to avoid the host innate immune response / A. Derbise, F. Pierre, M. Merchez // *J. Infect. Dis.* – 2013 - Vol. 207. - P. 1535-1543.
78. Dintilhac, A. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *Adc* and *PsaA* mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases / A. Dintilhac, G. Alloing, C. Granadel, J.P. Claverys // *Mol. Microbiol.* – 1997. - Vol. 25. - P. 727–739.

79. Donnenberg, M.S. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector / M.S. Donnenberg, J.B. Kaper // *Infect Immun.* – 1991. – Vol. 59. – No. 12. – P. 4310-4317.
80. Dreyfus, L.A. Consequences of aspartase deficiency in *Yersinia pestis* / L.A. Dreyfus, R.R. Brubaker // *J Bacteriol.* - 1978. - Vol. 136(2). - P 757-764.
81. Dukuzumuremyi, J.M. The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor / J.M. Dukuzumuremyi, R. Rosqvist, B. Hallberg, B. Akerstrom, H. Wolf-Watz, K. Schesse // *J Biol. Chem.* – 2000. - Vol. 275. - P. 35281-35290.
82. Ejim, L.J. Cystathionine  $\beta$ -lyase is important for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / L.J. Ejim, V.M. D'Costa, N.H. Elowe, J.C. Loredano-Osti, D. Malo, G.D. Wright // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – No. 6. – P. 3310-3314.
83. Ellison, D.W. Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Shielia Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa / D.W. Ellison, T.R. Clark, D.E. Sturdevant, K. Virtaneva, S.F. Porcella, T. Hackstadt // *Infect Immun.* – 2008. – Vol. 76(2). - 542–550.
84. Erova, T.E. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine / T.E. Erova, J.A. Rosenzweig, J. Sha, G. Suarez, J.C. Sierra, M.L. Kirtley, C.J. van Lier, M.V. Telepnev, V.L. Motin, A.K. Chopra // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2013. - Vol. 20, no. 2. - P. 227-238.
85. Fang, F. The heat shock gene, *htpG*, and thermotolerance in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803 / F. Fang, S.R. Barnum // *Curr Microbiol.* – 2003. – Vol. 47. – P. 341-346.
86. Felek, S. Contributions of chaperone/usher systems to cell binding, biofilm formation and *Yersinia pestis* virulence // S. Felek, J.J. Jeong, L.M. Runco, S. Murray, D.G. Thanassi, E.S. Krukoniis // *Microbiology.* – 2011. - Vol. 157. - P. 805-818.
87. Felek, S. The *Yersinia pestis* Ail protein mediates binding and Yop delivery to host cells required for plague virulence / S. Felek, E.S. Krukoniis // *Infect. Immun.* – 2009. - Vol. 77 – P. 825-836.
88. Felek, S. The *Yersinia pestis* autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation / S. Felek, M.B. Lawrenz, E.S. Krukoniis // *Microbiology.* – 2008. - Vol. 154. - P. 1802-1812.

89. Felek, S. Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence / S. Felek, T.M. Tsang, E.S. Krukoniš // *Infect. Immun.* – 2010. - Vol. 78. - P. 4134-4150.
90. Ferla, M.P. Bacterial methionine biosynthesis / M.P. Ferla, W.M. Patrick // *Microbiology.* – 2014. – Vol. 160. – No. 8. – P. 1571-1584.
91. Fisher, S.H. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! // *Mol. Microbiol.* – 1999. – Vol. 32. – No. 2. – P. 223-232.
92. Fong, J.C. Interplay between cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein and cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholerae* biofilm formation / J.C. Fong, F.H. Yildiz / *J. Bacteriol.* – 2008. - Vol. 190. - P. 6646-6659.
93. Fontecave, M. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste / M. Fontecave, M. Atta, E. Mulliez // *Trends. Biochem. Sci.* – 2004. – Vol. 29. – No. 5. – P. 243-249. doi:10.1016/j.tibs.2004.03.007
94. Foote, J.W. Albumin bound and  $\alpha_2$ -macroglobulin bound zinc concentrations in the sera of healthy adults // J.W. Foote, H.T. Delves // *J. Clin. Pathol.* – 1984. - Vol. 37. - P. 1050–1054.
95. Forman, S. yadBC of *Yersinia pestis*, a new virulence determinant for bubonic plague // S. Forman, C.R. Wulff, T. Myers-Morales, C. Cowan, R.D. Perry, S.C. Straley // *Infect. Immun.* – 2008. - Vol. 76. – P. 578-587.
96. 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, Y.Q. Cheng, R.D. Perry // *Biometals.* – 2010. – Vol. 23. – No. 2. – P. 275-294.
97. Frydman, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones / J.Frydman // *Annu. Rev. Biochem.* – 2001. – Vol. 70. – P. 603–648.
98. Fu, H. Outer membrane protein A-deficient *Escherichia coli* activates neutrophils to produce superoxide and shows increased susceptibility to antibacterial peptides / H. Fu, A.A. Belaaouaj, C. Dahlgren, J. Bylund // *Microbes Infect.* – 2003. - Vol. 5. - P. 781–788.
99. Gage, K.L. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research / K.L. Gage, M.Y. Kosoy // *Annu. Rev. Entomol.* – 2005. -Vol. 50. - P. 505-528.

100. Galindo, C.L. Comparative global gene expression profiles of wild-type *Yersinia pestis* CO92 and its braun lipoprotein mutant at flea and human body temperatures / C.L. Galindo, J. Sha, S.T. Moen, S.L. Agar, M.L. Kirtley, S.M. Foltz, L.J. McIver, E.V. Kozlova, H.R. Garner, A.K. Chopra // *Comp. Funct Genomics*. - 2010. - doi: 10.1155/2010/342168.

101. Garcie, C. The bacterial stress-responsive Hsp90 chaperone (HtpG) is required for the production of the genotoxin colibactin and the siderophore yersiniabactin in *Escherichia coli* / C. Garcie, S. Tronnet, A. Garénaux, A.J. McCarthy, A.O. Brachmann, M. Pénary, S. Houle, J.P. Nougayrède, J. Piel, P.W. Taylor, C.M. Dozois, P. Genevaux, E. Oswald, P. Martin // *J. Infect. Dis.* 2016. – Vol. 214. – P. 916–924.

102. Graham, A.I. Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: Roles for high-affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins // A.I. Graham, S. Hunt, S.L. Stokes, N. Bramall, J. Bunch, A.G. Cox // *J. Biol. Chem.* – 2009. - Vol. 284. - P. 18377–18389.

103. Grassmann, A.A. Generation of Mammalian Host-adapted *Leptospira interrogans* by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats / AA Grassmann, AJ McBride, JE Nally, MJ. Caimano // *Bio Protoc.* – 2015. – Vol. 5. – P. e1536.

104. Guisbert, E. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response / E. Guisbert, T. Yura, V.A. Rhodius, C.A. Gross // *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* – 2008. – Vol. 72. – P. 545–54.

105. Hakansson, S. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane / S. Hakansson, E.E. Galyov, R. Rosqvist, H. Wolf-Watz // *Mol. Microbiol.* - 1996/ - Vol. 20, no. 3. - P. 593-603.

106. Hammond, S.M. A new class of synthetic antibacterials acting on lipopolysaccharide biosynthesis / S.M. Hammond, A. Claesson, A.M. Jansson, L.G. Larsson, B.G. Pring, C.M. Town, B. Ekstrom. // *Nature.* – 1987. – Vol. 327. – No. 6124. – P. 730-732.

107. Haneda, T. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection / T. Haneda, Y. Ishii, H. Danbara, N. Okada // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. - Vol. 297. - P. 241-249.

