

На правах рукописи

ШИШКИНА ЛИДИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА *YERSINIA PESTIS*
НА ИММУНОДИАГНОСТИКУ И ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКУ ЧУМЫ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск - 2018

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

Научные руководители:

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, лаборатория микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций, главный научный сотрудник

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, отдел коллекционных культур, ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты:

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства Здравоохранения России, управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов, главный эксперт

Попов Юрий Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, отдел образовательных программ и подготовки специалистов, главный научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится **«21» декабря 2018 г.** в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Чума во все времена вызывала большой интерес со стороны исследователей, так как явилась причиной трех пандемий и привела к гибели сотен миллионов людей (Cantor *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 1997). *Yersinia pestis* – этиологический агент чумы - дивергировал от энтеропатогенной бактерии *Y. pseudotuberculosis* около 1500-20000 лет назад (Achtman *et al.*, 1999; 2004). Последующая изменчивость привела к формированию множества внутривидовых групп *Y. pestis*, отличающихся по спектру чувствительных к ним млекопитающих (Anisimov *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2008; 2009; Zhou *et al.*, 2004). У людей вспышки, эпидемии и пандемии чумы вызывают штаммы *Y. pestis* подвида *pestis*, обладающие универсальной гипервирулентностью для широкого круга млекопитающих (Cui *et al.*, 2013, Платонов *et al.*, 2013, Morelli *et al.*, 2010). Представители другого подвида - *microti* - являются эндемичными для популяций некоторых видов полевок (*Microti* spp.) и редко вызывают спорадические случаи заболевания (Anisimov *et al.*, 2004, Cui *et al.*, 2013), которые не передаются от человека к человеку (Anisimov *et al.*, 2004).

Штаммы обоих подвидов могут образовывать белковую капсулу, впервые описанную А. Yersin (Yersin, 1894) и кодируемую генами *caf1* оперона (Karlyshev *et al.*, 1994; 2010), расположенного на плазмиде pFra (pMT1) (Проценко *et al.*, 1983). Капсула придает микробной клетке устойчивость к фагоцитозу, а формирующий ее белок Caf1 (F1) является одним из основных протективных антигенов *Y. pestis* (Brubaker *et al.*, 1972; Chichester *et al.*, 2009; Cornelius *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Runco *et al.*, 2008; Titball *et al.*, 2001). В связи с этим капсульный антиген является обязательным компонентом большинства чумных вакцин (Dentovskaya *et al.*, 2013; Galen *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014) и основной мишенью для лабораторной диагностики чумы (Russell *et al.*, 1997). Известно, что биогенез капсульного антигена осуществляется по консервативному шаперон/ашерному пути (система секреции IV типа) (Sauer *et al.*, 2004). Кроме *caf1* оперона геном *Y. pestis* содержит еще девять генетических кластеров, продукты которых образуют шаперон/ашерные системы секреции (ШАСС) (Deng *et al.*, 2002; Parkhill *et al.*, 2001). Высококонсервативные системы секреции IV типа, присутствующие у грамотрицательных бактерий, осуществляют сборку ассоциированных с вирулентностью поверхностных волокон - пилей или фимбрий, вовлеченных в клеточную адгезию (Thanassi *et al.*, 1998; Vogler *et al.*, 2011; Zav'yalov *et al.*, 2010). ШАСС у штаммов *subsp. pestis*, кодируемые оперонами *caf1* (образование при температуре ≥ 37 °C и pH $\geq 6,5$ гомополимерной капсулы из субъединиц Caf1) и *psaEFABC* (образование при температуре ≥ 37 °C и pH $\leq 6,0$ альтернативной гомополимерной капсулы из субъединиц PsaA) достаточно хорошо изучены (Анисимов, 1999; Quenee *et al.*, 2008). На модели штамма *Y. pestis subsp. pestis* КИМ показано, что некоторые из остальных ШАСС способны образовывать дополнительные пили адгезии и, вероятно, играют роль в патогенности чумного микроба (Felek *et al.*, 2011; Hatkoff *et al.*, 2012).

Степень разработанности темы исследования

Сравнительный анализ генов, кодирующих факторы патогенности, показал высокую степень консервативности нуклеотидных последовательностей у эпидемических штаммов чумного микроба и полиморфизм, свойственный

эндемичным – полевым штаммам (Anisimov *et al.*, 2010; Dentovskaya *et al.*, 2016; Platonov *et al.*, 2016; Shaban *et al.*, 2017). Недавно в капсульном антигене из штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *caucasica* Pestoides F (Garcia *et al.*, 2007) и G8786 (Golubov *et al.*, 2004) выявили единичную аминокислотную замену аланина на серин в положении 48 (A48→S48). Также описали мутации в штаммах *Y. pestis* subsp. *pestis* E1979001 (bv. *antiqua*) и F1991016 (bv. *orientalis*), приводящие к укорочению последовательности белка до 147 и 130 аминокислот, с образованием, скорее всего, нефункциональных пептидов. Проведенное позднее секвенирование структурного гена *cafI* из 41 штамма подвида *microti*, выделенных от полевок и их блох в Грузии и Армении на территории Закавказского высокогорного природного очага чумы (04-06), показало присутствие одной и той же нуклеотидной замены, приводящей к аминокислотной замене A48→S48 (NT2 аллель *cafI*, номер доступа в GenBank - EF165977), в то время как штаммы, выделенные в том же регионе от песчанок и сусликов (подвид *pestis*), несли ген с канонической последовательностью (NT1 аллель *cafI*, номер доступа в GenBank - EF165976) (Revazishvili *et al.*, 2009).

Однако до начала наших исследований никто не проводил оценку полиморфизма структурного гена *cafI* у представителей остальных внутривидовых групп чумного микроба, не определял перекрестную протективность различных изоформ капсульного антигена, не изучал способность коммерческих иммунодиагностикомов выявлять штаммы чумного микроба, продуцирующие альтернативные изоформы CafI, не осуществлял поиск *in silico* возможного полиморфизма остальных генов *cafI* оперона и генов, кодирующих компоненты других ШАСС *Y. pestis* и их прародителя *Y. pseudotuberculosis*.

Анализ генетического и структурно-функционального полиморфизма капсульного антигена *Y. pestis*, выполненный с привлечением комплекса методов генной инженерии, микробиологии, биохимии, компьютерного моделирования и иммунологии позволит получить новые сведения о степени его изменчивости у представителей различных внутривидовых групп *Y. pestis* в ходе микроэволюции, а также роли различных структурных вариантов CafI в иммуногенезе чумы. Это создаст основу для конструирования экспериментальных вакцин нового поколения, обеспечивающих эффективную защиту от гибели при заражении штаммами, экспрессирующими любые изоформы белка.

Цель исследования:

Получение новых сведений о распространенности и степени полиморфизма капсульного антигена *Y. pestis*, эффективности индикации штаммов с атипичными изоформами F1 с помощью коммерческих иммунодиагностикомов и напряженности перекрестного иммунитета.

Задачи исследования:

1. Изучить филогеографию полиморфизма нуклеотидных последовательностей *cafI* оперона и изоформ CafI белка *Y. pestis* и провести сравнительное компьютерное моделирование структуры и структурной неупорядоченности изоформ капсульного антигена для выявления возможных функциональных отличий.

2. Выделить и очистить препаративные количества изоформ CafI *Y. pestis*.

3. Изучить перекрестную иммуногенную активность изоформ капсульного антигена *Y. pestis*.

4. Провести полногеномное секвенирование одного-двух штаммов для

каждой из доступных внутривидовых групп чумного микроба для последующего филогеографического анализа полиморфизма генов систем секреции IV типа.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что для штаммов подвида *microti* биоваров *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica* и *ulegeica* свойственен глобальный тип белка Caf1_{NT1} (A48 F117). Впервые обнаружен тип Caf1_{NT3} (A48 V117), эндемичный для штаммов Дагестанского высокогорного природного очага чумы (№ 39).

Анализ нативной неупорядоченности фолдинга трех изоформ капсульного антигена *Y. pestis* показал, что обе замены, найденные в Caf1 (A48→S48 в Caf1_{NT2} и F117→V117 в Caf1_{NT3}), вызывают заметное увеличение склонности к местной внутренней неупорядоченности в окружающих коротких регионах белка.

