

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

Шишкина
Лидия Александровна

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

Специальность:
03.02.03. – микробиология

диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители: д.м.н. С. В. Дентовская
:
к.б.н. А. Г. Богун

Оболенск-2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Основные сведения о <i>Yersinia pestis</i>	12
1.2 История открытия капсульного антигена чумного микроба, изучение его физико-химических свойств, условий выделения и очистки	14
1.3 Молекулярная структура Caf1	18
1.4 Генетические детерминанты Caf1 <i>Y. pestis</i>	19
1.5 Шаперон/ашерные системы секреции чумного микроба	21
1.6 Капсула как фактор патогенности <i>Y. pestis</i>	28
1.7 Иммуногенные свойства Caf1 <i>Y. pestis</i>	31
1.8 Заключение по Обзору литературы.....	35
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Штаммы микроорганизмов	37
2.2 Среды и условия культивирования	38
2.3 Лабораторные животные	38
2.4 Молекулярно-генетические методы.....	39
2.4.1 Выделение геномной ДНК	39
2.4.2 Секвенирование гена <i>caf1</i>	39
2.4.3 Полногеномное секвенирование штаммов <i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i>	41
2.5 Выделение и очистка Caf1 <i>Y. pestis</i>	42
2.6 Изучение иммунологических свойств изоформ капсульного антигена	43
2.6.1 Иммунизация мышей изоформами Caf1	43
2.6.2 Перекрёстная протективность изоформ Caf1	44
2.6.3 Перекрёстная серологическая активность изоформ Caf1	45
2.7 Биоинформационные методы	46
2.7.1 Анализ полиморфизма гена <i>caf1</i>	46
2.7.2 Анализ полногеномных последовательностей ДНК	47
2.7.3 Структурно-пространственные свойства изоформ капсульного антигена <i>Y. pestis</i>	48
2.8 Статистические методы	49
Глава 3 СРАВНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И СТРУКТУРНО-ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СВОЙСТВ ИЗОФОРМ Caf1, ВЫЯВЛЕНИЕ ОТЛИЧИЙ	50
3.1 Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей <i>caf</i> генов <i>Y. pestis</i> и аминокислотных последовательностей кодируем-	50

	ых ими белков	
	3.2 Внутренний фолдинг структуры различных вариантов Caf1 антигена <i>Y. pestis</i>	53
	3.2.1 Вторичная структура	53
	3.2.2 Компьютерное моделирование третичной структуры изоформ Caf1 антигена	56
	3.2.3 Внутренняя неупорядоченность изоформ Caf1 чумного микроба	60
	3.3 Выделение и очистка изоформ Caf1	63
	3.4 Заключение по Главе 3	65
Глава	4 ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ТРЁХ ИЗОФОРМ CAF1 <i>Y. pestis</i>	69
	4.1 Перекрёстная серологическая активность	70
	4.2 Перекрёстная протективность	72
	4.3 Заключение по Главе 4	77
Глава	5 ПОЛИМОРФИЗМ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ШАПЕРОН/АШЕРНЫХ СИСТЕМ СЕКРЕЦИИ <i>Y. pestis</i>	78
	5.1 Полногеномное секвенирование штаммов чумного микроба, отличающихся по продуцируемым изоформам капсульного антигена	80
	5.2 Вариабельность шаперон/ашерных систем секреции у штаммов <i>Y. pestis</i> различных SNP-типов	86
	5.3 Заключение по Главе 5	107
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
	ВЫВОДЫ	118
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	120
	ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ	121
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	124
	СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	147
	ПРИЛОЖЕНИЕ А	150
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б	158
	ПРИЛОЖЕНИЕ В	161

ВВЕДЕНИЕ

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 [51, 128]. *Yersinia pestis* – этиологический агент чумы - дивергировал от энтеропатогенной бактерии *Y. pseudotuberculosis* около 1500-20000 лет назад [31, 32]. Последующая изменчивость привела к формированию множества внутривидовых групп *Y. pestis*, отличающихся по спектру чувствительных к ним млекопитающих [36, 61, 63, 185]. У людей вспышки, эпидемии и пандемии чумы вызывают штаммы *Y. pestis* подвида *pestis*, обладающие универсальной гипервирулентностью для широкого круга млекопитающих [17, 62, 120]. Представители другого подвида - *microti* - являются эндемичными для популяций некоторых видов полевок (*Microti* spp.) и редко вызывают спорадические случаи заболевания [36, 62], которые не передаются от человека к человеку [36].

Штаммы обоих подвигов могут образовывать белковую капсулу, впервые описанную А. Yersin [172] и кодируемую генами *cafI* оперона [101, 102], расположенного на плазмиде pFra (pMT1) [20]. Капсула придает микробной клетке устойчивость к фагоцитозу, а формирующий ее белок CafI (F1) является одним из основных протективных антигенов *Y. pestis* [50, 56, 59, 73, 116, 143, 158]. В связи с этим капсульный антиген является обязательным компонентом большинства чумных вакцин [67, 84, 93, 184] и основной мишенью для лабораторной диагностики чумы [144]. Известно, что биогенез капсульного антигена осуществляется по консервативному шаперон/ашерному пути (система секреции IV типа) [146]. Кроме *cafI* оперона геном *Y. pestis* содержит еще девять генетических кластеров, продукты которых образуют шаперон/ашерные системы секреции (ШАСС) [65; 126]. Высококонсервативные системы секреции IV типа, присутствующие у грамотрицательных бактерий,

осуществляют сборку ассоциированных с вирулентностью поверхностных волокон - пилей или фимбрий, вовлеченных в клеточную адгезию [155; 165; 174]. 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 [1; 136]. 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 [75; 90].

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 [38; 69; 131; 150]. Недавно в капсульном антигене из штаммов *Y. pestis subsp. microti* bv. *caucasica* Pestoides F [86] и G8786 [87] выявили единичную аминокислотную замену A48→S48 (аланина на серин). 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 *caf1* из 41 штамма подвида *microti*, выделенных в Грузии и Армении от полевых и их блох 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 *caf1*, 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 *caf1*, номер доступа в GenBank - EF165976) [139].

Однако до начала наших исследований никто не проводил оценку полиморфизма структурного гена *caf1* 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 Caf1, не осуществлял поиск *in silico* возможного полиморфизма остальных генов *caf1* 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 Caf1 в иммуногенезе чумы. Это создаст основу для конструирования экспериментальных вакцин нового поколения, обеспечивающих эффективную защиту от гибели при заражении штаммами, экспрессирующим 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 *caf1* оперона и изоформ Caf1 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 Caf1 *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 перекрестный иммунитет и определена степень перекрестной иммунохимической активности.

Впервые получены полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов bv. *caucasica* из Дагестанского высокогорного природного очага чумы, а также изолятов bvv. *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, продуцирующие все три изоформы капсульного антигена. Установлено отсутствие различий по выявлению трех изоформ Caf1 с помощью иммунохроматографиче-

ского 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 CafI_{NT1} , достаточен для надежной защиты мышей при заражении штаммами *Y. pestis*, продуцирующих изоформы CafI_{NT2} и CafI_{NT3} в дозах, соответствующих таковым при укусе блохи.