108. Hantke, K. Bacterial zinc uptake and regulators / K. Hantke // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2005. - Vol. 8. - P. 196–202.
109. Hantke, K. Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the mureinlipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane/ K. Hantke, V. Braun // *Eur. J. Biochem.* - 1973. - Vol. 34. - P. 284-296.
110. Hartman, C.E. Modulating *Salmonella* Typhimurium's response to a changing environment through bacterial enhancer-binding proteins and the RpoN regulon / CE Hartman, DJ Samuels, AC Karls. // *Front Mol Biosci.* - 2016. – Vol. 3. – P. 41.
111. Hayashi, S. Lipoproteins in bacteria / S. Hayashi, H.C. Wu // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1990. - Vol. 22. - P. 451-71.
112. He, J. Role of *Porphyromonas gingivalis* FeoB2 in metal uptake and oxidative stress protection / J. He, H. Miyazaki, C. Anaya, F. Yu, W.A. Yeudall, J.P. Lewis // *Infect. Immun.* – 2006. - Vol. 74. - P. 4214–4223.
113. Hecker, M. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis* / M. Hecker, W. Schumann, V. Uwe // *Mol. Microbiol.* – 1996. – Vol. 19. – P. 417–428.
114. Hensel, M. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection / M. Hensel, J.E. Shea, C. Gleeson, M.D. Jones, E. Dalton, D.W. Holden. // *Science.* – 1995. – Vol. 269. – No. 5222. – P. 400-403.
115. Heurlier, K. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa* / K. Heurlier, V. Denervaud, D. Haas // *International journal of medical microbiology.* – 2006. – Vol. 296. – No. 2-3. – P. 93-102. DOI: 10.1016/j.ijmm.2006.01.043.
116. Hinnebusch, B.J. Biofilm-dependent and biofilm-independent mechanisms of transmission of *Yersinia pestis* by fleas / B.J. Hinnebusch // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. - Vol. 954. - P. 237-243.
117. Hinnebusch, B.J. Transmission factors: *Yersinia pestis* genes required to infect the flea vector of plague / B.J. Hinnebusch // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2003. - Vol. 529. - P. 55-62.
118. Hirano, H. Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient tube gels / H. Hirano, H. Kawasaki, H. Sassa // *Electrophoresis.* – 2000. – Vol. 21. – P. 440-445.
119. Hixson, K.K. Biomarker candidate identification in *Yersinia pestis* using organism-wide semiquantitative proteomics / K.K. Hixson, J.N. Adkins, S.E. Baker, R.J.

Moore, B.A. Chromy, R.D. Smith, S.L. McCutchen-Maloney, M.S. Lipton // Journal of proteome research. – 2006. – Vol. 5. – No. 11. – P. 3008-3017. DOI: 10.1021/pr060179y.

120. Hood, M.I. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface / M.I. Hood, E.P. Skaar // Nat. Rev. Microbiol. – 2012. - Vol. 10. - P. 525–537.

121. Hossain, M.M. Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress / M.M. Hossain, H. Nakamoto // Curr. Microbiol. – 2003. – Vol. 46. – Vol. 70–76.

122. Ichikawa, J.K. A gene at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome encodes a lipoprotein with unusual amino acid repeat sequences / J.K. Ichikawa, C. Li, J. Fu, S. Clarke // J. Bacteriol. – 1994. - Vol. 176. - P. 1630-1638.

123. Ikeda, T.P. *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation / T.P. Ikeda, A.E. Shauger, S. Kustu // J. Mol. Biol. – 1996. – Vol. 259. – No. 4. – P. 589-607.

124. Jabbour, R.E. Identification of *Yersinia pestis* and *Escherichia coli* strains by whole cell and outer membrane protein extracts with mass spectrometry-based proteomics / R.E. Jabbour, M.M. Wade, S.V. Deshpande, M.F. Stanford, C.H. Wick, A.W. Zulich, A.P. Snyder // Journal of proteome research. – 2010. – Vol. 9. – No. 7. – P. 3647-3655. DOI: 10.1021/pr100402y.

125. Jacob, A. The role of the complement cascade in endotoxin-induced septic encephalopathy / A. Jacob, L.K. Hensley, B.D. Safratowich, R.J. Quigg, J.J. Alexander // Lab. Invest. – 2007. - Vol. 87. - P. 1186-1194.

126. Janssen, W.A. Plague bacillus: survival within host phagocytes / W.A. Janssen, M.J. Surgalla // Science. – 1969. - Vol. 163. - P. 950-952.

127. Janulczyk, R. MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes* / R. Janulczyk, S. Ricci, L. Björck // Infect Immun, 2003, vol 71, pp. 2656–2664.

128. Jarrett, C.O. Flea-borne transmission model to evaluate vaccine efficacy against naturally acquired bubonic plague / C.O. Jarrett, F. Sebbane, J.J. Adamovicz, G.P. Andrews, B.J. Hinnebusch // Infect. Immun. – 2004. - Vol. 72. - P. 2052-2056.

129. Jarrett, C.O. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector / C.O. Jarrett, E. Deak, K.E. Isherwood, P.C. Oyston, E.R. Fischer, A.R. Whitney // J. Infect. Dis. – 2004. - Vol. 190. - P. 783-792.

130. Jastrzebowska, K. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents / K. Jastrzebowska, I. Gabriel // *Amino Acids*. – 2015. - Vol. 47. – P. 227-249.
131. Jiang, P. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein / P. Jiang, A.J. Ninfa // *J Bacteriology*. – 1999. – Vol. 181. – P. 1906–1911.
132. Jones, P.M. Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture / P.M. Jones, A.M. George // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1999. – Vol. 179. – No. 2. – P. 187-202.
133. Johnson, T.J. Comparative genome analysis of an avirulent and two virulent strains of avian *Pasteurella multocida* reveals candidate genes involved in fitness and pathogenicity / T.J. Johnson, J.E. Abrahante, S.S. Hunter, Hauglund M, Tatum FM, Maheswaran S. K, R.E. Briggs // *BMC Microbiol.* – 2013. – Vol. 13(1). – P. 106.
134. Juris, S.J. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption / S.J. Juris, A.E. Rudolph, D. Huddler, K. Orth, J.E. Dixon // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. - Vol. 97. – P. 9431-9436.
135. Kadner, R. J. Methionine transport in *Escherichia coli*: physiological and genetic evidence for two uptake systems / R.J. Kadner, W.J. Watson // *J. Bacteriol.* – 1974. – Vol. 119. – No. 2. – P. 401-409.
136. Kadner, R.J. Transport systems for L-methionine in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1974. – Vol. 117. – No. 1. – P. 232-241.
137. Kalivoda, E.J. The cyclic AMP-dependent catabolite repression system of *Serratia marcescens* mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae / E.J. Kalivoda, N.A. Stella, D.M. O'Dee, G.J. Nau, R.M. Shanks // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. - Vol. 74. - P. 3461-3470.
138. Karlyshev, A.V. Application of high-density array-based signature-tagged mutagenesis to discover novel *Yersinia* virulence-associated genes / A.V. Karylshev, P.C.F. Oyston, K. Williams, G.C. Clark, R.W. Titball, E.A. Winzeler, B.W. Wren // *Infection and immunity*. – 2001. – Vol. 69. – No. 12. – P. 7810-7819.
139. Kehl-Fie, T.E. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc / T.E. Kehl-Fie, E.P. Skaar // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2010. - Vol. 14. - P. 218–224.