Впервые экспериментально установлено, что изоформы Caf1 способны индуцировать напряженный перекрёстный иммунитет, и определена степень перекрестной иммунохимической активности.

Впервые получены полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов *bv. caucasica* из Дагестанского высокогорного природного очага чумы, а также изолятов *bv. hissarica*, *talassica* и *ulegeica*.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Определена степень популяционной изменчивости капсульного антигена в основных внутривидовых филогенетических группах чумного микроба.

Экспериментально доказано, что отечественные коммерческие диагностикумы пригодны для индикации штаммов чумного микроба, продуцирующих все три изоформы капсульного антигена. Установлено отсутствие различий по выявлению трех изоформ Caf1 с помощью иммунохроматографического экспресс-теста для серодиагностики чумы «ИХ тест-система *Y. pestis*» (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск, Россия) и тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной «ИФАПестФ1-М» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов).

Показано, что иммунитет, индуцированный Caf1_{NT1}, достаточен для надежной защиты мышей при заражении штаммами *Y. pestis*, продуцирующими изоформы Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} в дозах, соответствующих таковым при укусе блохи.

Выявлено различие в поведении Caf1_{NT3} изоформы во время гидрофобной хроматографии: элюирование Caf1_{NT3} распределялось между 600 мМ и 50 мМ градиента сульфата аммония (СА), в то время как Caf1_{NT1} и Caf1_{NT2} изоформы достигали максимума в 350 мМ при тех же условиях элюирования.

Депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (п. Оболенск Московской обл.) штаммы *Y. pestis* subsp. *microti* *bv. caucasica* C-376pCad⁻ и C-824pCad⁻ - продуценты капсульного антигена чумного микроба изоформ Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} соответственно (федеральный уровень внедрения).

Полногеномные последовательности 19 штаммов *Y. pestis* депонированы в базе данных GenBank с присвоением следующих кодов доступа: *Y. pestis* subsp. *microti* *bv. caucasica* C-537 - LIYP00000000, C-590 - LIYQ00000000, C-290 - LIYU00000000, C-197 - LIYX00000000, C-235 - LIYY00000000, C-267 - LIYZ00000000, C-359 - LIZB00000000, C-291 - LIZC00000000, C-346 - LIZE00000000, C-666 - LIZF00000000; *Y. pestis* subsp. *microti* *bv. talassica* A-1804 - LIYW00000000, A-1807 - LIYT00000000; *Y. pestis* subsp. *microti* *bv. altaica* I-3455 - LIYV00000000, A-513 - LIZA00000000; *Y. pestis* subsp. *microti* *bv. ulegeica* I-3189 -

LIY000000000, I-2422 - LIZG00000000, I-2239 - LIZD00000000; *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *xilingolensis* I-3134, M20 - LIYR00000000; *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *hissarica* 5307-Gis - LIYS00000000) (международный уровень внедрения).

Выделенные препараты Caf1 были использованы для получения миниантител в группе иммунохимии филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Пушино).

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 являлся полиморфизм капсульного антигена *Y. pestis*, его влияние на эффективность иммунодиагностики и вакцинопрофилактики инфекции. В работе применяли микробиологические, генетические, молекулярно-биологические, иммунологические и биоинформационные методы, а также методы статистической обработки данных.

Штаммы бактерий. В диссертационном исследовании использовали 125 штаммов бактерий: *Yersinia pseudotuberculosis* (n = 1); *Y. pestis* subsp. *pestis* (n = 2) и *Y. pestis* subsp. *microti* (n = 122), в том числе bv.: *caucasica* (n = 79), *hissarica* (n = 4), *talassica* (n = 4), *altaica* (n = 19), *xilingolensis* (n = 3), *qinghaiensis* (n = 2), *ulegeica* (n = 11), циркулирующих на территории природных очагов чумы СНГ и Монголии.

Микробиологические методы. Штаммы *Y. pestis* выращивали на плотной или жидкой питательных средах Хоттингера (различные серии лабораторного производства ФБУН ГНЦ ПМБ) в течение двух суток при температуре 28 °С. Для накопления капсульного антигена чумной микроб культивировали при температуре 37 °С в течение 48 ч в интервале рН от 6,3 до 7,3. Атенуированные культуры *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *caucasica* C-376pCad⁻ и C-824pCad⁻, рост которых независим от ионов кальция при температуре 37 °С, получали путем высева исходных штаммов на магниево-оксалатный агар в соответствии с рекомендациями (Николаев, 1972). Для препаративного выделения капсульного антигена штаммы выращивали с аэрацией при температуре 37 °С в ферментере New Brunswick Scientific с рабочим объемом 2 л в жидкой среде. Биомассу отделяли центрифугированием после 12-14 ч инкубации, супернатант использовали для выделения изоформ Caf1.

Биохимические методы. Секретируемый капсульный антиген выделяли из надосадочной фракции бульонных культур трех аттенуированных штаммов *Y. pestis* (EV НИИЭГ – изоформа Caf1_{NT1}, C-376pCad⁻ – изоформа Caf1_{NT2} и C-824pCad⁻ - изоформа Caf1_{NT3}) с последующей хроматографической очисткой.

Биологические методы. Перекрёстную серологическую активность и протективность оценивали на 7-недельных мышах линии BALB/c (19 ± 2) г (n = 384), (Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова

РАН, Россия). Иммунизацию мышей осуществляли препаратами антигенов Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3}, выделенных из штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, С-376pCad⁻ и С-824pCad⁻, соответственно. Для оценки LD₅₀ мышей трех иммунизированных и контрольной группы заражали вирулентными штаммами, продуцирующими разные изоформы Caf1. Показатель LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева (1972).

Иммунологические методы. Серологическую перекрёстную активность трех изоформ Caf1 *Y. pestis* оценивали в иммунохроматографическом (ИХ) тесте экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ тест *Yersinia pestis*» (ФБУН ГНЦ ПМБ) и иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной «ИФАПестФ1-М» (РосНИПЧИ Микроб) в соответствии с рекомендациями производителей. Для оценки титра антител к Caf1 *Y. pestis* в сыворотках иммунных мышей использовали метод твердофазного ИФА.

Молекулярно-генетические методы.

Выделение ДНК проводили с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК из биопроб производства НПФ «Литех» (Россия). Измерение концентрации ДНК осуществляли на флуориметре Qubit 2.0. с помощью набора реактивов Qubit® dsDNA HS Assay Kit.

Секвенирование гена *caf1*: нуклеотидную последовательность гена *caf1* определяли путем прямого секвенирования ПЦР-фрагмента, полученного после амплификации части *caf1* оперона соответствующего штамма, амплификацию участка гена *caf1* проводили на приборе С1000™ (BioRad, США), учет результатов ПЦР осуществляли методом горизонтального электрофореза. Секвенирование по Сенгеру проводили с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3500 Life Technologies (Applied Biosystems, США). Полученные образцы очищали на колонках с использованием набора Centri-Sep™ Spin (Invitrogen™, США) по инструкции, разработанной производителем.

Полногеномное секвенирование выполняли с использованием системы Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA). Деградацию геномной ДНК проводили посредством ультразвука Bioruptor sonication system (Diagenode, BELGIUM). Степень фрагментации ДНК оценивали с использованием системы E-gel Size-select. Очистку ДНК после фрагментации выполняли с использованием набора Agencourt® AMPure® XP Reagent. Лигирование адаптеров и коррекцию разрывов осуществляли с использованием наборов молекулярных баркодов Ion Xpress Barcode Adapters. Оценку количества образца проводили методом ПЦР в реальном времени (количественный вариант) с использованием набора Ion Library Quantitation Kit. Клональную амплификацию на микросферах проводили на автоматизированной системе OneTouch 2.

Биоинформационные и статистические методы. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием баз данных, доступных на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Поиск аналогов последовательностей *caf1* гена вели с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Результаты, полученные с помощью секвенирования по Сенгеру, анализировали с помощью программы Croma Lite

(www.technelysium.com). Множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей производили с помощью программы Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation) и Lasergene 11 (DNASTAR, USA).