Выявлено различие в поведении CafI_{NT3} изоформы во время гидрофобной хроматографии: элюирование CafI_{NT3} распределялось между 600 мМ и 50 мМ градиента сульфата аммония, в то время как CafI_{NT1} и CafI_{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 CafI_{NT2} и CafI_{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 - LIYO00000000, 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 мини-антител в группе иммунохимии филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Пущино).

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 использовали микробиологические, генетические, молекулярно-биологические, иммунологические и биоинформационные методы, а также методы статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Белок Caf1 существует в трёх изоформах: глобальный тип NT1 (A48 F117; Caf1_{NT1}); NT2 тип (S48 F117; Caf1_{NT2}), характерный для Закавказского высокогорного и Приараксинского низкогорного природных очагов чумы (№ 04-07); и впервые обнаруженный NT3 тип (A48 V117; Caf1_{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 полевоочьих штаммов *Yersinia pestis*» (научный руководитель – д.м.н., проф. А.П. Анисимов), а также в рамках НИР «Совершенствование нормативно-методической базы процедуры депонирования штаммов патогенных микроорганизмов, клеточных культур и результатов их исследований в государственных коллекциях Роспотребнадзора по государственному контракту № 12-д» от 25.09.2015 г. (руководитель – к.б.н. А.Г. Богун).

Достоверность полученных результатов обусловлена использованием современных методов, позволяющих документально регистрировать изучаемые объекты и явления, достаточным объемом фактического материала и наличием соответствующих контролей, а также проведением 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.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Основные сведения о *Y. pestis*

Возбудитель чумы - *Y. pestis* - является одним из самых опасных микроорганизмов, способных вызывать заболевание человека. Во многих регионах мира чума продолжает представлять существенную угрозу общественному здравоохранению как причина возникновения и возобновления эпидемий, развивающихся на фоне эпизоотий в популяциях грызунов [75, 83, 164]. Подтвержденная причастность чумного микроба к трем основным пандемиям чумы в истории человечества сделали его предметом интенсивного изучения. Первая пандемия, также известная как Юстинианова чума, проходила с VI по VIII век н.э.; вторая пандемия – «Черная смерть» - охватывала XIV-XVIII века, а третья пандемия началась в середине XIX и продолжалась до середины XX века [46, 48].

Возбудитель чумы был впервые выделен и описан А. Yersin в 1894 г. в Гонконге во время начала третьей пандемии чумы [172]. *Y. pestis* - неподвижная, не образующая спор грамотрицательная палочка длиной 1,5 мкм и шириной 0,75 мкм. Патоген может в течение нескольких дней оставаться жизнеспособным в воде или влажной почве и проявлять устойчивость к высушиванию, если он защищен капсулой, однако при прямом воздействии солнечного света погибает через несколько часов [18].

Чума по праву считается классическим примером зоонозных болезней, иными словами, болезней, постоянно циркулирующих среди животных, и в силу случайных обстоятельств передающихся человеку. Чумной микроб существует в популяциях диких грызунов в природных очагах инфекции, расположенных на всех континентах, за исключением Австралии и Антарктиды. Распространение инфекции среди грызунов и других животных осуществляется посредством блох, в результате употребления зараженных тканей, а также, возможно, через инфицированную почву или воздушно-капельным

путем. В эндемичных сельских районах случаи заболевания чумой возникают среди тех, кто соприкасается с зараженными *Y. pestis* дикими грызунами или паразитирующими на них блохами. Вспышки инфекции, охватывающие большое количество людей, могут возникать в городах, когда чумой поражается популяция городских грызунов, прежде всего крыс *Rattus rattus* и *R. norvegicus*. Наиболее распространенной клинической формой заболевания является бубонная чума, которая передается преимущественно через укусы инфицированных блох или путем проникновения патогена через повреждения кожи при расчесывании. Наиболее опасна легочная чума, первичная или вторичная, которая может передаваться непосредственно от человека к человеку воздушно-капельным путем. Инкубационный период длится при бубонной чуме 4-6 дней и немного короче при легочной форме инфекции [49].

Прародителем *Y. pestis* принято считать энтеропатогенную бактерию – *Yersinia pseudotuberculosis*. Дивергенция этих микроорганизмов произошла 1500-20000 лет назад [31, 32]. Образование нового вида и последующая внутривидовая изменчивость привели к формированию широкого спектра внутривидовых групп *Y. pestis* (биоваров, подвидов, экотипов, протеиноваров, плазмидоваров, генотипов и т. д.), отличающихся по спектру чувствительных к ним млекопитающих и вирулентности [36, 61, 63, 184].

Анисимов А.П. с соавт. [17] предложили классификацию чумного микроба, в которой вид *Y. pestis* делится на два подвида: основной - *pestis*, к которому относятся 4 биовара: *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *intermedium*, и неосновной - *microti* с биоварами *altaica*, *angola*, *caucasica*, *hissarica*, *qinghaiensis*, *talassica*, *ulegeica* и *xilingolensis* и геногруппой O.PE7 (рисунок 1.1). Данная классификация чумного микроба будет использована в диссертационной работе.

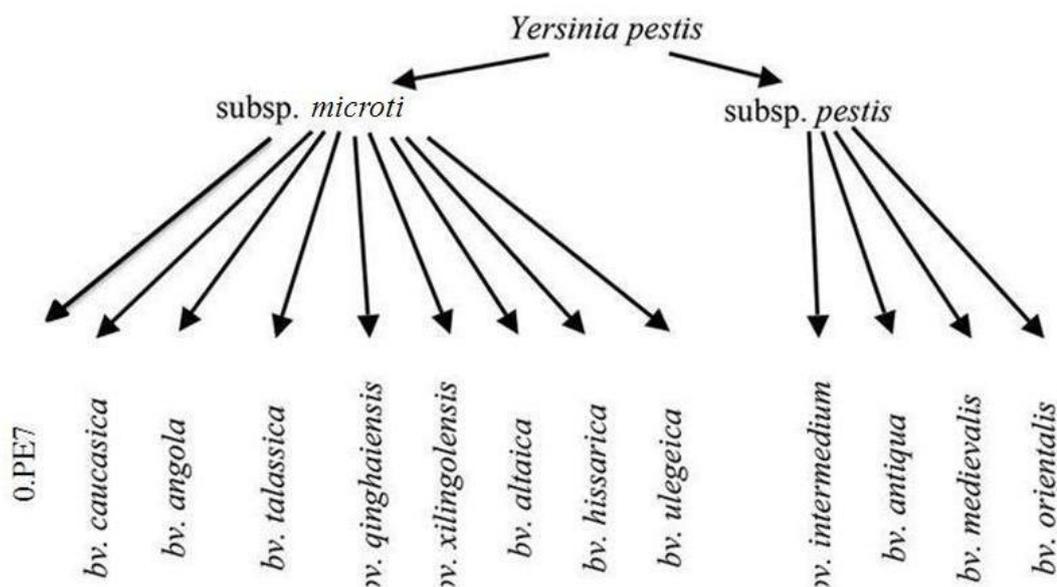


Рисунок 1.1 - Внутривидовая таксономия *Y. pestis*, используемая в данной работе

1.2 История открытия капсульного антигена чумного микроба, изучение его физико-химических свойств, условий выделения и очистки