140. Kehres, D.G. SitABCD is the alkaline Mn<sup>2+</sup> transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / D.G. Kehres, A. Janakiraman, J.M. Slauch, M.E. Maguire // J. Bacteriol. – 2002. - Vol. 184, pp. 3159–3166.
141. Kim, T.J. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein / T.J. Kim, S. Chauhan, V.L. Motin, E.B. Goh, M.M. Igo, G.M. Young // J. Bacteriol. – 2007. - Vol. 189. - P. 8890-8900.
142. Kim, W.K. A new anti-inflammatory agent KL-1037 represses proinflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in activated microglia / W.K. Kim, P.G. Jang, M.S. Woo, I.O. Han, H.Z. Piao, K. Lee, H. Lee, T.H. Joh, H.S. Kim // Neuropharmacology. – 2004. - Vol. 47. - P. 243-252.
143. King, A.M. High-temperature protein G is an essential virulence factor of *Leptospira interrogans* / A.M. King, G. Pretre, T. Bartpho, R.W. Sermswan, C. Toma, T. Suzuki *et al.* // Infect Immun. - 2014. - Vol. 82. – P. 1123–1131.
144. King, A.M. Leptospiral outer membrane protein LipL41 is not essential for acute leptospirosis but requires a small chaperone protein, lep, for stable expression / A.M. King, T. Bartpho, RW. Sermswan, D.M. Bulach, A. Eshghi, M. Picardeau, B. Adler, G.L. Murray // Infect. Immun. – 2013. – Vol. 81. – No. 8. – P. 2768-2776.
145. Kislichkina, A.A. Rational taxonomy of *Yersinia pestis* / A.A. Kislichkina, M.E. Platonov, A.S. Vagaiskaya, A.G. Bogun, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2019. – Vol. 34. – No. 2. – P. 110-117.
146. Klose, K.E. Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates *Salmonella typhimurium* virulence / K.E. Klose, J.J. Mekalanos // Infect. Immun. – 1997. – Vol. 65. – No. 2. – P. 587-596.
147. Knirel, YA, Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties // Y.A. Knirel, A.P. Anisimov // Acta Nat. – 2012. – Vol. 4. – P. 46–58.
148. Kolodziejek, A.M. Outer membrane protein X (Ail) contributes to *Yersinia pestis* virulence in pneumonic plague and its activity is dependent on the lipopolysaccharide core length / A.M. Kolodziejek, D.R. Schnider, H.N. Rohde, A.J. Wojtowicz, G.A. Bohach, S.A. Minnich, C.J. Hovde // Infect. Immun. – 2010. - Vol. 78. - P. 5233-5243.141.
149. Kolodziejek, A.M. Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM / A.M. Kolodziejek, D.J. Sinclair, K.S. Seo, D.R. Schnider, C.F.

Deobald, H.N. Rohde, A.K. Viall, S.S. Minnich, C.J. Hovde, S.A. Minnich, G.A. Bohach // *Microbiology*. – 2007. - Vol. 153. - P. 2941-2951.

150. Kopylov, P.Kh. *Yersinia pestis* Caf1 Protein: Effect of Sequence Polymorphism on Intrinsic Disorder Propensity, Serological Cross-Reactivity and Cross-Protectivity of Isoforms / P.Kh. Kopylov, M.E. Platonov, V.G. Ablamunits, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, L.A. Kadnikova, A.N. Somov, S.V. Dentovskaya, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11(9). - e0162308.

151. Kovacs-Simon, A. Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile* / A. Kovacs-Simon, R. Leuzzi, M. Kasendra, N. Minton, R.W. Titball, S.L. Michell // *The Journal of infectious diseases*. – 2014. – Vol. 210. – No. 2. – P. 274-284.

152. Lange, R. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation / R.Lange, R. Hengg e-Aronis // *Mol. Microbiol.* – 1994. - Vol. 13. - P. 733-743.

153. Lappann, M. Comparative proteome analysis of spontaneous outer membrane vesicles and purified outer membranes of *Neisseria meningitidis* / M. Lappann, A. Otto, D. Becher, U. Vogel // *Journal of bacteriology*. – 2013. – Vol. 195. – No. 19. – P. 4425-4435.

154. Lathem, W.W. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague / W.W. Lathem, P.A. Price, V.L. Miller, W.E. Goldman // *Science*. – 2007. - Vol. 15. - P. 509-513.

155. Lathem, W.W. Posttranscriptional regulation of the *Yersinia pestis* cyclic AMP receptor protein Crp and impact on virulence / W.W. Lathem, J.A. Schroeder, L.E. Bellows, J.T. Ritzert, J.T. Koo, P.A. Price // *M. Bio*. – 2014. - Vol. 5. - e01038-13.

156. Lawrenz, M.B. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague / M.B. Lawrenz, J.D. Lenz, V.L. Miller // *Infect. Immun.* – 2009. - Vol. 77. -P. 317-326.

157. Lawrenz, M.B. Acquisition of OmpT in reveals cryptic virulence function of autotransporter YapE in *Yersinia pestis* / M.B. Lawrenz, J. Pennington, V.L. Miller // *Mol. Microbiol.* – 2013. - Vol. 89. - P. 276-287.

158. Lazar, S.W. *surA* assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins / S.W. Lazar, R. Kolter // *J. Bacteriol.* - 1996. - Vol. 178. - P. 1770-1773.

159. Leduc, I. The serogroup B meningococcal outer membrane vesicle-based vaccine 4CMenB induces cross-species protection against *Neisseria gonorrhoeae* / I. Leduc,

K.L. Connolly, A. Begum, K. Underwood, S. Darnell, W.M. Shafer, J.T. Balthazar, A.N. Macintyre, G.D. Sempowski, J.A. Duncan, M.B. Little, N. Rahman, E.C. Garges, A.E. Jerse // PLoS Pathogens. – 2020. – Vol. 16. – No. 12. – P. e1008602.

160. Lefèvre, P. Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG / P. Lefevre, M. Braibant, L. de Wit, M. Kalai, D. Roeper, J. Grotzinger, J.P. Delville, P. Peirs, J. Ooms, K. Huygen, J. Content // Journal of bacteriology. – 1997. – Vol. 179. – No. 9. – P. 2900-2906.

161. Lenz, J.D. Evolution and virulence contributions of the autotransporter proteins YapJ and YapK of *Yersinia pestis* CO92 and their homologs in *Y. pseudotuberculosis* IP32953 / J.D. Lenz, B.R. Temple, V.L. Miller // Infect. Immun. – 2012. - Vol. 80. - P. 3693-3705.

162. Letzelter, M. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones / M. Letzelter, I. Sorg, L.J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman // EMBO J. – 2006. - Vol. 25. - P. 3223-3233.

163. Lev, A.I. Identification of IS1R and IS10R elements inserted into ompK36 porin gene of two multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* hospital strains / A.I. Lev, E.I. Astashkin, R.Z. Shaikhutdinova, M.E. Platonov, N.N. Kartsev, N.V. Volozhantsev // FEMS Microbiol Lett – 2017. – Vol. 364. – P. fnx072.

164. Lewis, V.G. The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity / V.G. Lewis, M.P. Ween, C.A. McDevitt // Protoplasma. – 2012. – Vol. 249. – No. 4. - P. 19-942.

165. Li, B. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunospot assay / B. Li, J. Guo, X. Wang, B. Ni, Y. Ke, Z. Zhu, Z. Guo, R. Yang // Infection and immunity. – 2009. – Vol. 77. – No. 10. – P. 4356-4361.

166. Li, Y. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci / Y. Li, Y. Cui, Y. Hauck, M.E. Platonov, E. Dai, Y. Song, Z. Guo, C. Pourcel, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov, R. Yang, G. Vergnaud // PloS one. – 2009. – Vol. 4. – No. 6. – P. e6000.

167. Lim, K.H.L. Metal binding specificity of the MntABC permease of *Neisseria gonorrhoeae* and its influence on bacterial growth and interaction with cervical epithelial cells

/ K.H.L. Lim, C.E. Jones, R.N. vanden Hoven, J.L. Edwards, M.L. Falsetta, M.A. Apicella, M.P. Jennings, A.G. McEwan / *Infect. Immun.* – 2008. - Vol. 76. - P. 3569–3576.

168. Ling, E. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse / E. Ling, G. Feldman, M. Portnoi, R. Dagan, K. Overweg, F. Mulholland, V. Chalifa-Caspi, J. Wells, Y. Mizrahi-Nebenzahl // *Clin. Exp. Immunol.* – 2004. – Vol. 138. – P. 290-298.