Для фильтрации ридов, полученных в ходе полногеномного секвенирования, использовали программу Trimmomatic 0.33, а сборку в контиги выполняли при помощи программ SPAdes 3.9. и Newbler 2.9. Биоинформационный анализ осуществляли с помощью программ Lasergene DNA Star v. 11 (DNASTAR, США), Vector NTI10 (Invitrogen, США), Mauve (Multiple Genome Alignment; <http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>) и веб-ресурса BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Внутреннюю неупорядоченность изоформ CafI оценивали с использованием анализаторов PONDR® VSL2, PONDR® VLXT, PONDR® FIT. Построение вторичной структуры выполняли с помощью программы LaserGene DNA. Трёхмерную структуру моделировали с помощью автоматизированного сервера Swiss-model и Bri-shur, поиск гомологов белка осуществляли через сервер Protein Data Bank, PDB.

Положения, выносимые на защиту

1. Белок CafI существует в трёх изоформах: глобальный тип NT1 (A48 F117; CafI_{NT1}); NT2 тип (S48 F117; CafI_{NT2}), характерный для Закавказского высокогорного и Приараксинского низкогорного природных очагов чумы (№ 04-07); и впервые обнаруженный NT3 тип (A48 V117; CafI_{NT3}), эндемичный для Дагестанского высокогорного природного очага чумы (№ 39).

2. Несмотря на структурные отличия, три изоформы капсульного антигена *Y. pestis* обладают перекрестной иммуногенной активностью и протективностью.

3. Специфический для отдельных филогенетических групп чумного микроба полиморфизм генов, кодирующих системы секреции IV типа, может быть использован для идентификации и определения биварной принадлежности изолятов.

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 проекта Российского Научного Фонда № 14-15-00599 «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоцых штаммов *Yersinia pestis*» и НИР «Совершенствование нормативно-методической базы процедуры депонирования штаммов патогенных микроорганизмов, клеточных культур и результатов их исследований в государственных коллекциях Роспотребнадзора».

Результаты исследования получены с использованием современного поверенного и сертифицированного оборудования с привлечением методов статистического анализа и математического моделирования.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на семи Всероссийских и международных конференциях: 7th International Symposium of Integrative Zoology, "Wildlife Monitoring and Data Collection under Global Change" (25-28 Aug 2015, Xi'an, Shaanxi province, China; Международной научно-практической конференции "Перспективы сотрудничества государств - членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней" (25-26 мая 2015, Сочи); VII Всероссийской научно-практической конференции молодых

ученых и специалистов Роспотребнадзора "Современные проблемы эпидемиологии и гигиены" (8-10 декабря 2015 года, Санкт-Петербург); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора: «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (2-4 ноября 2016 г., Московская обл., Лужки); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 18-20 апреля 2017 г.); II Национальном конгрессе бактериологов "Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях" (20-22 сентября 2016 г., Санкт-Петербург); 15th Finnish Microbial Pathogenesis Day and 65-Year Anniversary Symposium (August 21-23, 2017).

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с к.б.н. П.Х. Копыловым, д.м.н. С.В. Дентовской, к.б.н. А.А. Кисличкиной, к.б.н. М.Е. Платоновым, к.б.н. Комбаровою Т.И. Сравнительное компьютерное моделирование нативной неупорядоченности фолдинга различных изоформ капсульного антигена *Y. pestis* на основании определённых автором аминокислотных последовательностей проводил В.Н. Уверский (Университет Южной Флориды, Тампа, штат Флорида, США). 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 7 статей в международных реферируемых научных журналах и 5 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, результатов исследования с их обсуждением, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего 29 работ отечественных и 156 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 10 таблицами, включает 3 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Сравнение молекулярно-генетических, физико-химических и структурно-пространственных свойств изоформ Caf1, выявление отличий

Вариабельность последовательности гена *caf1* впервые описали Т. Revazishvili *et al.* (2008) для штаммов биовара *caucasica*, выделенных на территории Грузии и Армении от полевых и их эктопаразитов. В настоящем исследовании провели секвенирование нуклеотидной последовательности гена *caf1* у 122 штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, относящихся к биоварам *caucasica*, *hissarica*, *talassica*, *altaica*, *xilingolensis*, *qinghaiensis* и *ulegeica*, выделенных на территории природных очагов чумы СНГ и Монголии.

В результате сравнения аминокислотных последовательностей впервые установили, что, как и у представителей *Y. pestis* subsp. *pestis*, белок Caf1 изолятов *Y. pestis* subsp. *microti* биоваров *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica* и *ulegeica* несет в позиции 48 аминокислоту аланин, а в позиции 117 - фенилаланин. Исследованные штаммы биовара *caucasica* образовали две группы. Представители биовара *caucasica*, циркулирующие в Закавказском высокогорном природном очаге чумы, включающем мезоочаги Ленинанканский горный (№ 04), Присеванский горный (№ 05) и Зангезуро-Карабахский горный (№ 06), а также Приараксинском низкогорном очаге (№ 07), в позиции 48 белка Caf1 несли аминокислоту серин, а в 117 – фенилаланин. У штаммов биовара *caucasica*, циркулирующих в Восточно-Кавказском высокогорном природном очаге чумы (№ 39), в позиции 48 обнаружили аминокислоту аланин, а в 117 – валин (рис. 1).

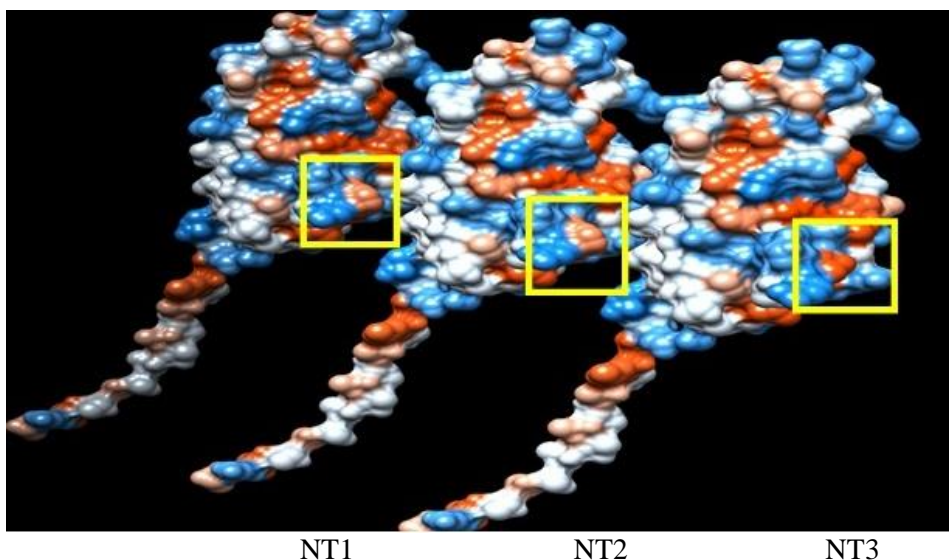


Рисунок 1 – Множественное выравнивание последовательностей изоформ белка Caf1, обнаруженных у разных штаммов *Y. pestis*

Таким образом, изоформа NT2 (S48 F117) является типичной в Закавказском высокогорном и Приараксинском низкогорном природных очагах чумы, в то время как впервые обнаруженный тип NT3 (A48 V117) эндемичен для Восточно-Кавказского высокогорного природного очага. При этом классическая изоформа Caf1_{NT1} (A48 F117) продолжает оставаться главным типом, характерным для штаммов *Y. pestis* подвида *pestis*, а также изолятов подвида *microti* биоваров *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica* и *ulegeica*.