Наличие защитной капсулы у возбудителя чумы установил еще А. Yersin [172]. S. Rowland [142] и Н. Schütze [148] впервые в своих работах указали на влияние температуры выращивания чумного микроба на феномен капсулообразования. Авторы отмечали, что при культивировании при температуре 20 °С клетки *Y. pestis* не окружены капсулой, в отличие от клеток, выращиваемых при 37 °С, где наблюдалось образование желатиноподобного вещества, окружающего бактерию и постепенно распространяющегося в среде культивирования. Капсула, по описанию А.И. Желтенкова [10], состоит из «гомогенного вещества слизистой консистенции, плохо окрашивающегося анилиновыми красками». В некоторых случаях толщина оболочечной субстанции (капсулы) может в несколько раз превосходить толщину самой бактериальной клетки. Довольно часто оболочечная субстанция окружает не

каждую клетку в отдельности, а целые группы клеток чумного микроба. Подобное описывал и S. Rowland [142]: «Типичная капсула, которой обладают *Pneumococcus*, легко видна в неокрашенном образце из-за своего резкого внешнего края... Слой же вокруг чумных бацилл почти не виден в неокрашенном образце, ..., он не имеет четко определенного внешнего края».

На феномен капсулообразования влияет компонентный состав питательной среды, а именно присутствие витамина В1, триптофана, аргинина, тирозина, α -аминомасляной кислоты, орнитина, глицина, пантотената кальция, гистидина, глюконата кальция. Если в культуральной среде не хватает одного из данных компонентов, то синтез капсульного антигена резко снижается (от 40 % до 83,6 %) [27]. Продукция капсульного антигена отмечается в достаточно широком диапазоне рН от 6,3 до 7,3 [130].

Изучение физико-химических и иммунохимических свойств капсульного антигена проводили на основе препаратов фракции I (Ф1, F1 или Саf1), выделенных по классическому методу E.E. Baker *et al.* [40] из водно-солевого экстракта ацетонвысушенных клеток вирулентных штаммов. Для этого чумной микроб выращивали в течение трёх суток при температуре 37 °С на плотной питательной среде, смывали 0,85 %-ным раствором хлорида натрия, содержащим 0,001 М фосфатного буфера (рН 7,1) и двукратно обезвоживали охлажденным ацетоном. Из ацетонвысушенных клеток Саf1 экстрагировали 2,5 %-ным раствором хлорида натрия при комнатной температуре в течение суток. Капсульный антиген из солевого раствора выделяли путем переосаждения насыщенным раствором сульфата аммония (рН 7,5). Препарат, выпадавший в осадок при насыщении 0,25-0,3, был обозначен как F1A, а при 0,3-0,33 - F1B. Фракция IA помимо белка содержала полисахаридный компонент, в то время как фракция IB представляла собой чистый белок. Обе фракции обладали идентичной серологической активностью. В дальнейшем для более полного извлечения антигена из водно-солевого раствора «классический» метод был дополнен трихлоруксусной кислотой [4]. Авторы получили дополнительные фракции IC и ID, серологически аналогичные предыдущим,

представляющие собой белковонуклеополисахаридные комплексы, состоящие из белка (60-69 %), полисахарида (28-31 %) и нуклеиновых кислот (1-2 %). Основным недостатком метода, предложенного Е.Е. Baker *et al.* [40], являлось то, что Caf1 выделяли из экстракта разрушенных ацетоном бактериальных клеток, содержащего также компоненты клеточной стенки и протоплазмы, а не из собственно вещества капсулы *Y. pestis*.

Так как капсульный антиген непрочно связан с микробной клеткой и легко переходит в среду культивирования [35], в дальнейшем его чаще всего выделяли из культуральной жидкости путем фракционирования ее сульфатом аммония [5, 136] или осаждением в изоэлектрической точке [25]. При этом по своей иммунохимической активности получаемые препараты превосходили Caf1, полученный по оригинальной методике Е.Е. Baker *et al.* [40]. Позднее Л.Н. Сердобинцев [23] предложил метод выделения F1 из культуральной жидкости с помощью колоночной хроматографии с использованием молекулярных сит. Препараты F1, выделенные из жидкой среды выращивания, были лишены полисахаридных примесей и представляли собой монокомпонентную белковую систему [5, 23, 137].

Комплексное исследование феномена капсулообразования с помощью иммунологических и электронно-микроскопических методов показало, что гелеподобная капсула *Y. pestis* образована F1 антигеном, постепенно переходящим в окружающую среду в процессе культивирования [11, 55]. После клонирования, определения первичной нуклеотидной последовательности *cafI* (или *caf*) оперона [101], кодирующего капсулообразование у *Y. pestis*, и конструирования бескапсульных вариантов возбудителя чумы за счет делеции части структурного гена *cafI* [13], тот факт, что структурный компонент капсулы *Y. pestis* состоит из белка, получил практически всеобщее признание.

Фракции IA и IB, полученные по методу Е.Е. Baker *et al.* [40], а также фракции IC и ID, выделенные по способу В.И. Вейнבלата с соавт. [5] представляли собой серии молекулярных агрегатов с молекулярными массами от

300 кДа до 1,5 мДа. Выделение капсульного антигена более щадящими методами из культуральной жидкости, исключая этапы обработки ацетоном и высушивания, позволяет получать агрегат субъединиц с молекулярной массой до 2,0 мДа [35].

Величина изоэлектрической точки (pI) для препаратов фрагментированного капсульного антигена, выделенного в достаточно жестких условиях, составляла 4,5 для фракции IA, 4,7 - для IB [40], или 4,6 и 4,8, соответственно [43]. Значения pI для препаратов, выделенных из культуральной жидкости с помощью гелевой фильтрации или изоэлектрической преципитации, составляло $3,95 \pm 0,05$ [25] или $4,1 \pm 0,05$ [5]. Изоэлектрическая точка для препаратов, полученных из культуральной жидкости высаливанием сульфатом аммония с последующей очисткой от эндотоксина с помощью хроматографии на иммобилизованном полимиксине В, находилась в диапазоне 4,3-4,5 [35]. Эти отличия могут свидетельствовать об изменении, и, может быть, определенной степени нарушения структуры и конформации макромолекул антигена, выделенного из ацетонвысушенных клеток, и влиянии на величину pI примесей липополисахарида. Изоэлектрическая точка F1, рассчитанная на основе данных о первичной нуклеотидной последовательности его субъединицы составляет 4,3 [87].