169. Liu, H. Transcriptional profiling of a mice plague model: insights into interaction between *Yersinia pestis* and its host / H. Liu, H. Wang, J. Qiu, X. Wang, Z. Guo, Y. Qiu // *J. Basic Microbiol.* – 2009. - Vol. 49. - P. 4992-4999.

170. Liu, L. CRP is an activator of *Yersinia pestis* biofilm formation that operates via a mechanism involving *gmhA* and *waaAE-coaD* / L. Liu, H. Fang, H. Yang, Y. Zhang, Y. Han, D. Zhou, R. Yang // *Front. Microbiol.* – 2016. - Vol. 7. – P. 295.

171. Liuzzi, J.P. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response / J.P. Liuzzi, L.A. Lichten, S. Rivera, R.K. Blanchard, T.B. Aydemir, M.D. Knutson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2005. - Vol. 102. - P. 6843–6848.

172. Llobet, E. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides / E. Llobet, C. March, P. Giménez, J.A. Bengoechea // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. - Vol. 53. - P. 298-302.

173. Lopez, C.A. Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of *Salmonella* by nitrate respiration / C.A. Lopez, S.E. Winter, F. Rivera-Chavez, M.N. Xavier, V. Poon, S.P. Nuccio, R.M. Tsolis, A.J. Bäumler // *MBio.* – 2012. – Vol. 3. – No. 3. – P. e00143-12.

174. Lorange, E.A. Poor vector competence of fleas and the evolution of hypervirulence in *Yersinia pestis* / E.A. Lorange, B.L. Race, F. Sebbane, B.J. Hinnebusch // *J. Infect. Dis.* – 2005. - Vol. 191. - P. 1907-1912.

175. Lu, X.H. RsmA regulates biofilm formation in *Xanthomonas campestris* through a regulatory network involving cyclic-di-GMP and the Clp transcription factor / X.H. Lu, S.Q. An, D.J. Tang, Y. McCarthy, J.L. Tang, J.M. Dowetal // *PLoS ONE.* – 2012. - Vol. 7. - e52646.

176. Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual / T. Maniatis, E.F Fritsch, J. Sambrook // Cold Spring Harbor. – N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. – P. 480.
177. Marra, A. In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection / A. Marra, S. Lawson, J.S. Asundi, D. Brigham, A.E. Hromockyj // Microbiology. – 2002. - Vol. 148. - P. 1483–1491.
178. McCarthy, J.S. *Onchocerca volvulus* glycolytic enzyme fructose-1, 6-bisphosphate aldolase as a target for a protective immune response in humans / J.S. McCarthy, M. Wieseman, J. Tropea, D. Kaslow, D. Abraham, S. Lustigman, R. Tuan, R.H. Guderian, T.B. Nutman // Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70. – No. 2. – P. 851-858.
179. McKinney, J.D. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase / J.D. McKinney, K. Honer zu Bentrup, E.J. Munoz-Elias, A. Miczak, B. Chen, W.T. Chan, D. Swenson, J.C. Sacchettini, W.R. Jacobs Jr, D.G. Russell // Nature. – 2000. – Vol. 406. – No. 6797. – P. 735-738.
180. Melching, L. Effects of serum components on gram-negative bacteria during bactericidal reactions / L. Melching, S.I. Vas // Infect. Immun. – 1971. - Vol. 3. - P. 107-115.,
181. Merlin, C. The *Escherichia coli metD* locus encodes an ABC transporter which includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ) / C. Merlin, G. Gardiner, S. Durand, M. Masters // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184. – No. 19. – P. 5513-5517.
182. Merrick, M.J. Nitrogen control in bacteria / M.J. Merrick, R.A. Edwards // Micro-biol. Rev. - 1995. – Vol. 59. – P. 604–622.
183. Miller, J.H. Experiments in Molecular Genetics // Cold Spring Harbor. – N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. – P. 280.
184. Murphy, B.S. *Yersinia pestis* YadC: a novel vaccine candidate against plague / B.S. Murphy, C.R. Wulff, B.A. Garvy, S.C. Straley // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. - Vol. 603. - P. 400-414.
185. Nally, J.E., Pathogenic leptospires modulate protein expression and post-translational modifications in response to mammalian host signals / J.E. Nally, A.A. Grassmann, S. Planchon, K. Sergeant, J. Renaut, J. Seshu *et al.* // Front. Cell. Infect. Microbiol. - 2017. – Vol. 7. – P. 362.

186. Navarro, L. Identification of a molecular target for the *Yersinia protein* kinase A / L. Navarro, A. Koller, R. Nordfelth, H. Wolf-Watz, S. Taylor, J.E. Dixon // *Mol. Cell.* – 2007. - Vol. 26. - P. 465-477.
187. Navid, A. Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Yersinia pestis*, strain 91001 / A. Navid, E. Almaas // *Molecular bioSystems.* – 2009. – Vol. 5. – P. 368-375.
188. Neilsen, P.O. *Escherichia coli* Braun lipoprotein induces a lipopolysaccharide-like endotoxic response from primary human endothelial cells / P.O. Neilsen, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre // *J. Immunol.* – 2001. - Vol. 167. - P. 5231-5239.
189. Nguyen, D. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria / D. Nguyen, A. Joshi-Datar, F. Lepine, E. Bauerle, O. Olakanmi, K. Beer, G. McKay, R. Siehnel, J. Schafhauser, Y. Wang, B.E. Britigan, P.K. Singh // *Science.* – 2011. – Vol. 334. – No. 6058. – P. 982-986.
190. Niikura, M. Molecular comparison of antigens and proteins of virulent and avirulent clones of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni, strain Shibaura / M. Niikura, E Ono, R. Yanagawa // *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* – 1987. – Vol. 266(3-4). – P. 453-462.
191. Niu, H. Autophagosomes induced by a bacterial Beclin 1 binding protein facilitate obligatory intracellular infection / H. Niu, Q. Xiong, A. Yamamoto, M. Hayashi-Nishino, Y. Rikihisa // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2012. – Vol. 109. – No. 51. – P. 20800-20807.
192. Nizet, V. Interdependence of hypoxic and innate immune responses / V. Nizet, R.S. Johnson // *Nature Reviews Immunology.* – 2009. – Vol. 9. – No. 9. – P. 609-617.
193. Obi, I.R. Demarcating SurA activities required for outer membrane targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* adhesions / I.R. Obi, M.S. Francis // *Infect. Immun.* – 2013. – Vol. 81. - P. 2296-2308.
194. Obi, I.R. Varying dependency of periplasmic peptidylprolyl cis-trans isomerases in promoting *Yersinia pseudotuberculosis* stress tolerance and pathogenicity / I.R. Obi, R. Nordfelth, M.S. Francis // *Biochem. J.* – 2011. - Vol. 439. - P. 321-332.
195. Odinokov, G.N. Genetic bases of methionine dependence in *Yersinia pestis* strains of major and non-major subspecies / G.N. Odinokov, G.A. Eroshenko, Ia.M. Krasnov,

L.M. Kukleva, N.Iu. Shavina, A.I. Pavlova, V.V. Kuttyrev // *Genetika*. – 2011. – Vol. 47. – No. 3. – P. 289-294.

196. Oh, M.H. Regulation of the *Vibrio vulnificus hupA* gene by temperature alteration and cyclic AMP receptor protein and evaluation of its role in virulence / M.H. Oh, S.M. Lee, D.H. Lee, S.H. Choi // *Infect. Immun.* – 2009. - Vol. 77. - P. 1208-1215.

197. Olsen, J.V. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap / J.V. Olsen, L.M. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, M. Mann // *Mol Cell Proteomics*. – 2005. – Vol. 4. – P. 2010-2021. DOI: 10.1074/mcp.T500030-MCP200.

198. Otsuka, T. The vaccine candidate substrate binding protein SBP2 plays a key role in arginine uptake, which is required for growth of *Moraxella catarrhalis* / T. Otsuka, C. Kirkham, A. Brauer, M. Koszelak-Rosenblum, M.G. Malkowski, T.F. Murphy // *Infection and immunity*. – 2016. – Vol. 84. – No. 2. – P. 432-438.