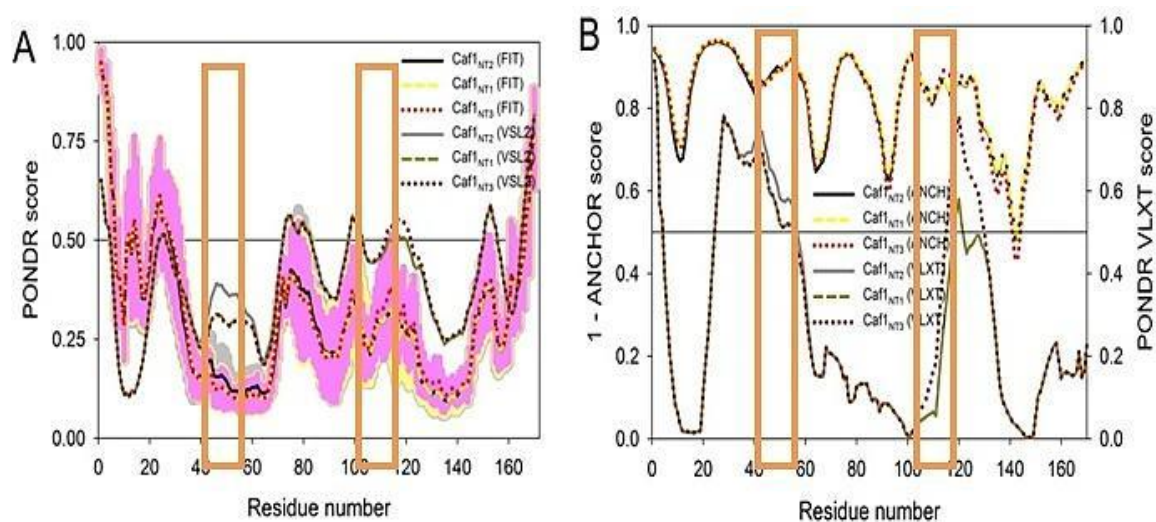
Для того чтобы понять, влияет ли обнаруженный полиморфизм на структурные и функциональные свойства Caf1 чумного микроба проанализировали двухмерную и трехмерную структуру белка, а также существование

потенциальных областей неупорядоченности. Появление единичной аминокислотной замены в положении 48 у Caf1_{NT2} и в положении 117 у Caf1_{NT3} внесло изменение во вторичную структуру двух изоформ капсульного антигена, а именно изменения затронули α , β регионы, области поворотов участков и их частоту. При этом сформированные предполагаемые трёхмерные модели изоформ Caf1 чумного микроба визуально не отличались друг от друга (рис. 2). Единственное отличие отмечали в Caf1_{NT3}, где область а.о. 117 была окрашена в более насыщенный оранжевый цвет, что свидетельствует об увеличении гидрофобных свойств.



Жёлтым квадратом выделена область, соответствующая а.о. 117
 Рисунок 2 – Визуализация анализа молекулярных структур трёх изоформ Caf1

В дальнейшем оценили склонность к неупорядоченности у изоформ Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} и проанализировали эффект произошедших аминокислотных замен на потенциальные области неупорядоченности белка. Проведенный компьютерный анализ с помощью алгоритмов PONDR_®VSL2, PONDR_®FIT и PONDR_®VLXT показал, что замены A48→S48 и F117→V117, найденные в изоформах Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} соответственно, оказывают влияние на внутреннюю упорядоченность в местах коротких регионов, их окружающих (рис. 3). Обе замены вызывают заметное изменение упорядоченности, но только последняя оказывает влияние на интерактивность белка. Полученные нами данные о существовании в структуре Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} внутренне неупорядоченных областей позволили предположить, что изоформы белка могут отличаться по физико-химическим свойствам.



(А) Профили неупорядоченности, полученные при анализе белков с помощью PONDR-VSL2 (CafI_{NT1} (пунктирная зеленая линия), CafI_{NT2} (сплошная серая линия), CafI_{NT3} (пунктирная темно-красная линия)) и PONDR-FIT (CafI_{NT1} (пунктирная желтая линия), CafI_{NT2} (сплошная черная линия) и CafI_{NT3} (пунктирная красная линия)). Остатки/регионы белков со значением, превышающим 0,5, являются внутренне неупорядоченными. Окрашенные области вокруг PONDR-FIT кривых представляют распределение ошибок в оценке склонности к неупорядоченности.

(В) Сравнение профилей неупорядоченности, полученных для изоформ CafI с помощью PONDR-VLXT (CafI_{NT1} (пунктирная темно-желтая линия), CafI_{NT2} (сплошная серая линия) и CafI_{NT3} (пунктирная темно-красная линия) и основанные на внутренней неупорядоченности взаимодействиях, полученные при использовании алгоритма ANCHOR (CafI_{NT1} (пунктирная желтая линия), CafI_{NT2} (сплошная черная линия) и CafI_{NT3} (пунктирная красная линия)).

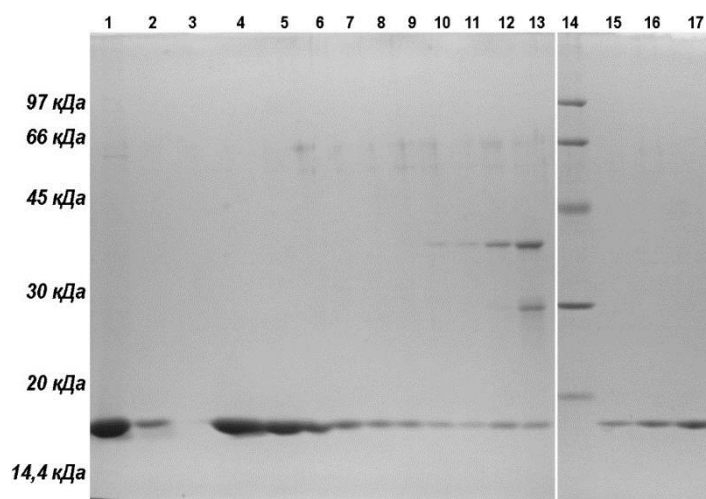
Для легкости сравнения склонности к неупорядоченности и присутствия потенциальных неупорядоченных связывающих сайтов данные ANCHOR представлены в форме разности (1 – значение ANCHOR). Таким образом, для профилей PONDR-VLXT регионы со значением выше 0,5 являются внутренне неупорядоченными, а для профилей ANCHOR регионы с вероятностью ниже 0,5 предсказаны, как регионы связывания.

Рисунок 3 – Оценка внутренней неупорядоченности различных изоформ CafI *Y. pestis*

Выделение и очистка изоформ CafI

При выделении высокоочищенных вариантов белка из надосадочной части бульонных культур трех аттенуированных штаммов *Y. pestis* (EV НИИЭГ – изоформа CafI_{NT1}, С-376 – изоформа CafI_{NT2} и С-824 - изоформа CafI_{NT3}) методом гидрофобной хроматографии элюирование изоформ CafI_{NT1} и CafI_{NT2} происходило в основном в области концентрации сульфата аммония, соответствующей 350 мМ, в то время как элюирование CafI_{NT3} при тех же условиях эксперимента отмечали в широком диапазоне концентраций соли (от 600 до 50 мМ) (рис. 4).

Результаты исследования свидетельствуют о том, что аминокислотная замена F117→V117, характерная для штаммов из Дагестанского высокогорного природного очага чумы (№ 39), влияет на физико-химические свойства изоформы CafI_{NT3}, в отличие от замены A48→S48 в изоформе CafI_{NT2}.



Линии: 1 – 13 - фракции белка Caf1_{NT1}, полученного при гидрофобной хроматографии на фенол-сефарозе; 14 – маркеры молекулярной массы (97, 66, 45, 30, 20 и 14,4 кДа); 15, 16 и 17 – препараты очищенных белков Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3}, соответственно

Рисунок 4 – ДСН-ПААГ электрофорез изоформ белка Caf1 после окрашивания Coomassie Brilliant Blue

Таким образом, три изоформы капсульного антигена чумного микроба имеют молекулярно-генетические, структурно-пространственные и физико-химические отличия.

Перекрёстная серологическая активность изоформ Caf1 *Y. pestis*

Caf1_{NT1} является одним из главных иммунодоминантных антигенов, отвечающих за протективный иммунный ответ против чумы, и, соответственно, используется в качестве основного компонента при разработке субъединичных вакцин, а также служит основной молекулярной мишенью при иммунодиагностике (Dennis *et al.*, 1999; Dentovskaya *et al.*, 2013; Feodorova *et al.*, 2012; Quenee *et al.*, 2008, 2009). Однако до начала наших исследований не было известно, могут ли штаммы, несущие NT2 и NT3 аллели гена *caf1*, преодолеть иммунитет, индуцированный изоформой Caf1_{NT1}, а также способны ли существующие методы иммуноанализа обнаруживать чумной микроб с нетипичными аллелями *caf1* гена. Чтобы ответить на данные вопросы, оценили серологическую перекрестную активность и перекрестную протективность изоформ Caf1 чумного микроба. Все три изоформы в равной степени детектировались с помощью иммунохроматографического теста для обнаружения чумного микроба «ИХ тест *Yersinia pestis*» (рис. 5) и иммуноферментного анализа с применением тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной «ИФАПестФ1-М». В иммунохроматографическом тесте лимит детекции Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} составил 1,0 нг/мл. Чувствительность метода ИФА по обнаружению белков составила (19 ± 1,0) нг/мл.