1.3 Молекулярная структура Caf1

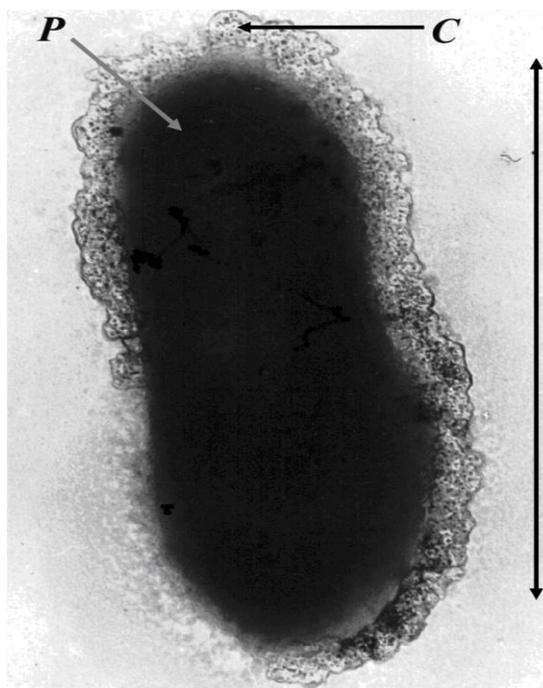
Т.Н. Chen и S.S. Elberg [55] с помощью сканирующей электронной микроскопии впервые показали, что капсула возбудителя чумы представляет собой грануляционный слой, который окружает поверхность клетки, а позже диффундирует в среду культивирования. Причём чёткость капсулы при снимке зависела от температуры культивирования микроорганизма. Капсула имеет водорастворимый характер, её легко смыть дистиллированной водой [60].

При негативном контрастировании капсула отстоит на 0,125 нм от клеточной стенки и имеет четкие контуры [16]. Использование иммуноферритинового метода вместе с электронной микроскопией позволило А.Г. Золотареву и соавт. [11] подтвердить, что зона капсульного вещества истончается при отмывании, образуя участки, лишённые капсулы.

На электронных микрофотографиях капсула чумного микроба представлена обрывками фибриллярных тяжей с диаметром отдельных фибрилл около 3 нм или внеклеточного фибриллярного матрикса [1, 14, 55, 143] (рисунок 1.2). При световой микроскопии капсула возбудителя чумы выглядит как хаотичное аморфное образование, окружающее клетку, и только при большем увеличении можно разглядеть ячеистую структуру и "фимбриеподобные тяжи" длиной до 200 нм, образующие капсулу [1, 143].

В отношении молекулярной организации капсульного антигена, большинство исследователей поддерживают точку зрения о том, что F1 состоит из большого числа субъединиц.

Пространственная структура капсульного антигена, а именно вторичная, третичная и четвертичная структуры белка образуются без участия дисульфидных связей, так как в его составе нет цистеина [85].



Размер масштабной линейки – 1 мкм. Бактерии выращивали в течение 48 ч при температуре 37 °С. *P* - протоплазма (protoplasm). *C* - капсула (capsule)

Рисунок 1.2 – Электронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* М-493. Негативное контрастирование [1]

1.4 Генетические детерминанты *Caf1 Y. pestis*

Гены, продукты которых ответственны за синтез и продукцию F1 *Y. pestis*, локализованы на плазмиде pFra с молекулярной массой около 60 мДа [20]. Причем молекулярная масса плазмиды вариабельна у разных изолятов, составляя 80 мДа у полевоцъих штаммов, а у некоторых штаммов *Y. pestis* подвида *pestis* достигая 190 мДа [28, 128]. Показано, что плаزمида pFra может обратимо встраиваться в любые участки хромосомы *Y. pestis* [21, 135].

Впервые *caf1* оперон *Y. pestis*, кодирующий выработку капсульного антигена, был клонирован А.В. Карлышевым с соавт. в 1984 г. Структурный ген *caf1* [85, 101] имеет размер 510 п.н. и кодирует белок Caf1 с молекулярной массой 17,6 кДа, состоящей из 170 аминокислот. При удалении сигналь-

ного пептида из Caf1 образуется 15,5 кДа зрелый белок [85]. Вторым ген *caf1M* отвечает за синтез белка Caf1M размером 26,3 кДа, который состоит из двух иммуноглобулино-подобных доменов и имеет гомологию с периплазматическим шапероном PapD *E. coli*. [1; 101]. Третий ген *caf1A* кодирует ашерный белок Caf1A размером 90,4 кДа, обеспечивающим закрепление капсульного антигена на поверхности бактериальной клетки. Изолированный Caf1A представляет собой высокорастворимый мономерный белок, способный к автономной укладке [173]. Белки Caf1M и Caf1A также обладают сигнальными последовательностями. Четвертый ген *caf1* оперона кодирует белок Caf1R, который отвечает за температурозависимую регуляцию экспрессии трех остальных генов оперона [1, 101].

Проведенный нами анализ с помощью программы BLAST на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) структурного гена *caf1* свидетельствует, что большинство доступных последовательностей полностью идентичны. В штаммах кавказского подвида *Pestoides F* [86] и G8786 [87] в результате единичной замены нуклеотида произошла замена аланина на серин (A48 → S48), а в штаммах *Y. pestis E1979001 (bv. antiqua)* и F1991016 (*bv. orientalis*) мутации привели к возможности синтеза только укороченных до 147 и 130 аминокислотных остатков (а.о.) и, вероятно, функционально неполноценных вариантов белка Caf1. Секвенирование гена *caf1* из 41 штамма, выделенных на территории Грузии и Армении от полевок и их эктопаразитов, показало, что для них всех характерна замена A48 → S48, а штаммы, выделенные в этом же регионе от песчанок или сусликов, обладали канонической последовательностью гена *caf1* [139].

На основе анализа первичной нуклеотидной последовательности *caf1* оперона было установлено его филогенетическое родство с кластерами генов, кодирующих пилевые и непилевые адгезины энтеробактерий. Образование пилей на поверхности клетки происходит из субъединиц синтезированных внутриклеточно. Структурные компоненты бактериальных фимбрий синтезируются в виде предшественников с N-концевой сигнальной последователь-

ностью, которая отщепляется в процессе переноса через внутреннюю мембрану. Этот перенос обеспечивается "нормальной" экспортной системой, описанной впервые у *E. coli* [70].