199. Ouyang, Z. A manganese transporter, BB0219 (BmtA), is required for virulence by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* / Z. Ouyang, M. He, T. Oman, X.F. Yang, M.V. Norgard // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. - Vol. 106. - P. 3449–3454.

200. Paik, S. The *sloABCR* operon of *Streptococcus mutans* encodes an Mn and Fe transport system required for endocarditis virulence and its Mn-dependent repressor / S. Paik, A. Brown, C.L. Munro, C.N. Cornelissen, T. Kitten // *J. Bacteriol.* – 2003. - Vol. 185. - P. 5967–5975.

201. Pancholi, V. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens / V. Pancholi, G.S. Chhatwal // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2003. – Vol. 293. – No. 6. – P. 391-401.

202. Park, H. The *Yersinia* effector protein YpkA induces apoptosis independently of actin depolymerization / H. Park, K. Teja, J.J. O'Shea, R.M. Siegel // *J. Immunol.* – 2007. - Vol. 178. - P. 6426-6434.

203. Park, J.S. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- $\gamma$ -stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: Involvement of NF- $\kappa$ B and ERK signaling pathways./ J.S. Park, E.J. Lee, J.C. Lee, W.K. Kim, H.S. Kim // *Int. Immunopharmacol.* – 2007. - Vol. 7. - P. 70-77.

204. Parkhill, J. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague / J. Parkhill, B.W. Wren, N.R. Thomson // *Nature*. – 2001. - Vol. 413. - P. 523-527.

205. Payne, J.W. Peptides and micro-organisms // Advances in microbial physiology. – 1976. – Vol. 13. – P. 55-113.
206. Peng, J. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC–MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome / J. Peng, J.E. Elias, C.C. Thoreen, L.J. Licklider, S.P. Gygi // Journal of proteome research. – 2003. – Vol. 2. – No. 1. – P. 43-50.
207. Perry, R.D. Manganese transporters Yfe and MntH are Fur-regulated and important for the virulence of *Yersinia pestis* / R.D. Perry, S.K. Craig, J. Abney, A.G. Bobrov, O. Kirillina, I.Jr. Mier, H. Truszczynska, J.D. Fetherston // Fur. Microbiology. – 2012. - Vol. 158. - P. 804–815.
208. Perry, R.D. Regulation of the *Yersinia pestis* Yfe and Ybt iron transport systems / R.D. Perry, J. Abney, I.Jr. Mier, Y. Lee, S.W. Bearden, J.D. Fetherston // Adv. Exp. Med. Biol. – 2003. - Vol. 529. - P. 275–283.
209. 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 // Metallomics. – 2015. – Vol. 7. – No. 6. – P. 965-978.
210. Perry, R.D. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague / R.D. Perry, J.D. Fetherston // Clin. Microbiol. Rev. – 1997. - Vol. 10. - P. 35-66.
211. Petrarca, P. The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage / P. Petrarca, S. Ammendola, P. Pasquali, A. Battistoni // J. Bacteriol. – 2010. - Vol. 192. - P. 1553–1564.
212. Pieper, R. Characterizing the dynamic nature of the *Yersinia pestis* periplasmic proteome in response to nutrient exhaustion and temperature change / R. Pieper, S.T. Huang, D.J. Clark, J.M. Robinson, P.P. Parmar, H. Alami, Ch.L. Bunai, R.D. Perry, R.D. Fleischmann, S.N. Peterson // Proteomics. – 2008. – Vol. 8. – No. 7. – P. 1442-1458.
213. Pieper, R. Integral and peripheral association of proteins and protein complexes with *Yersinia pestis* inner and outer membranes / R. Pieper, Sh-T. Huang, D.J. Clark, J.M. Robinson, H. Alami, P.P. Parmar, M.-J. Suh, S. Kuntumalla, C.L. Bunai, R.D. Perry, R.D. Fleischmann, S.N. Peterson // Proteome Science. – 2009. – Vol. 7. - P. 1-16.
214. Pieper, R. Proteomic analysis of iron acquisition, metabolic and regulatory responses of *Yersinia pestis* to iron starvation / R. Pieper, S.T. Huang, P.P. Parmar, D.J. Clark,

H. Alami, R.D. Fleischmann, R.D. Perry, S.N. Peterson // BMC microbiology. – 2010. – Vol. 10. – No. 1. – P. 1-21.

215. Pieper, R. Temperature and growth phase influence the outer-membrane proteome and the expression of a type VI secretion system in *Yersinia pestis* / R. Pieper, S.T. Huang, J.M. Robinson, D.J. Clark, H. Alami, P.P. Parmar, R.D. Perry, R.D. Fleischmann, S.N. Peterson // Microbiology. – 2009. – Vol. 155. – No. 2. – P. 498-512.

216. Polissi, A. Large-Scale Identification of Virulence Genes from *Streptococcus pneumoniae* / A. Polissi, A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari, D. Simon. // Infection and immunity. – 1998. – Vol. 66. – No. 12. – P. 5620-5629.

217. Prasadarao, N.V. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells / N.V. Prasadarao, C.A. Wass, J.N. Weiser, M.F. Stins, S.H. Huang, K.S Kim // Infect. Immun. – 1996. - Vol. 64. - P. 146-153.

218. Prehna, G. *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors / G. Prehna, M.I. Ivanov, J.B. Bliska, C.E. Stebbins // Cell. – 2006. -Vol. 126. - P. 869-880.

219. Price, C.T. Amoeba host-*Legionella* synchronization of amino acid auxotrophy and its role in bacterial adaptation and pathogenic evolution / C.T. Price, A.M. Richards, J.E. Von Dwingelo, H.A. Samara, Y. Abu Kwaik // Environ. Microbiol. - 2014. - Vol. 16. – P. 350–358.

220. Price, C.T. Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth / C.T. Price, T. Al-Quadani, M. Santic, I. Rosenshine, Y. Abu Kwaik // Science. – 2011. – Vol. 334. – No. 6062. – P. 1553-1557.

221. Prodromou, C. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone / C. Prodromou, S.M. Roe, R. O'Brien, J.E. Ladbury, P.W. Piper, L.H. Pearl // Cell. – 1997. – Vol. 90. – P. 65–75.

222. Puckett, S. Inactivation of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase prevents optimal co-catabolism of glycolytic and gluconeogenic carbon substrates in *Mycobacterium tuberculosis* / S. Puckett, C. Trujillo, H. Eoh, J. Marrero, J. Spencer, M. Jackson, D. Schnappinger, K. Rhee, S. Ehrt // PLoS Pathog. – 2014. – Vol. 10. – No. 5. – P. e1004144.

223. Pujol, C. Replication of *Yersinia pestis* in interferon  $\gamma$ -activated macrophages requires ripA, a gene encoded in the pigmentation locus // C. Pujol, J.P. Grabenstein, R.D. Perry, J.B. Bliska // PNAS. – 2005. - Vol. 102. - P. 12909-12914.