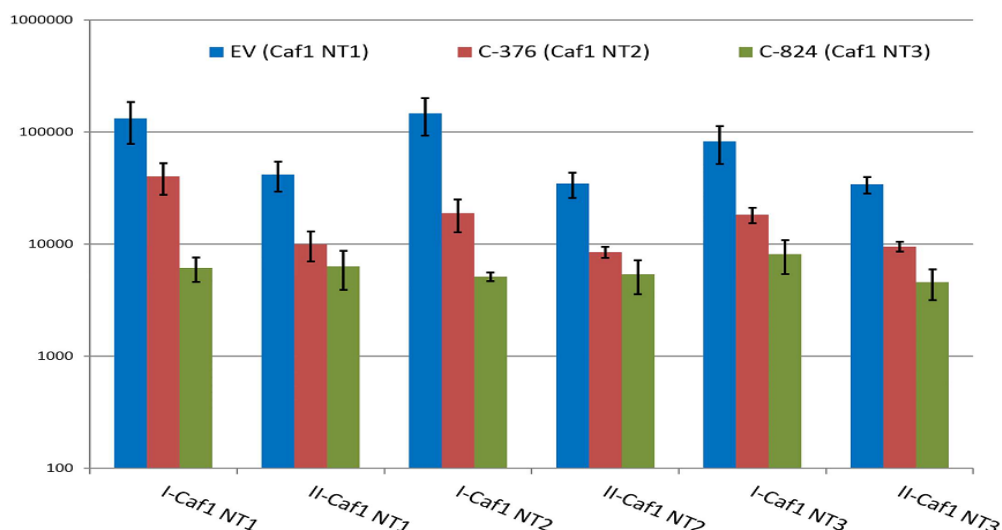


Для всех изоформ капсульного антигена результат был идентичным

Рисунок 5 – Результат теста с использованием набора реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ тест *Yersinia pestis*» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск)

Очевидно, что использованные при конструировании двух тестов моноклональные антитела, полученные на вариант белка Caf1_{NT1}, распознают незатронутый мутацией эпитоп, идентичный у всех трех изоформ, а значит, все они могут быть легко обнаружены с помощью антитела, используемого в данных диагностикумах.

Способность сывороток мышей, вакцинированных Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3}, перекрестно взаимодействовать с тремя изоформами Caf1 *Y. pestis* также выявляли с помощью иммуноферментного анализа. Специфические антитела сывороток иммунизированных животных реагировали со всеми тремя изоформами белка, сорбированными в лунки иммунологического планшета, несмотря на изоформу белка, использованного для вакцинации. После первого и второго этапа иммунизации, титры анти-Caf1 антител были в 4–7 раз выше у животных, иммунизированных изоформой Caf1_{NT1}, независимо от антигена, сорбированного на планшете (рис. 6). Гуморальный иммунный ответ у животных, индуцированный введением изоформы Caf1_{NT3}, был самым низким.



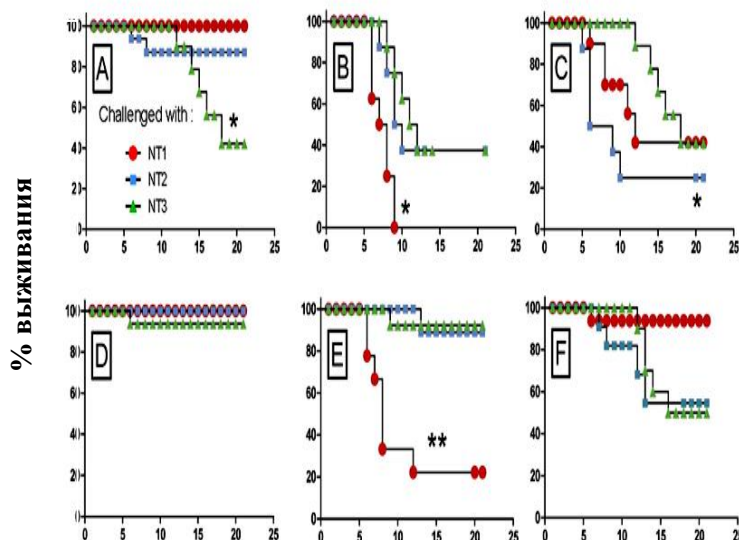
Мышей иммунизировали Caf1_{NT1} (синие столбцы), Caf1_{NT2} (красные столбцы) или Caf1_{NT3} (зеленые столбцы), кровь забирали: (I) на 29 день после первой иммунизации и (II) на 43 день после второй иммунизации; антительный ответ определяли в ИФА против изоформ NT1, NT2 и NT3. Данные представляют собой среднее ± стандартное отклонение

Рисунок 6 – Перекрестная серологическая активность изоформ Caf1

Все тестируемые изоформы белка Caf1 показали высокую степень перекрёстной серологической активности, предполагая, что моноклональные антитела, использованные при создании теста, специфичны для общих эпитопов Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} или Caf1_{NT3}. Однако в будущем при разработке тестов для детекции чумного микроба и/или Caf1 было бы рациональным включать в панель штаммов для тестирования и изоляты, продуцирующие эндемичные изоформы Caf1.

Перекрёстная протективность изоформ Caf1 *Y. pestis*

При подкожном (п/к) заражении мышей штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 (LD₅₀ = 10 КОЕ) превосходит по вирулентности штаммы *Y. pestis* subsp. *microti* bv. caucasica C-376 и C-824 (LD₅₀ = 5.0 × 10² КОЕ и LD₅₀ < 2,0 × 10³ КОЕ, соответственно), поэтому заражающие дозы выравняли. Животным вводили равное количество LD₅₀ (от 2 LD₅₀ до 2 × 10³ LD₅₀).



Мышей линии BALB/c иммунизировали изоформами Caf1_{NT1} (A,D), Caf1_{NT2} (B, E) и Caf1_{NT3} (C, F) и заражали штаммами *Y. pestis*, продуцирующими различные изоформы Caf1: Caf1_{NT1} (кружки); Caf1_{NT2} (квадраты); Caf1_{NT3} (треугольники). Выживание контролировали в течение 21 дня после заражения. Результаты получены для каждой группы, инфицированной п/к (n = 8 BALB/c).

*P < 0.05; **P < 0.01 (Log-rank Mantel-Cox test).

Рисунок 7 – Выживаемость иммунизированных мышей после п/к введения 2000 LD₅₀ (панели A-C) и 200 LD₅₀ (панели D-F) штаммов *Y. pestis*

По нашим данным изоформа Caf1_{NT1}, традиционно используемая в коммерческих и экспериментальных вакцинных препаратах, обладала наилучшими протективными свойствами и обеспечивала 100 %-ную защиту для двукратно вакцинированных мышей, зараженных 2000 LD₅₀ штамма *Y. pestis* 231; 85 %-ную защиту при заражении штаммом *Y. pestis* C-376 и 40 %-ную защиту от штамма *Y. pestis* C-824 (рис. 7). Таким образом, иммунизация изоформой NT1 частично защищала животных и от инфекции, вызванной бактериями с изоформами NT2 и NT3 даже при введении высокой заражающей дозы штаммов *Y. pestis* C-376 и C-824. Вакцинация изоформой Caf1_{NT2} защищала от инфекции, вызванной штаммами, экспрессирующими изоформы NT2 и NT3, но была менее эффективна против штамма, экспрессирующего изоформу NT1. При заражающей дозе любого из трех

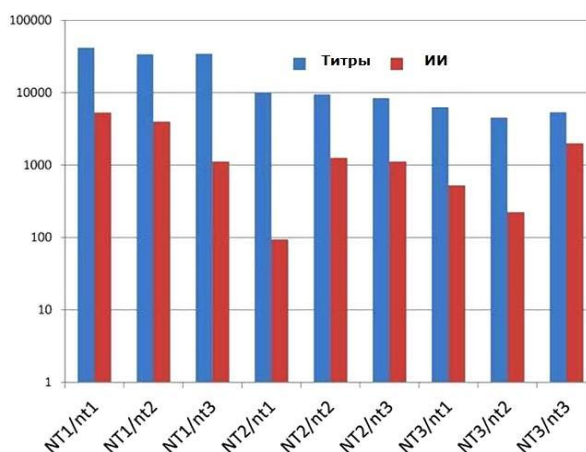
штаммов, равной 20 LD₅₀, все животные вакцинированные Caf1_{NT1} выжили. Эти данные показывают, что вакцинация NT1 изоформой Caf1 обеспечивает более эффективную защиту от всех трех вариантов заражающих штаммов *Y. pestis*. Все животные контрольной группы, которым п/к вводили только гидроокись алюминия, пали в течение первой недели после заражения штаммами *Y. pestis*.