1.5 Шаперон/ашерные системы секреции чумного микроба

Большинство грамотрицательных бактерий экспрессируют поверхностные структуры, обладающие адгезивными свойствами и являющиеся факторами патогенности. Обычно данные структуры участвуют в формировании клеточной адгезии [98], образовании биоплёнок [159] и ингибировании фагоцитоза [73]. Для контролируемой сборки таких органелл используется периплазматические шаперон/ашерные системы секреции [91, 111, 155]. Суперсемейство данных органелл состоит из двух главных структурно и функционально различающихся семейств. Одно из них объединяет ригидные и подвижные пилы адгезии (также известные как фимбрии адгезии) с комплексным субъединичным составом (пилин или фимбрин), имеющие только один специализированный адгезивный домен (адгезин) [106, 145, 146, 152, 155]. Сборка пилей адгезии осуществляет так называемый FGS (FG short) класс периплазматических шаперонов, имеющий короткую F1–G1 петлю и ответственных за сборку до шести разных субъединиц [96]. Другое семейство включает органеллы, которые состоят только из одного или двух различных типов субъединиц и при малом разрешении обычно имеют непилевую аморфную или капсулоподобную морфологию [96, 138, 152, 178, 180]. Главным их свойством является то, что все субъединицы обладают одним [34, 108, 129] или двумя [109] независимыми связывающими сайтами, специфичными для различных рецепторов клеток хозяина. Сборка данного семейства органелл проходит с помощью FGL (FG long) класса периплазматических шаперонов, обладающих длинной F1–G1 петлей и ответственных за сборку только одной или двух субъединиц [96, 138, 178, 181]. Морфология и синтез пилей адгезии достаточно изучены и явились предметом нескольких велико-

лепных обзорных работ [106, 145, 146, 152, 155]. Капсульный антиген возбудителя чумы *Y. pestis*, состоящий из линейных фибрилл одной субъединицы Caf1, служит прототипом непилевых органелл, собранных с помощью FGL шаперон/ашерного пути [53, 118, 181].

Расположенные в периплазме шапероны и молекулярные ашеры функционируют совместно как шаперон/ашерный аппарат, осуществляющий сборку поверхностно расположенных фимбриальных адгезинов. Главными функциями шаперонов являются [96, 106, 138, 145, 146, 155, 177, 178, 179, 180]:

(1) стабильное связывание субъединиц органеллы при их появлении в периплазме;

(2) защита субъединиц от непродуктивной агрегации и протеолитической деградации путем экранирования поверхностей сборки;

(3) транспорт субъединиц к расположенному во внешней мембране молекулярному ашеру.

Шапероны связываются с субъединицами, возникающими в периплазме, или формируют димеры [96] или тетрамеры [177], в которых субъединицы защищены от протеолиза и неспецифического связывания.

Главными функциями молекулярных ашеров являются [124, 138]:

(1) освобождение субъединиц из шаперона;

(2) формирование сборочной платформы для полимеризации субъединиц в линейное волокно;

(3) секреция волокон через олигомерные ашерные поры на клеточную поверхность.

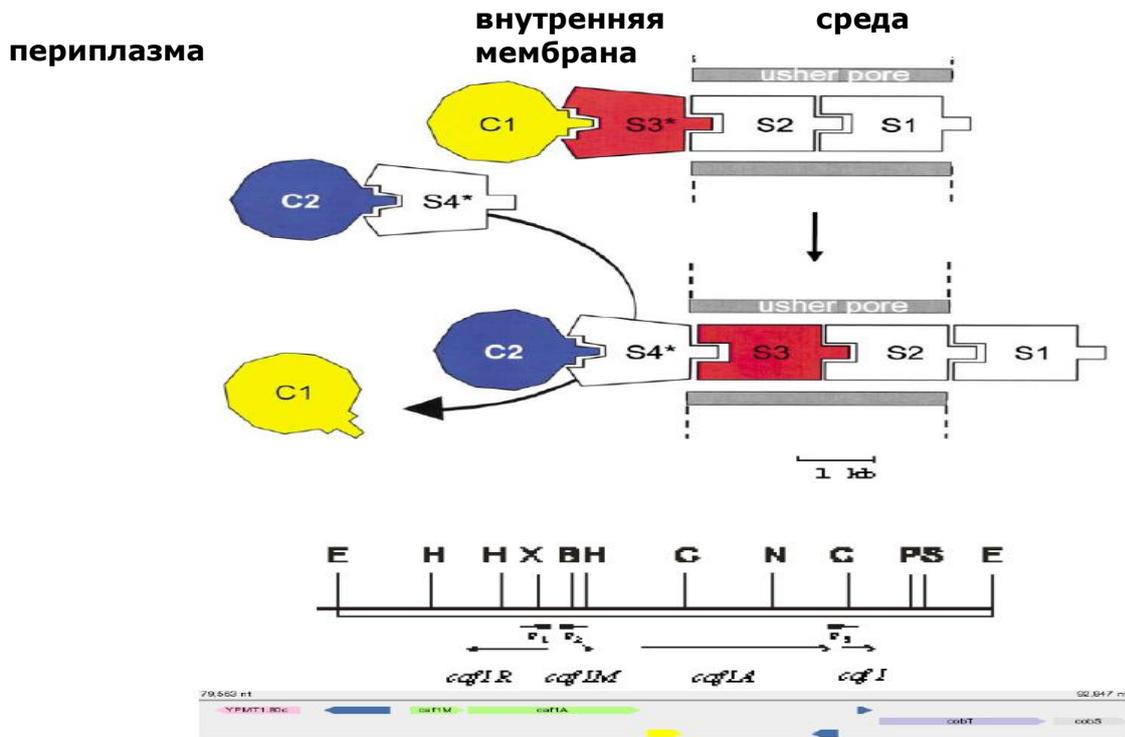
Гены для синтеза белков, вовлеченных в экспрессию и сборку фимбриальных полиадгезинов, обычно организованы в компактные кластеры, расположенные в хромосоме или на плаزمиде грамотрицательных бактерий.

Структурные компоненты фимбрий продуцируются в виде предшественников, имеющих N-концевую сигнальную последовательность. Эта последовательность позже при прохождении через внутреннюю мембрану уда-

ляется. Дальнейший перенос субъединицы на поверхность клетки, то есть из периплазмы через наружную мембрану, зависит от системы переноса и сборки, состоящей из расположенного в переплазме шаперона с размером около 25 кДа и так называемого белка ашера с размером около 90 кДа, расположенного во внешней мембране. Эти белки не являются частью органеллы [105].

Гены, кодирующие субъединицу капсулы чумного микроба, а также гены, участвующие в переносе белка через наружную мембрану, были секвенированы. Известно, что кластер генов *caf1* оперона организован аналогично кластерам генов, участвующих во внеклеточной секреции, и сборке некоторых субъединиц фимбрий *E. coli* и других грамотрицательных бактерий [101]. Структурная субъединица F1 также синтезируется в виде предшественника с сигнальной последовательностью в 21 аминокислотный остаток (а.о.), а С-концевые участки субъединицы Caf1 и фимбрий других микроорганизмов высококонсервативны. Ген *cafIM*, ответственный за синтез шаперона, гомологичен шаперону семейства PapD, а ген *cafIA*, ответственный за синтез ашера, имеет гомологию с ашерами семейств FaeD, MrkD, F1mD, PapC, так же, как и ген *cafIR*, отвечающий за температурозависимую регуляцию трансляции, гомологичен протеинам XylS/AraC [101].