224. Raffatellu, M. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine / M. Raffatellu, M.D. George, Y. Akiyama, M.J. Hornsby, S.P. Nuccio, T.A. Paixao, B.P. Butler, H. Chu, R.L. Santos, T. Berger, T.W. Mak, R.M. Tsois, C.L. Bevins, J.V. Solnick, S. Dandekar, A.J. Bäumlér // *Cell host & microbe*. – 2009. – Vol. 5. – No. 5. – P. 476-486.
225. Rahuel-Claremont, S. Copper and Zinc in Inflammatory and Degenerative Diseases / S. Rahuel-Claremont, M.F. Dunn, K.D. Rainsford, R. Milanino, R.J. Sorenson, G.P. Velo // *Kluwer Academic Publisher*. – 1998. – P. 47-59.
226. Ramsaywak, P.C. Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose 1, 6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*—a novel Class II A tetramer / P.C. Ramsaywak, G. Labbé, S. Siemann, G.I. Dmitrienko, J.G. Guillemette // *Protein expression and purification*. – 2004. – Vol. 37. – No. 1. – P. 220-228.
227. Reitzer, L.J. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine // In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology 2. – 1987. – P. 302-320.
228. Rice, A.J. Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers / A.J. Rice, A. Park, H.W. Pinkett // *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. – 2014. – Vol. 49. – No. 5. – P. 426-437
229. Rickman, L. A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor / L. Rickman, C. Scott, D.M. Hunt, T. Hutchinson, M.C. Menendez, R. Whalan // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 56. – P. 1274-1286.
230. Riding, G.A. Proteomic analysis of bovine conceptus fluids during early pregnancy / G.A. Riding, A. Jones, M.K. Holland, J.R. Hill, S.A. Lehnert // *Proteomics*. – 2008. – Vol. 8. – No. 1. – P. 160-177. DOI: 10.1002/pmic.200700465.
231. Rink, L. Zinc homeostasis and immunity / L.ink, H.aase // *Trends Immunol.* – 2007. – Vol. 28. – P. 1–4.
232. Roediger, W.E. Nitric oxide-dependent nitrosation of cellular CoA: a proposal for tissue responses / W.E. Roediger // *Nitric. Oxide*. – 2001. – Vol. 5. – P. 83-87.

233. Roggenkamp, A. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA // A. Roggenkamp, N. Ackermann, C.A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, J. Heesemann // J Bacteriol. – 2003. - Vol. 185. - P. 3735-3744.
234. Rohmer, L. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis / L. Rohmer, D. Hocquet, S.I. Miller // Trends in microbiology. – 2011. – Vol. 19. – No. 7. – P. 341-348.
235. Rouviere, P.E. SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolylisomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins / P.E. Rouviere, C.A. Gross // Genes Dev. – 1996. - Vol. 10. - P. 3170-3182.
236. Runco, L.M. Biogenesis of the fraction 1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis* / L.M. Runco, S. Myrczek, J.B. Bliska, D.G. Thanassi // J Bacteriol. – 2008. - Vol. 190. - P. 3381-3385.
237. Salazar, J.K. Roles of an ovel Crp/Fnr family transcription factor Lmo0753 in soil survival, biofilm production and surface attachment of fresh produce of *Listeria monocytogenes* / J.K. Salazar, Z. Wu, W. Yang, N.E. Freitag, M.L. Tortorello, H. Wang // PLoS ONE. – 2013. - Vol. 8. - e75736.
238. Santiviago, C.A. Analysis of pools of targeted *Salmonella* deletion mutants identifies novel genes affecting fitness during competitive infection in mice / C.A. Santiviago, M.M. Reynolds, S. Porwollik, S.H. Choi, F. Long // PLoS Pathog. – 2009. - Vol. 5. - e1000477.
239. Sasindran, S.J. Methionine sulfoxide reductases and virulence of bacterial pathogens / S.J. Sasindran, S. Saikolappan, S. Dhandayuthapani // Future Microbiol. – 2007. – Vol. 2. – No. 6. – P. 619-630.
240. Schoen, C. Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis* / C. Schoen, L. Kischkies, J. Elias, B.J. Ampattu // Front Cell Infect Microbiol., Vol. 4. – P. 114.
241. Schrimpe-Rutledge, A.C. Comparative omics-driven genome annotation refinement: application across *Yersiniae* / A.C. Schrimpe-Rutledge, M.B. Jones, S. Chauhan, S.O. Purvine, J.A. Sanford, M.E. Monroe, H.M. Brewer, S.H. Payne, C. Ansong, B.C. Frank, R.D. Smith, S.N. Peterson, V.L. Motin, J.N. Adkins // PloS one. – 2012. – Vol. 7. – No. 3. – P. e33903.

242. Schubot, F.D. Crystal structure of the protease-resistant core domain of *Yersinia pestis* virulence factor YopR / F.D. Schubot, S. Cherry, B.P. Austin, J.E. Tropea, D.S. Waugh // *Protein Sci.* – 2005. - Vol. 14. - P. 1679-1683.
243. Schulz, A. The htpG gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control / A. Schulz, S. Schwab, G. Homuth, S. Versteeg, W. Schumann // *J. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179. – P. 3103–3109.
244. Semchenko, E.A. MetQ of *Neisseria gonorrhoeae* is a surface-expressed antigen that elicits bactericidal and functional blocking antibodies / E.A. Semchenko, C.J. Day, K.L. Seib // *Infect. Immun.* – 2017. – Vol. 85. – No. 2.
245. Senior, N.J. An integrated computational-experimental approach reveals *Yersinia pestis* genes essential across a narrow or a broad range of environmental conditions / N.J. Senior, K. Sasidharan, R.J. Saint, A.E. Scott, M. Sarkar-Tyson, P.M. Ireland, H.L. Bullifent, Z. Rong Yang, K. Moore, P.C. Oyston, T.P. Atkins, H.S. Atkins, O.S. Soyer, R.W. Titball // *BMC microbiology.* – 2017. – Vol. 17. – No. 1. – P. 1-12.
246. Seo, K.S. Role of a new intimin/invasin-like protein in *Yersinia pestis* virulence / K.S. Seo, J.W. Kim, J.Y. Park, A.K. Viall, S.S. Minnich, H.N. Rohde // *Infect. Immun.* – 2012. - Vol. 80. - P. 3559-3569.
247. Sha, J. Braun Lipoprotein (Lpp) Contributes to Virulence of *Yersinia*: Potential Role of Lpp in Inducing Bubonic and Pneumonic Plague / J. Sha, L.S. Agar, W.B. Baze, J.P. Olano, A.A. Fad, T.E. Erova, S. Wang, S.M. Foltz, G. Suarez, V.L. Motin, S. Chauhan, G.R. Klimpel, J.W. Peterson, A.K. Chopra // *Infect. Immun.* – 2008. - Vol. 76. - P. 1390-1409.
248. Sha, J. Deletion of the Braun Lipoprotein-Encoding Gene and Altering the Function of Lipopolysaccharide Attenuate the Plague Bacterium / J. Sha, L.M. Kirtley, C.J. van Lier, S. Wang, T.E. Erova, E.V. Kozlova, A. Cao, Y. Cong, E. C. Fitts, J.A. Rosenzweig, A.K. Chopra // *Infection and Immunity.* – 2013. - Vol. 81. - P. 815-828.
249. Shams, F. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA)-a conserved glycolytic enzyme with virulence functions in bacteria: 'ill met by moonlight' / F. Shams, N.J. Oldfield, K.G. Wooldridge, D.P. Turner // *Biochem Soc Trans.* - 2014. - Vol. 42. – P. 1792–1795.
250. Shelver, D. MtaR, a regulator of methionine transport, is critical for survival of group B streptococcus in vivo / D. Shelver, L. Rajagopal, T.O. Harris, C.E. Rubens // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – No. 22. – P. 6592-6599.