Уровень защиты животных после двукратного п/к введения изоформы Caf1_{NT1} и заражения штаммом, экспрессирующим Caf1_{NT1}, превысил показатель контрольной группы (мыши после введения гидроокиси алюминия) в 5334 раза (табл. 2). Индексы иммунитета (ИИ) после вакцинации изоформами Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} и заражения одноимёнными штаммами *Y. pestis* C-376 и C-824, были ниже и составили 1264 и 3556. Таким образом, рассчитанные показатели напряженности иммунитета согласуются с данными по выживаемости животных, подтверждая, что вакцинация Caf1_{NT1} превосходит по протективности две другие изоформы белка.

Таблица 2 - Показатели напряженности иммунитета, индуцированного введением трех изоформ Caf1 антигена

Заражающий штамм <i>Y. pestis</i>	Индекс иммунитета для мышей, вакцинированных		
	<u>EV</u> (Caf1 _{NT1})	<u>C-376</u> (Caf1 _{NT2})	<u>C-824</u> (Caf1 _{NT3})
<u>231</u> (Caf1 _{NT1})	> 5270	9,4	527
<u>C-376</u> (Caf1 _{NT2})	3996	1264	225
<u>C-824</u> (Caf1 _{NT3})	1125	1125	3556

Корреляция между титрами анти-Caf1 антител в сыворотке крови животных после вакцинации и ИИ представлена на рисунке 8.



Синие столбцы соответствуют титрам антител, а красные индексу иммунитета. Заглавными буквами обозначены изоформы, используемые для иммунизации, а строчными – генотипы штаммов, используемых для оценки иммунного ответа

Рисунок 8 – Корреляция между титрами антител в сыворотке крови животных и индексом иммунитета

Выявленный в ИФА уровень титров анти-Caf1 антител положительно коррелировал с ИИ. Например, ИИ в группе мышей, иммунизированных изоформой Caf1_{NT1}, был выше, чем в других группах, и у данных животных определялись более высокие титры антител. В противоположность этому, у мышей, иммунизированных изоформами Caf1_{NT2} или Caf1_{NT3}, наблюдали более низкий ИИ и более низкую иммунореактивность сывороток по результатам ИФА.

Полиморфизм нуклеотидных последовательностей шаперон/ашерных систем секреции *Y. pestis*

Y. pestis и другие грамотрицательные патогенные бактерии используют шаперон/ашерный путь секреции (система секреции IV типа) для сборки поверхностных структур, участвующих в адгезии (Felek *et al.*, 2011). Геном чумного микроба содержит 10 кластеров генов, относящихся к шаперон/ашерным системам секреции (рис. 9). ШАСС возбудителя чумы, кодируемые опероном *caf1* (образование при температуре ≥ 37 °C и pH $\geq 6,5$ гомополимерной капсулы из субъединиц Caf1) и *psaEFABC* (образование при температуре ≥ 37 °C и pH $\leq 6,0$ альтернативной гомополимерной капсулы из субъединиц PsaA) достаточно хорошо изучены (Анисимов, 1999). Установлено, что некоторые из остальных ШАСС штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* КИМ способны образовывать дополнительные пили адгезии и, вероятно, играют роль в патогенности *Y. pestis* (Felek *et al.*, 2011; Hatkoff *et al.*, 2012). К моменту начала наших исследований данные о наличии полиморфизма у белков ШАСС штаммов *Y. pestis*, относящихся к различным филогенетическим группам, отсутствовали, как и полногеномные последовательности штаммов большинства биоваров неосновного подвида.

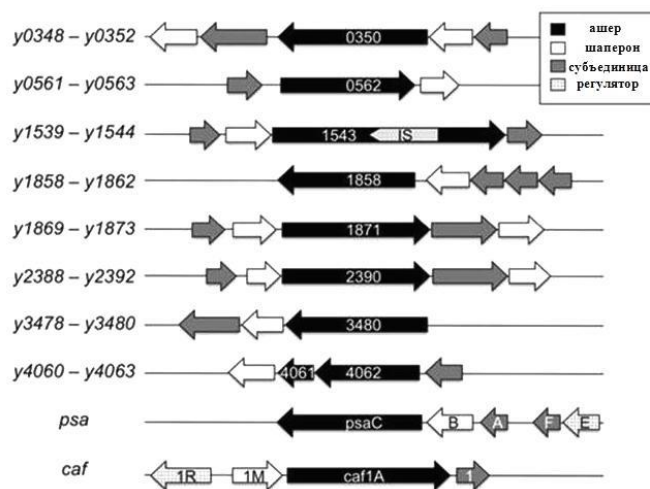


Рисунок 9 – Кластеры генов, относящиеся к шаперон/ашерным системам секреции *Y. pestis* (Hatkoff *et al.*, 2012)

Мы провели полногеномное секвенирование 19-ти штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*: bv. *talassica* A-1804 и A-1807, циркулирующих в Таласском высокогорном природном очаге чумы; bv. *altaica* И-3455 и А-513 из Алтайского горного очага; bv. *ulegeica* I-3189, I-2422, I-2239 из Гурван-Сайханского, Бухен-Ульского и Сайлюгемского очага чумы соответственно; bv. *xilingolensis* I-3134, выделенного на территории Баян-Хонгорского аймака, bv. *hissarica* 5307-Gis из Гиссарского очага; bv. *caucasica* C-590, C-290, C-197, C-235, C-267, C-359, C-291, C-346, C-666,

выделенных в Закавказском высокогорном природном очаге и Приараксинском низкогорном очаге песчаночьевого типа; и штамма bv. caucasica C-537, изолированного в Восточно-Кавказском высокогорном очаге чумы. Полученные последовательности депонировали в базе данных, доступной на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Всего выполнено семь запусков полногеномного секвенирования, штаммам присваивали баркоды–индексы (идентификационные номера). Некоторые штаммы были секвенированы дважды для повышения качества выходных данных. После одного из запусков (для примера взят 4-й запуск) произошла загрузка чипа микросферами на 60 % (рис. 10.1), из них 82 % – клональные и 18 % - поликлональные, а средняя длина ридов составила 273-3630 п.н. (рис. 10.2).

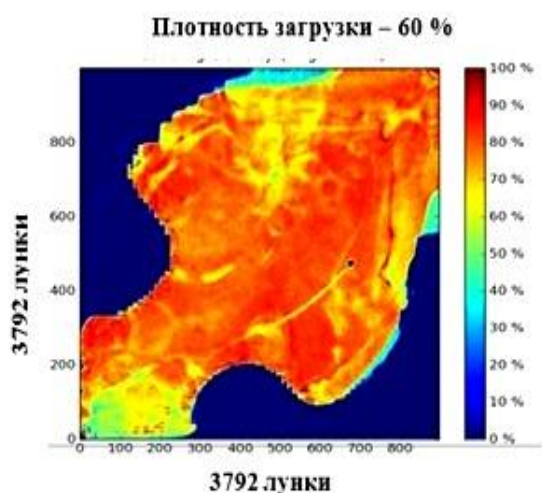


Рисунок 10.1 – Эффективность загрузки чипа Ion 318™ Chip v2 микросферами при секвенировании штаммов *Y. pestis* в 4-ом запуске

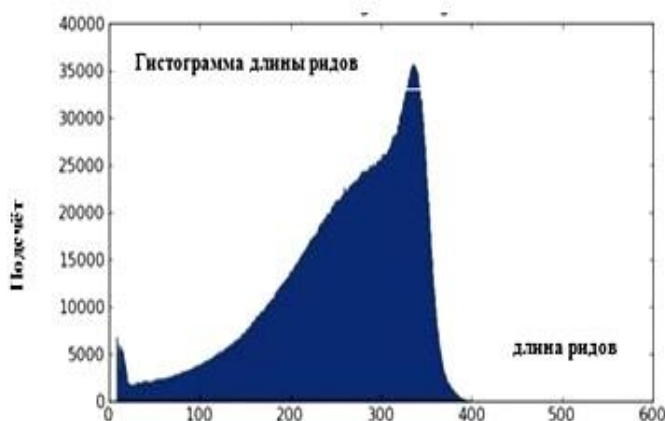


Рисунок 10.2 – Распределение количества прочтений от длины рида при секвенировании штаммов *Y. pestis* в 4-ом запуске

При сборке *de novo* для каждого генома получили от 180 до 341 контигов, суммарная длина которых составляла от 451 до 464 млн. п.н., что соответствует полному геному возбудителя чумы. Каждый геном содержал от 3711 до 4008 кодирующих последовательностей. При этом во всех случаях удалось реконструировать последовательности десяти оперонов ШАСС чумного микроба. Кроме того, для анализа варибельности шаперон/ашерных систем секреции использовали полногеномные последовательности семи штаммов чумного микроба, депонированных ранее, и штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953.