Иммуноглобулиноподобные шапероны, находящиеся в переплазматическом пространстве, взаимодействуют с рецепторами субъединиц по принципу антиген-антитело [95] (рисунок 1.3).



Шаперон Caf1M препятствует фолдингу субъединицы Caf1 в периплазме, сохраняя состояние молекулы с высоким запасом энергии. В трансмембранном канале, образованном ашером Caf1A, Caf1M: Caf1 комплекс (Caf1M₂: Caf1₄*) замещает шаперон (Caf1M₁) на проксимальной субъединице фимбрии (Caf1₃*), позволяя последней сложиться в окончательную конформацию (Caf1₃). Полагают, что освобождающаяся при этом энергия обеспечивает процесс сборки фимбрий.

"*" – указывает на высокий запас энергии у субъединиц, связанных с шаперонами

Рисунок 1.3 – Модель сборки фимбрий из субъединиц Caf1 [41]

Фимбрии типа 1 и F1C *E. coli* опосредуют рецептор-специфическое связывание с различными поверхностям клеток хозяина. Такие фимбрии обнаруживаются у штаммов, вызывающих инфекции мочевыделительной системы. Биосинтез фибриллярных органелл типа 1 и F1C требует индивидуальной, специализированной двухкомпонентной системы. Организация кластеров генов *fim* и *foc*, кодирующих переплазматический шаперон и белок ашер, расположенный во внешней мембране, а также структура органелл очень схожа, однако удаление любого из компонентов системы приводит к прерыванию образования сборки фимбрий [105]. Если ген *clpE*, кодирующий пере-

плазматический шаперон капсулоподобного антигена *E. coli* CS31A, перестанет функционировать, то формирование структурных субъединиц значительно снизится [140].

L.M. Runco *et al.* [144] делетировали ген, кодирующий ашер Caf1A в штамме *Y. pestis* KIM6 и доказали его значимость в сборке и секреции субъединицы Caf1 чумного микроба. A.V. Karlyshev *et al.* [102] показали, что рекомбинантному штамму *E. coli*, несущему *caf1* оперон, для секреции F1 не требуется ашер Caf1A, а только шаперон Caf1M. В дополнительных исследованиях было отмечено, что, если уровень Caf1 в периплазме *Y. pestis* уменьшается в отсутствие ашера, то у *E. coli* уровень периплазматического Caf1 увеличился [143]. Вероятно, в клетках *E. coli* присутствовал частично гомологичный ашер, образующий трансмембранный канал, пригодный для секреции Caf1 из периплазмы, но лишенный структуры, необходимой для "заякоривания" структурных субъединиц F1 на клеточной поверхности.

После окончания проектов по полногеномному секвенированию двух штаммов *Y. pestis*, bv *mediaevalis* KIM10+ [65] и bv *orientalis* CO92 [126], было идентифицировано десять ШАСС (рисунок 1.4). К настоящему времени, две из них всесторонне охарактеризованы у *Y. pestis*: Caf1 (F1) капсульный антиген и рН 6 антиген (Psa). The Caf1 обладает антифагоцитарной активностью и является одним из главных иммунодоминантных антигенов [33, 64, 180]. Однако наличие капсулы необязательно для вирулентности штаммов *Y. pestis* [72; 136]. Таким образом, не рекомендуется полностью полагаться только на анти-Caf1 антитела для защиты против чумной инфекции.

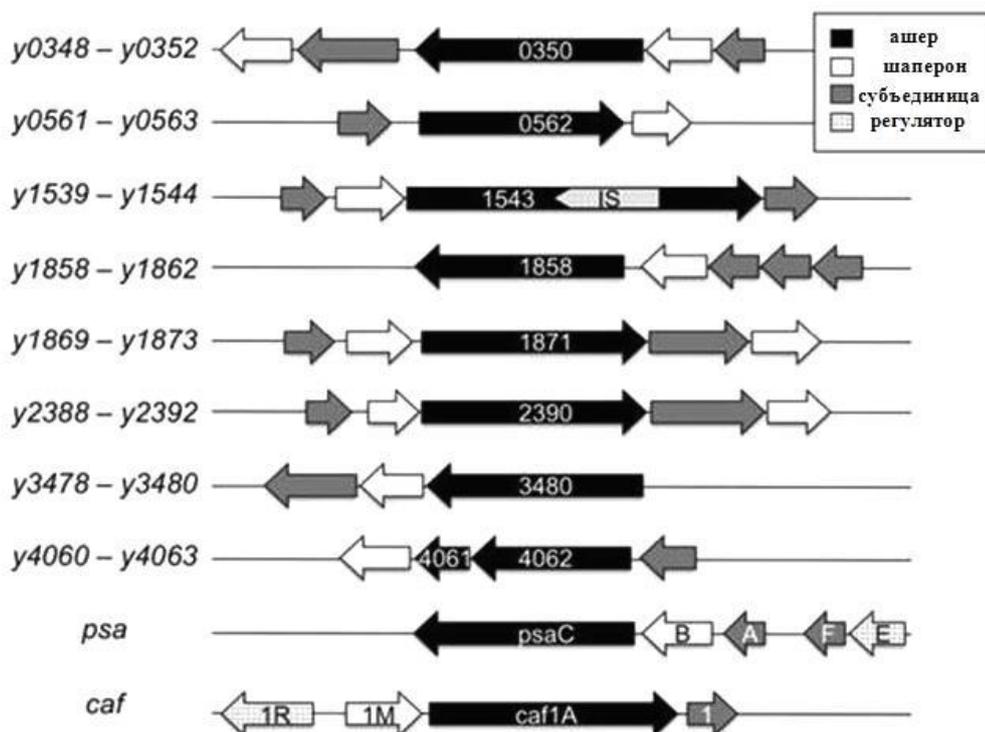


Рисунок 1.4 – Кластеры генов, относящиеся к шаперон/ашерным системам секреции *Y. pestis* [90]

Другая хорошо охарактеризованная ШАСС у *Y. pestis* вовлечена в синтез и секрецию Psa на бактериальную поверхность [42]. Psa обладает множеством активностей, включающих геммаглютинацию эритроцитов нескольких видов животных [45; 115], адгезию к культуральным клеткам [171] и макрофагам [120], связывание с Fc регионом человеческого IgG [176]. Установлено, что Psa проявляет антифагоцитарную активность, подобно Caf1 [94]. Удаление локуса *psaABCDEF* ведет к аттенуации *Y. pestis* при внутривенном пути введения [76, 115], демонстрируя роль данного адгезина в патогенности чумного микроба.

Гены, кодирующие гены ашеров в двух ШАСС *Y. pestis* (*y1539-1544* и *y4060-4063*), прерваны инсерционным элементом и стоп кодоном, которые делают их нефункциональными. Гены оперонов *caf* и *psa* принадлежат к FGL семейству ШАСС, которые собирают тонкие, подвижные волокна [151].