251. Shi, L. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages / L. Shi, J.N. Adkins, J.R. Coleman, A.A. Schepmoes, A. Dohnkova // *J. Biol. Chem.* – 2006. - Vol. 281. - P. 29131-29140.
252. Skorupski, K. Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin- coregulated pilus in *Vibrio cholerae* / K. Skorupski, R.K. Taylor // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1997. - Vol. 94. - P. 265-270.
253. Smith, A.J. MtuA, a lipoprotein receptor antigen from *Streptococcus uberis*, is responsible for acquisition of manganese during growth in milk and is essential for infection of the lactating bovine mammary gland / A.J. Smith, P.N. Ward, T.R. Field, C.L. Jones, R.A. Lincoln, J.A. Leigh // *Infect. Immun.* – 2003. - Vol. 71. - P. 4842–4849.
254. Sohnle, P.G. Zinc reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor - related proteins 8 and 14) / P.G. Sohnle, M.J. Hunter, B. Hahn, W.J. Chazin // *J. Infect. Dis.* – 2000. - Vol. 182. - P. 1272–1275.
255. Southern, S.J. Survival protein A is essential for virulence in *Yersinia pestis* / S.J. Southern, A.E. Scott, D.C. Jenner, P.M. Ireland, H. Norville, M. Sarkar-Tyson // *Microbial Pathogenesis.* – 2016. - Vol. 92. - P. 50-53.
256. Steeb, B. Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence / B. Steeb, B. Claudi, N. Burton, P. Tienz, A. Schmidt, H. Farhan, A. Mazé, D. Bumann // *PLoS Pathog.* – 2013. – Vol. 9. – No. 4. – P. e1003301.
257. Straley, S.C. Growth in mouse peritoneal macrophages of *Yersinia pestis* lacking established virulence determinants / S.C. Straley, P.A. Harmon // *Infection and immunity.* – 1984. - Vol. 45. - P. 649-654.
258. Sugawara, E. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli* / E. Sugawara, H. Nikaido // *J. Biol. Chem.* – 1992. - Vol. 267. - P. 2507-2511.
259. Sun, Y.C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of *Yersinia pestis* pseudogene / Y.C. Sun, B.J. Hinnebusch, C. Darby // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2008. - Vol. 105. - P. 8097-8101.
260. Sun, Y.C. Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis* / Y.C. Sun, C.O. Jarrett, C.F. Bosio, B.J. Hinnebusch // *Cell Host Microbe.* – 2014. - Vol. 15. - P. 578-586.

261. Sun, Y.C. The *Yersinia pestis* Rcs phosphorelay inhibits biofilm formation by repressing transcription of the diguanylate cyclase gene *hmsT* / Y.C. Sun, X.P. Guo, B.J. Hinnebusch, C. Darby // *J. Bacteriol.* – 2012. - Vol. 194. - P. 2020-2026.
262. Suzuki, H. Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope / H. Suzuki, Y. Nishimura, S. Yasuda, A. Nishimura, M. Yamada, Y. Hirota // *Molecular and General Genetics.* – 1978. - Vol. 167. - P. 1-9.
263. Tanaka, N. HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria / N. Tanaka, H. Nakamoto // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 458. – P. 117–123.
264. Thi, E.P. Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle / E.P. Thi, U. Lambertz, N.E. Reiner // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8. – No. 3. – P. e1002551.
265. Thomas, J.G. Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo* / J.G. Thomas, F. Baneyx // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180. – P. 5165–5172.
266. Tidhar, A. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plague / A. Tidhar, Y. Flashner, S. Cohen, Y. Levi, A. Zauberman, D. Gur, M. Aftallon, E. Elhanany, A. Zvi, A. Shafferman, E. Mamroud // *PLoS One.* – 2009. - Vol. 4. - e7023.
267. Tormo, A. *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase / A. Tormo, M. Almiron, R. Kolter // *J. Bacteriol.* – 1990. - Vol. 172. - P. 4339-4347.
268. Torres, R. Biochemical, structural and molecular dynamics analyses of the potential virulence factor RipA from *Yersinia pestis* / R. Torres, R.V. Swift, N. Chim, N. Wheatley, B. Lan, B.R. Atwood, C. Pujol, B. Sankaran, J.B. Bliska, R.E. Amaro, C.W. Goulding // *PLoS ONE.* – 2011. - Vol. 6. - e25084.
269. Torres, R. Structural insights into RipC, a putative citrate lyase b subunit from a *Yersinia pestis* virulence operon / R. Torres, N. Chim, B. Sankaran, C. Pujol, J. Bliska, C.W. Goulding // *Acta. Cryst.* – 2012. - Vol. 68. - P. 2-7.
270. Torres, R. Structural snapshots along the reaction pathway of *Yersinia pestis* RipA, a putative butyryl-CoA transferase Torres R., Lan B., Latif Y., Chima N., Goulding C.W. // *Acta. Cryst.* – 2014. - Vol. 70. - P. 1074-1085.
271. Torres-Escobar, A. Transcriptional regulation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* *lsrACDBFG* and *lsrRK* operons and their role in biofilm formation /

A. Torres-Escobar, M.D. Juarez-Rodriguez, R.J. Lamont, D.R. Demuth // *J. Bacteriol.* – 2013. - Vol. 195. - P. 56-65.

272. Towbin H., Staehlin T., Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – V.76. – P. 4350-4354.

273. Trasak, C. *Yersinia* protein kinase YopO is activated by a novel G-actin binding process / C. Trasak, G. Zenner, A. Vogel, G. Yuksekdog, R. Rost, I. Haase // *J. Biol. Chem.* – 2007. - Vol. 282. - P. 2268-2277.

274. Tsang, T.M. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery / T.M. Tsang, S. Felek, E.S. Krukoni // *Infect. Immun.* – 2010. - Vol. 78. - P. 3358-3368.

275. Tunio, S.A. The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: surface localization and role in host cell adhesion / S.A. Tunio, N.J. Oldfield, A. Berry, D.A. Ala'Aldeen, K.G. Wooldridge, D.P. Turner // *Molecular microbiology.* – 2010. – Vol. 76. – No. 3. – P. 605-615.

276. Uda, A. Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU / A. Uda, T. Sekizuka, K. Tanabayashi, O. Fujita, M. Kuroda, A. Hotta et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. - e89075.

277. van Heeswijk, W.C. Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective / W.C. van Heeswijk, H.V. Westerhoff, F.C. Boogerd // *Microbiol Mol Biol Rev.* - 2013. – Vol. 77. – P. 628–695.

278. van Lier, P.J. Further characterization of a highly attenuated *Yersinia pestis* CO92 mutant deleted for the genes encoding Braun lipoprotein and plasminogen activator protease in murine alveolar and primary human macrophages / P.J. van Lier, B.L. Tiner, S. Chauhan, V.L. Motin, E.C. Fitts, M.B. Huante, J.J. Endsley, D. Ponnusamy, J. Sha, A.K. Chopra // *Microb. Pathog.*, - 2015. - Vol. 80. - P. 27-38.

279. Verbrugghe, E. HtpG contributes to *Salmonella Typhimurium* intestinal persistence in pigs / E. Verbrugghe, A. Van Parys, B. Leyman, F. Boyen, F. Haesebrouck, F. Pasmans // *Vet Res.* - Vol. 46. – P. 118.

280. Voß, F. Intranasal vaccination with lipoproteins confers protection against pneumococcal colonisation / F. Voß, T.P. Kohler, T. Meyer, M.R. Abdullah, F.J. van

Opzeeland, M. Saleh, S. Michalik, S. van Selm, F. Schmidt, M.I. de Jonge, S. Hammerschmidt // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2405.

281. Wall, D.B. Isoelectric focusing nonporous RP HPLC: a two-dimensional liquid-phase separation method for mapping of cellular proteins with identification using MALDI-TOF mass spectrometry / D.B. Wall, M.T. Kachman, S. Gong, R. Hinderer, S. Parus, D.E. Misek, S.M. Hanash, D.M. Lubman // *Analytical chemistry*. – 2000. – Vol. 72. – No. 6. – P. 1099-1111.

282. Wandinger, S.K. The Hsp90 chaperone machinery / S.K. Wandinger, K. Richter, J. Buchner // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 18473–18477.

283. Wang, S. Relative immunogenicity and protection potential of candidate *Yersinia pestis* antigens against lethal mucosal plague challenge in Balb/C mice / S. Wang, S. Joshi, I. Mboudjeka, F. Liu, T. Ling, J.D. Goguen, S. Lu // *Vaccine*. – 2008. - Vol. 26. - P. 1664-1674.

284. Wang, W. An analysis of surface proteomics results reveals novel candidates for intracellular/surface moonlighting proteins in bacteria / W. Wang, C.J. Jeffery // *Mol. Biosyst.* - Vol.12. – P. 1420–1431.