При поиске **варибельности шаперон/ашерных систем секреции у штаммов *Y. pestis* различных SNP-типов** акцент был сделан на несинонимичные нуклеотидные замены, ведущие к изменению кодируемых аминокислот. У штамма Angola (SNP-тип **0.PE3**) в продукте гена *y0562* (ашер) произошла замена глутаминовой кислоты на лизин на N-концевом домене белка (28E→K). У штаммов SNP-типа **0.PE4** обнаружили замену аргинина на изолейцин (190R→I). В продукте гена *y1858* (ашер) у штамма Angola (**0.PE3**) в позиции 526 обнаружили единственную аминокислотную замену аргинина на гистидин (526R→H). У штаммов SNP-типа **0.PE7** в позиции 178 в N-концевом домене продукта гена *y1871*

(ашер) произошла замена глицина на аспарагиновую кислоту (178G→D). У представителя **2.ANT** – штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* Nepal 516 - в позиции 167 выявили замену аргинина на цистеин (167R→C). Продукт гена **y2388**, кодирующий субъединицу - белок компонента фимбрии типа 1, в штаммах, относящихся к биовару *caucasica* (**0.PE2**), нес замену валина на лейцин в позиции 49 (49V→L). Продукты генов **y2388**, **y2390**, **y2391** и **y2392** у штамма основного подвида Nepal 516 (**2.ANT**) отсутствовали в связи с делецией около 100 т.п.н. У штаммов биовара *ulegeica* (**0.PE5**) в позиции 207 аминокислотной последовательности продукта гена **y2390** произошла замена аргинина на гистидин (207R→H). У изолятов биовара *caucasica* (**0.PE2**), выделенных на территории природных очагов № 04-07, на С-концевом домене в положении 840 обнаружили замену аспарагиновой кислоты на глутаминовую кислоту (840D→E). При этом у штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, выделенных на территории природного очага № 05, дополнительно присутствовала замена аргинина на глутамин в позиции 392 (392R→Q). При анализе нуклеотидной последовательности продукта гена **y2392**, кодирующего шаперон, в штаммах, относящихся к биовару *caucasica* (**0.PE2**) обнаружено встраивание IS285. Вариабельность последовательности для данного продукта, а именно замену глицина на серин в С-концевом домене белка (180G→S), отметили только у штамма Angola (**0.PE3**). В продукте гена **y3478**, кодирующего субъединицу, в штаммах биовара *caucasica* (**0.PE2**) делеция одного нуклеотида привела к сдвигу рамки считывания и формированию стоп кодона через 33 нуклеотида. Вероятно, этот кластер генов не функционирует у штаммов SNP-типа **0.PE2**. У штаммов, относящихся к биоварам *talassica* и *hissarica* (**0.PE4**) в этом же продукте была найдена замена валина на глицин (114V→G). У представителей биовара *talassica* в гене шаперона **y3479** произошла замена аланина на валин (235A →V). У штамма Angola (**0.PE3**) в N-концевом домене продукта гена **y3480**, кодирующего ашер, обнаружили замену фенилаланина на серин (163F→S).

Пять из произошедших замен (по две замены в шаперонах и субъединицах и одна в ашере) не привели к изменению физико-химических свойств кодируемых белков (полярности, заряда, структуры и гидрофобности/гидрофильности). Из 11 аминокислотных замен (восемь - в ашерах, одна - в шапероне, две в субъединицах), несущих изменение физико-химических свойств, четыре наблюдали у штамма SNP-типа **0.PE3** Angola, по одной выявили у штаммов SNP-групп **0.PE4**, **0.PE5**, **2.ANT** и **0.PE7**, три - у **0.PE2**. Следует отметить, что штамм Angola генетически сильно отличается от остальных штаммов *Y. pestis*, возможно, за счет мутаций, накопленных во время длительного поддержания и многократных пересевов в лабораторных условиях.

Выявленный нуклеотидный полиморфизм в генах, входящих в кластеры ШАСС, изолятов *Y. pestis* различных SNP-типов (учтены несинонимичные нуклеотидные замены) представлен в таблице 3. Согласно полученным результатам определение SNP и детекция генов кластеров ШАСС позволяют дифференцировать представителей филогенетических ветвей чумного микроба **0.PE7**, **0.PE2**, **0.PE3**, **0.PE5**, **2.ANT**, а также биовары *bv. talassica*, *altaica/xilingolensis* и *hissarica* внутри ветви **0.PE4** и штаммы природного очага чумы № 05 внутри ветви **0.PE2/bv. caucasica**.

Таблица 3 – Нуклеотидный полиморфизм в генах, входящих в кластеры ШАСС штаммов *Y. pestis* различных SNP-типов (учтены несинонимичные нуклеотидные замены)

ген	Позиция ¹	0.PE7	0.PE2		0.PE3	0.PE4				0.PE5	1.ORI	1.ANT	2.ANT
			caucasica № 39	caucasica № 04-07	angola	talassica	hissarica	altaica	xilingolensis	ulegeica	CO92	antiqua	Nepal516
y0562	83	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
	569	G	G	G	G	T	T	T	T	G	G	G	G
y1858	872	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
y1871	499	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T
	533	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
y2388	184	G	C	C	G	G	G	G	G	G	G	G	- ³
y2390	620	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	
	1172	G	G	A очаг № 05	G	G	G	G	G	G	G	G	
				G очаги № 04, 06, 07									
	2520	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	
y2392	538	G	IS2852	IS2852	A	G	G	G	G	G	G	G	
y3478	767	A	A	A	A	C	C	A	A	A	A	A	A
	807	C	del C	del C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
y3479	17	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G
y3480	1994	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A
cafIM	790 ⁴	A	A	A	- ³	A	A	A	A	A	A	A	T
cafI	142 ⁴	G	G	T	- ³	G	G	G	G	G	G	G	G
	349 ⁴	T	G	T	- ³	T	T	T	T	T	T	T	T

Примечание: del – делеция; ¹ – *Yersinia pestis* KIM10+ AE009952.1; ² – структура гена нарушена вставкой IS285; ³ - ШАСС отсутствует вследствие делеции; ⁴ *Yersinia pestis* KIM10+ plasmid pMT-1 AF074611.1.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что, как и для представителей подвида *pestis*, для штаммов чумного микроба подвида *microti* биоваров *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica* и *ulegeica* свойственен глобальный тип белка Caf1_{NT1} (A48 F117); у изолятов *Y. pestis* биовара *caucasica* обнаружено два типа белка: Caf1_{NT2} (S48 F117), характерный для Закавказского высокогорного и Приараксинского низкогорного природных очагов чумы, и впервые обнаруженный тип Caf1_{NT3} (A48 V117), эндемичный для Дагестанского высокогорного природного очага чумы.

2. Выделены и очищены с помощью гидрофобной хроматографии нативные препараты трех изоформ белка Caf1. Определено, что изоформы Caf1_{NT1} и Caf1_{NT2} выделялись на пике 350 мМ градиента СА; изоформа Caf1_{NT3} присутствовала во фракциях элюата с концентрациями СА от 600 мМ до 50 мМ при тех же условиях элюирования.

3. На основании компьютерного моделирования выявлено увеличение склонности к местной внутренней неупорядоченности в коротких регионах белка, окружающих аминокислотные замены A48→S48 в Caf1_{NT2} и F117→V117 в Caf1_{NT3}.

4. Установлено, что набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ тест *Yersinia pestis*» и тест-система иммуноферментная для детекции чумного микроба моноклональная «ИФАПестФ1-М» с одинаковой эффективностью обнаруживают все три варианта белка Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} с лимитом детекции 1,0 нг/мл и (19,0 ± 1,0) нг/мл, соответственно.