Остальные ШАСС *Y. pestis* относятся к FGS семейству, которые собирают ригидные, палочковидные пили адгезии. В соответствии с этим было показано, что чумной микроб экспрессирует пилевые волокна, отличные от F1 и рН6 антигенов [139]. Недавно S. Felek *et al.* [75] продемонстрировали гетерологичную экспрессию шести добавочных ШАСС *Y. pestis* в клетках *E. coli*. Поддерживая гипотезу о роли добавочных ШАСС в адгезии чумного микроба, экспрессия локуса *y0561-0563* в *E. coli* приводила к связыванию с эпителиальными клетками человека HEp-2 и человеческими макрофагоподобными клетками THP-1, а экспрессия ШАСС *y0348-0352*, *y0561-0563*, *y1858-1862* и *y3478-3480* усиливала формирование биофильма [75]. Способность к образованию биопленок является важным фактором патогенности бактерий. Это необходимо для колонизации хозяина и защите микроорганизма от его иммунной системы. Известно, что *Y. pestis* образует биопленки при выращивании при температуре окружающей среды, но не при 37°C, соответствующей температуре млекопитающих [103]. Однако при конструировании делеционных мутантов на модели штамма *Y. pestis* KIM5 только потеря локуса *psa*, кодирующего рН6 антиген, приводила к снижению адгезии к клеткам хозяина и уменьшению образования биофильма [75]. S. Felek *et al.* [75] обнаружили, что штамм *Y. pestis* KIM5, содержащий делецию *y1858-1862* был аттенуирован при внутривенном ведении для мышей по сравнению с родительским штаммом «дикого» типа. Таким образом, авторы показали, что добавочные ШАСС *Y. pestis* способны к сборке пилей адгезии и предположили, что собранные структуры могут быть необходимы для патогенности чумного микроба.

Позднее роль добавочных ШАСС в патогенезе чумы и взаимодействии в системе патоген-хозяин попытались охарактеризовать M. Natkoff *et al.* [90]. Анализ мутантов с единичной делецией гена, кодирующего ашер, полученных на модели вирулентного штамма *Y. pestis* KIM5+, продемонстрировал, что три ШАСС и *y1869-1873* необходимы для вирулентности штаммов при интраназальном, но не при подкожном заражении мышей. Две ШАСС *y0348-*

0352 и *y1858-1862* были необходимы для связывания штамма KIM6+, лишенного плазмиды pCad, с эпителиальными клетками легких A549, клетками цервикального эпителия HEp-2 и макрофагами мыши и человека, а продукты локуса *y1869-1873* - только для макрофагов мыши и человека. Полученные авторами результаты демонстрируют, что локусы *y0348-0352* и *y1858-1862* собирают пили адгезии, связывающиеся с рецепторами общими для эпителиальных клеток и макрофагов, в то время как пили формируемые с участием локуса *y1869-1873* связываются с рецепторами, экспрессируемыми только на макрофагах. Три ШАСС вносят определенный вклад в развитие инфекционного процесса при легочной чуме, в котором пили локуса *y1869-1873* могут играть наиболее важную роль. Адгезия, опосредуемая пилевыми органеллами, может быть направлена на колонизацию специфических сайтов внутри легочной ткани и содействовать доставке белков Yop внутрь клеток хозяина с помощью системы секреции III типа иерсиний. Адгезия к мобильным клеткам хозяина, таким как макрофаги, может способствовать диссеминации *Y. pestis* из легких к вторичным сайтам инфекции с развитием системного заболевания.

1.6 Капсула как фактор патогенности *Y. pestis*

В результате своей жизнедеятельности в ходе инфекционного процесса патогенные бактерии вызывают патофизиологические и патологоанатомические изменения в организме хозяина [2]. Факторы патогенности возбудителя чумы являются основным предметом исследований ученых на протяжении многих лет [52]. У *Y. pestis* существует целый набор факторов патогенности, которые по-разному функционируют и регулируются [2]. Капсула чумного микроба, окружающая в виде желатиновой оболочки бактериальную клетку, защищает её от захвата интактными нейтрофилами хозяина [52], подтверждая главную роль капсул бактерий в противостоянии фагоцитозу [162]. Экранируя пептидогликан или ЛПС бактериальной клетки, капсула препят-

ствуется инициации альтернативного пути активации комплемента [112], но в то же время F1, истощает систему комплемента за счет избирательной активации компонентов C² и C⁴ и, таким образом, препятствует комплемент-опосредованной опсонизации бактерий [168]. Повышение устойчивости к фагоцитозу обычно коррелирует с увеличением отрицательного заряда микробной клетки, способствующего электростатическому отталкиванию от одноименно заряженных фагоцитов [162]. Но в клетках *Y. pestis* синтез капсулы, напротив, сопровождается снижением отрицательного заряда клеточной поверхности [2]. Отсутствие F1 у некоторых штаммов *Y. pestis* по данным Н.Н. Гребцовой с соавт. [7] приводило к снижению эффективности захвата бактерий макрофагами морских свинок, но не белых мышей.

Одним из обязательных этапов в патогенезе чумы является размножение её возбудителя внутри макрофагов [52]. При этом вирулентность штаммов чумного микроба коррелирует не с устойчивостью к захвату фагоцитами [96], а со способностью выживать и размножаться в фаголизосомах фагоцитирующих клеток за счет подавления их антибактериальных функций [54]. Некоторые учёные считают, что внутриклеточное размножение *Y. pestis* происходит только в начале инфекционного процесса при бубонной форме чумы. Это, по их мнению, связано с функционированием системы секреции 3-го типа, посредством которой токсичные белки бактерии доставляются в цитозоль эукариотической клетки при тесном с ней контакте [58], опираясь лишь на электронно-микроскопические данные патоморфологических изменений при экспериментальном псевдотуберкулезе [151].

R.W. Titball *et al.* [157] показали, что при парентеральном введении мышам производных аттенуированного штамма *S. typhimurium* SL3261, несущих рекомбинантные плазмиды с полным *cafI* опероном, неспособные стабильно наследоваться *in vitro*, в организме животных происходит селекция клеток, сохраняющих и экспрессирующих гены, ответственные за продукцию капсульного антигена. Из печени и селезенки животных, умерщвленных в течение первой недели с момента заражения, удавалось высевать

только F1⁺ рекомбинантные клоны [157]. Кроме того установлено, что рекомбинантные клетки *E. coli*, способные образовывать капсулу *Y. pestis*, были устойчивы к фагоцитозу мышинными перитонеальными макрофагами [81].

Известно, что в основе цитотоксического действия лимфоцитов на раковые клетки лежит способность продуцировать белок перфорин, который "встраивается" в оболочку злокачественной клетки, что приводит к нарушению ее осмотической регуляции и последующей гибели. Подобным же образом действуют дефензины - пептиды нейтрофилов и макрофагов, обладающие широким спектром антимикробной активности. Высказано предположение [1], что F1 действует аналогичным образом на клетки-мишени теплокровного животного, так как показано, что он способен образовывать поры в двухслойных фосфолипидных мембранах, проницаемые для воды [140].