285. Washburn, M.P. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology / M.P. Washburn, D. Wolters, J.R. Yates // *Nat Biotechnol.* – 2001. – Vol. 19. – No. 3. – P. 242.

286. Weinberg, E.D. Infectious diseases influenced by trace element environment / E.D. Weinberg // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1972. – Vol. 199. - P. 274–284.

287. Weiss, D.S. *In vivo* negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence / D.S. Weiss, A. Brotcke, T. Henry, J.J. Margolis, K. Chan, D.M. Monack // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2007. – Vol. 104. – P. 6037–6042.

288. Westermeier, R. Looking at proteins from two dimensions: A review on five decades of 2D electrophoresis / R. Westermeier // *Arch. Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 120. – P. 168–172.

289. Wigneshweraraj, S. *Modus operandi* of the bacterial RNA polymerase containing the  $\sigma^{54}$  promoter-specificity factor / S. Wigneshweraraj, D. Bose, P.C. Burrows, N. Joly, J. Schumacher, M. Rappas, T. Pape, X. Zhang, P. Stockley, K. Severinov, M. Buck // *Mol. Microbiol.* - 2008. – Vol. 68. – P. 538–546.

290. Wiley, D.J. The Ser/Thr kinase activity of the *Yersinia* protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton / D.J. Wiley, R. Nordfeldth, J. Rosenzweig, C.J. DaFonseca, R. Gustin, H. Wolf-Watz // *Microb. Pathog.* – 2006. - Vol. 40. - P. 234-243.
291. Willias, S.P. CRP-mediated carbon catabolite regulation of *Yersinia pestis* biofilm formation is enhanced by the carbon storage regulator protein, CsrA / S.P. Willias, S. Chauhan, C.C. Lo, P.S. Chain, V.L. Motin // *PLoS ONE.* – 2015. - Vol. 10. – e 0135481.
292. Winston, J.L. Cloning and characterization of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gene encoding a heat-shock protein 90 homologue / J.L. Winston, S.I. Toth, B.A. Roe, D.W. Dyer // *Gene.* – 1996. – Vol. 179. – P. 199–204.
293. Winter, S.E. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella* / S.E. Winter, P. Thiennimitr, M.G. Winter, B.P. Butler, D.L. Huseby, R.W. Crawford, J.M. Russell, C.L. Bevins, L. Garry Adams, R.M. Tsohis, J.R. Roth, A.J. Bäumlner // *Nature.* – 2010. – Vol. 467. – No. 7314. – P. 426-429.
294. Wouters, J. Crystallography of membrane proteins, major targets in drug design // *Mini reviews in medicinal chemistry.* – 2003. – Vol. 3. – No. 5. – P. 439-448.
295. Wu, Z. Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 / Z. Wu, W. Zhang, C. Lu // *FEMS Immunol. & Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 53. – No. 1. – P. 52-59.
296. Yang, Z.R. A noise trimming and positional significance of transposon insertion system to identify essential genes in *Yersinia pestis* / Z.R. Yang, H.L. Bullifent, K. Moore, K. Paszkiewicz, R.J. Saint, S.J. Southern, O.L. Champion, N.J. Senior, M. Sarkar-Tyson, P.C. Oyston, T.P. Atkins, R.W. Titball // *Scientific reports.* – 2017. – Vol. 7. – No. 1. – P. 1-11.
297. Yen, Y.T. Identification and characterization of autotransporter proteins of *Yersinia pestis* KIM / Y.T. Yen, A. Karkal, M. Bhattacharya, R.C. Fernandez, C. Stathopoulos // *Mol. Membr. Biol.* – 2007. - Vol. 24. - P. 28-40.
298. Zeng, L. A novel pan-genome reverse vaccinology approach employing a negative-selection strategy for screening surface-exposed antigens against leptospirosis / L. Zeng, D. Wang, N. Hu, Q. Zhu, K. Chen, K. Dong, Y. Zhang, Y. Yao, X. Guo, Y.F. Chang, Y. Zhu // *Vet Microbiol.* - 2009. - Vol. 139. – P. 80-88.

299. Zgiby, S.M. Exploring substrate binding and discrimination in fructose1, 6-bisphosphate and tagatose 1, 6-bisphosphate aldolases / S.M. Zgiby, G.J. Thomson, S. Qamar, A. Berry // *European journal of biochemistry*. – 2000. – Vol. 267. – No. 6. – P. 1858-1868.
300. Zhan, L. Direct and negative regulation of the *sycO-ypkA-yjoJ* operon by cyclic AMP receptor protein (CRP) in *Yersinia pestis* / L. Zhan, L. Yang, L. Zhou, Y. Li, H. Gao, Z. Guo // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9. - P. 178.
301. Zhan, L. The cyclic AMP receptor protein, CRP, is required for both virulence and expression of the minimal CRP regulon in *Yersinia pestis* biovar *microtus* / L. Zhan, Y. Han, L. Yang, J. Geng, Y. Li, H. Gao // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76. – P. 5028-5037.
302. Zhang, H.J. Bacterial lipoprotein and lipopolysaccharide act synergistically to induce lethal shock and proinflammatory cytokine production / H.J. Zhang, J.W. Peterson, D.W. Niesel, G.R. Klimpel // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 159. - P. 4868-4878.
303. Zhang, Y. Autoregulation of PhoP/PhoQ and positive regulation of the cyclic AMP receptor protein-cyclic AMP complex by PhoP in *Yersinia pestis* / Y. Zhang, L. Wang, Y. Han, Y. Yan, Y. Tan, L. Zhou // *J. Bacteriol.* – 2013. – Vol. 195. – P. 1022-1030.
304. Zhao, S. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity / S. Zhao, W. Zhu, S. Xue, D. Han // *Cell. Mol. Immunol.* – 2014. – Vol. 11. – P. 428-437.
305. Zhong, Y. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601 / Y. Zhong, X. Chang, X.J. Cao, Y. Zhang, H. Zheng, Y. Zh, *et al.* // *Cell Res.* – 2011. - Vol. 21. – P. 1210–1229.
306. Zhou, L. A proteome reference map and virulence factors analysis of *Yersinia pestis* 91001 / L. Zhou, W. Ying, Y. Han, M. Chen, Y. Yan, L. Li, Z. Zhu, Z. Zheng, W. Jia, R. Yang, X. Qian // *J. Proteomics* – 2011. – Vol. 75. – P. 894–907.
307. Zielke, R.A. Proteomics-driven antigen discovery for development of vaccines against gonorrhea / R.A. Zielke, I.H. Wierzbicki, B.I. Baarda, P.R. Gafken, O.O. Soge, K.K. Holmes, A.E. Jerse, M. Unemo, A.E. Sikora // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2016. – Vol. 15. – No. 7. – P. 2338-2355.
308. Zielke, R.A. Quantitative proteomics of the *Neisseria gonorrhoeae* cell envelope and membrane vesicles for the discovery of potential therapeutic targets / R.A. Zielke, I.H. Wierzbicki, J.V. Weber, P.R. Gafken, A.E. Sikora // *Molecular & cellular proteomics*. – 2014. – Vol. 13. – No. 5. – P. 1299-1317.

309. Zimmer, D.P. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation / DP Zimmer, E Soupene, HL Lee, VF Wendisch, AB Khodursky, BJ Peter, RA Bender, S. Kustu Proc // Natl Acad Sci U S A - 2000. Vol. – 97. – P. 14674-14679.

310. Zubarev, R. On the proper use of mass accuracy in proteomics / R. Zubarev, M. Mann // Molecular & Cellular Proteomics. – 2007. – Vol. 6. – No. 3. – P. 377-381.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

## а) статьи в реферируемых научных журналах

1. **Красильникова, Е.А.** Вирулентность HtpG<sup>+</sup> и HtpG<sup>-</sup> 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**
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**
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**

## б) патенты

4. № 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. – 2020.

## 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**

## 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 ZOONOTIC 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 (0.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, 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. Krasil'nikova**, 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.