5. Доказана способность сывороток мышей, вакцинированных Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3}, перекрестно взаимодействовать с тремя изоформами Caf1 *Y. pestis*. Титры анти-Caf1 антител, определённые методом ИФА, были в 4–7 раз выше у животных, иммунизированных Caf1_{NT1}, независимо от сорбированного на планшете варианта белка. Гуморальный ответ на иммунизацию изоформой Caf1_{NT3} был самым низким.

6. Показано существование перекрестного иммунитета при вакцинации тремя изоформами Caf1, при этом иммунизация изоформой Caf1_{NT1} обеспечивала лучшую защиту от всех трех вариантов штаммов *Y. pestis*.

7. Проведено полногеномное секвенирование 19 штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, представляющих шесть биоваров: *ulegeica*, *caucasica*, *xilingolensis*, *hissarica*, *talassica*, *altaica*. Полученные данные депонированы в DDBJ/EMBL/GenBank.

8. Установлено, что из десяти систем секреции IV типа чумного микроба полиморфизм аминокислотных последовательностей входящих в их состав белков свойственен пяти ашерам, трем молекулярным шаперонам и трем субъединицам пилевых адгезинов. У двух наиболее функционально значимых систем секреции капсульного и рН 6 антигенов последовательности белков ашеров и шаперонов консервативны.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При разработке тестов для индикации и идентификации чумного микроба и/или детекции Caf1 следует включать в панель штаммов для тестирования изоляты *Y. pestis*, продуцирующие эндемичные изоформы белка.

2. При изучении протективности субъединичных вакцинных препаратов, одним из компонентов которых является Caf1 или его эпитопы, в качестве

заражающих тест-штаммов для проверки напряженности иммунитета необходимо использовать штаммы *Y. pestis* со всеми тремя изоформами капсульного антигена.

3. При идентификации штаммов *Y. pestis*, в том числе при определении их биоваров, в качестве дополнительных диагностических критериев принадлежности к разным внутривидовым группам рекомендуем использовать выявленный полиморфизм Caf1 и других компонентов ШАСС.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

А. Статьи в реферируемых научных журналах

1. **Кадникова, Л. А.** Капсульный антиген чумного микроба / Л. А. Кадникова, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская, Анисимов А.П. // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5. – № 3. – С. 201–218. Импакт-фактор РИНЦ 2015 – 0,626.
2. Анисимов, Н.В. О происхождении гипервирулентности возбудителя чумы / Н.В. Анисимов, А.А. Кисличкина, М.Е. Платонов, В.В. Евсеева, **Л. А. Кадникова**, Н.А. Липатникова, А.Г. Богун, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2016. – Т. 1. – С. 26-32. Импакт-фактор РИНЦ 2015 – 0,173.
3. Kislichkina, A. A. Nineteen Whole-genome assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microti*, including representatives of bv. caucasica, talassica, hissarica, altaica, xilingolensis, and ulegeica / A.A. Kislichkina, A.G. Bogun, **L.A. Kadnikova**, N.V. Maiskaya, M.E. Platonov, N.V. Anisimov, E.V. Galkina, S. V. Dentovskaya, A. P. Anisimov // Genome Announc. – 2015. – V. 3 (6). – P. 1-2. WoS 2015 IF=1.18
4. Kopylov, P. Kh. *Yersinia pestis* Caf1 protein: Effect of sequence polymorphisms 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. – V.11 (9). WoS 2017 IF=2.766
5. Кисличкина, А. А. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновного подвидов и других представителей *Yersinia pseudotuberculosis* complex // А.А. Кисличкина, **Л.А. Кадникова**, М.Е. Платонов, Н.В. Майская, Л.В. Коломбет, А.Г. Богун, А.П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. Импакт-фактор РИНЦ 2015 – 0,596.
6. Кисличкина, А.А. В полёвочьих природных очагах чумы на Кавказе циркулируют три генетически различные линии штаммов *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *Caucasica* (0.PE2) / А.А. Кисличкина, В.И. Соломенцев, С.А. Благодатских, **Л.А. Кадникова**, М.Е. Платонов, В.М. Дубянский, А.Г. Богун, А.Н. Куличенко, А.П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2017. Импакт-фактор РИНЦ 2015 – 0,596.
7. Kislichkina, A. A. Eight whole-genome assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. caucasica isolated from the common vole (*Microtus arvalis*) plague focus in Dagestan, Russia / А.А. Кисличкина, А.Г. Богун, **L.A. Kadnikova**, N.V. Maiskaya, V. I. Solomentsev, S.V. Dentovskaya, M.E. Platonov, N.V. Anisimov, E.V. Galkina, S. V. Dentovskaya, A. P. Anisimov // Genome Announc. – 2017. – V. 5. – P. 1-2.

В. Тезисы всероссийских и международных научных конференций

1. Евсеева, В.В. Полиморфизм аминокислотных последовательностей факторов патогенности *Yersinia pestis* / В.В. Евсеева, М.Е. Платонов, Т.Э. Светоч, М.А. Сухова, Липатникова М.А., **Л.А. Кадникова**, Дентовская С.В., А.П. Анисимов // Материалы Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Сочи, 25-26 мая 2015 г.). – 2015. – С.186-190.

2. **Кадникова, Л.А.** Дифференциация штаммов основного и неосновного подвидов *Yersinia pestis* методом ПЦР / **Л.А. Кадникова**, А.А. Кисличкина, Н.В. Майская, Т.Н. Мухина, С.А. Благодатских, М.Е. Платонов, Н.В. Анисимов, А.Г. Богун // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-Петербург 08-10 декабря, 2015 г.). – 2015. – С.132-133.
3. **Кадникова, Л.А.** Дифференциация штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* основного и неосновного подвидов методом полимеразной цепной реакции / **Л.А. Кадникова**, А.А. Кисличкина, М.Е. Платонов, Н.В. Майская, А.Г. Богун, А.П. Анисимов // Материалы VIII Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 28–30 марта 2016 г.). – 2016. – С.121-122.
4. Кисличкина, А. А. Совершенствование внутривидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования / А.А. Кисличкина, **Л.А. Кадникова**, Н.В. Майская, М.Е. Платонов, С.А. Благодатских, Т.Н. Мухина, В.И. Соломенцев, А.Г. Богун, А. П. Анисимов // Материалы II Национального конгресса бактериологов «Состояние и тенденция развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях» (Санкт-Петербург, 20-22 сентября 2016 г.). Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С.260.
5. **Кадникова, Л.А.** Изучение иммуногенной активности изоформ CafI *Yersinia pestis* / Л.А. Кадникова, П.Х. Копылов, Т.И. Комбарова, В.И. Соломенцев, Т.Н. Мухина, С.А. Благодатских, Н.В. Майская, А.Г. Богун // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 18 - 20 апреля 2017г.). – 2017. – Т.1. – С. 309-310.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

а.о.	- аминокислотный остаток
ГКПМ-Оболенск	- Государственная коллекция патогенных микроорганизмов - Оболенск
ИИ	- индекс иммунитета (индекс резистентности)
ИФА	- иммуноферментный анализ
ИХ	- иммунохроматография
КОЕ (cfu)	- колониеобразующая единица (colony forming unit)
п.н. (bp)	- пар нуклеотидов (base pair)
п/к	- подкожно
ПААГ	- полиакриламидный гель
ДСН-ПААГ	-белковый электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
СА	- сульфат аммония
ФБУН ГНЦ ПМБ	- Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ШАСС	- шаперон/шерные системы секреции
bv.	- биовар
CafI(F1)	- капсульный антиген чумного микроба
LD ₅₀	- доза, летальная для 50 % животных (dosis letalis 50)
PDB	- Protein Data Bank (Банк данных о белках)
pFra (pYT)	- 60-65 MDa плаزمид, кодирующая синтез капсульного антигена фракция I и "мышинного" токсина

pCad (pCD, pYV, pVW, pLcr)	- 45-47 MDa плазида, определяющая температурную зависимость роста иерсиний от ионов кальция, синтез V антигена и белков внешней мембраны
SNP	- полиморфизм единичных нуклеотидов – (Single Nucleotide Polymorphism)
spp.	- виды
subsp.	- подвид ("subspecies")