По мнению G.P. Andrews *et al.* [35] гибель после заражения вирулентным штаммом отдельных иммунизированных животных, обладающих высокими титрами антител к F1, возможно происходит за счет того, что секретруемый бактериями в окружающую среду капсульный антиген связывает значительные количества иммуноглобулинов, препятствуя, таким образом, опсонизации бактерий. По их мнению, возможно также и сливание с фрагментами капсулы уже прикрепившихся к ней антител.

В своих работах В.П. Завьялов с соавт. [182] сообщали о высоком аффинитете молекулярного ашера Caf1A наряду со структурной субъединицей капсульного антигена Caf1, и к человеческому интерлейкину 1 β (hIL-1 β). Авторы предположили, что Caf1 может конкурировать с интерлейкинами 1 α , 1 β и 1 γ за связывание с рецепторами на лимфоидных клетках, противодействуя развитию адекватного иммунного ответа. При этом молекулярный ашер Caf1A может сорбировать интерлейкины и препятствовать их контакту с макрофагами [182].

В.М. Абрамов с соавт. [30] установили, что димеры Caf1 могут связываться с рецепторами IL-1 на поверхности эпителиальных клеток тимуса человека и макрофагов и обеспечивать тесный контакт между *Y. pestis* и эука-

риотической клеткой мишенью за счет их крепления на расположенном во внешней мембране Caf1A ашере. Подобный контакт необходим для инициации системы секреции 3-го типа, обеспечивающей доставку цитотоксических эффекторных белков Yop в клетку мишень хозяина.

Было показано, что лечение экспериментальной чумы, вызванной бескапсульными вариантами штаммов *Y. pestis*, как образующимися в природе, так и полученными гено-инженерным путём, было менее эффективным при использовании таких антибиотиков, как доксициклин, ампициллин и цефоперазон. Бескапсульные штаммы также были устойчивы к тетрациклинам, β -лактамам и хинолонам, когда культивировались *in vitro* внутри макрофагов, но не на питательных средах. Известно, что клетки *Y. pestis* способны переживать и даже размножаться в фаголизосомах макрофагов [52]. Перечисленные выше группы антимикробных препаратов не могут в активной форме проникать в фагоциты [144]. Возможно капсула *Y. pestis* может влиять на уровень проницаемости этих антибиотиков через плазматическую мембрану макрофагов. Способность Caf1 встраиваться в двухслойные фосфолипидные мембраны, образуя в них поры, проницаемые для воды, по мнению C.G. Rodrigues *et al.* [140], лежит в основе цитопатического действия *Y. pestis* на фагоцитарные клетки. Также известно, что после обработки канал-формирующими токсинами мембраны клеток становятся проницаемыми для целого ряда молекул [100]. С учетом всех обстоятельств можно предположить *a priori*, что сформированные FI *in vivo* водные поры могут образовывать основной путь проникновения антибиотиков в макрофаги и их фаголизосомы и, таким образом, обеспечивать чувствительность к антибиотикам клеток *Y. pestis* «дикого» типа [37].

1.7 Иммуногенные свойства Caf1 *Y. pestis*

H. Schütze [148] впервые показал, что содержащийся в "оболочке" (капсуле) "оболочечный" (капсульный) антиген возбудителя чумы является им-

мунодоминантным. Иммунологическая активность капсульного антигена *Y. pestis* была продемонстрирована в работах Е.Е. Baker [40] и L.G. Bennett [43]. Последний на основании данных об одинаковой иммунохимической активности в РДИД как исходного, так и полностью диссоциированного капсульного антигена предположил, что антигенные детерминанты Caf1 определяются структурой его субъединицы и не зависят от конформации надмолекулярного образования [43]. Поиск иммунодоминантных эпитопов Caf1 был продолжен в последующих работах.

Экспериментальные данные по локализации протективного эпитопа В1, полученные Tripathi *et al.* [160], согласуются с данными, теоретически предсказанными [85]. В частности, было предположено, что регион зрелого Caf1 между а.о. 84-86 локализован на поверхности белка, включает β -повороты и более того, может образовывать антигенные детерминанты. Экспериментальные находки V.P. Zav'yalov *et al.* по локализации эпитопа В1 также согласуются с результатами, полученными Tripathi *et al.* [160]. Авторы локализовали В-клеточный эпитоп с помощью синтетических пептидов, перекрывающих последовательности предсказанных эпитопов [85]. Эпитоп, соответствующий последовательности а.о. 72–95 капсульного антигена взаимодействовал с поликлональными антителами пула иммунных сывороток против вакцинного штамма *Y. pestis* EV и F1 антигена, а также мышинными МАТ против F1. В соответствии с трехмерной структурой F1 остатки Т85, К87, I89, G90, К91, D92, S93, К94 и D95 находятся на поверхности белка. Остатки Y71, T73, G79, N80, N81, H82 и Q83 находятся на той же поверхности.

Экспериментальные данные по локализации протективного эпитопа В2, полученные Tripathi *et al.* [160], также согласуются с данными, теоретически предсказанными [85]. В частности, было предположено, что второй вероятный В-клеточный эпитоп локализован на С-конце белка и соответствует а.о. 128–140 зрелого Caf1 [85]. В соответствии с трехмерной структурой Caf1 а.о. R124, S125, I126, G127 и S128 локализованы рядом с а.о. F84, T85, К87, I89, G90, К91, D92, S93, R94, D95, формируя протективный В1 эпитоп. Срав-

нение экспериментальных данных, опубликованных Tripathi *et al.* [160] и полученных V.P. Zav'yalov *et al.* [182], подтверждает существование конформационного В-клеточного эпитопа, включающего а.о. T73, G79, N80, N81, H82, Q83, T85, K87, I89, G90, K91, D92, S93, R94, D95, F96, D97, I98, F122, R124, S125, I126, G127, S128, K129, G130, G131, K132 и A134, часть которых одновременно образуют два В-клеточных эпитопа, обладающих протективными свойствами. Это заключение не противоречит данным, демонстрирующим антигенную моновалентность мономерной субъединицы Caf1 [113].

Однако между результатами Tripathi *et al.* [160] и Musson *et al.* [122] существуют противоречия по локализации Т-клеточных эпитопов. Musson *et al.* [122] исследовали механизмы антигенной презентации Т-клеточных эпитопов Caf1 *Y. pestis*, используя макрофаги костного мозга мышей в качестве антиген-презентирующих клеток и Т-клеточные гибридомы, специфичные для эпитопов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса II, расположенных в последовательности Caf1. Два Т-клеточных эпитопа, (123) VRSIGSKGGKLAAG (136) и (134) AAGKYTDAVTVTVS (147) (обозначенных как Т3 и Т4, соответственно), в С-концевой половине глобулярного домена Caf1 презентировались с помощью вновь синтезированных молекул ГКГС класса II после лизосомального процессинга в условиях низкого рН, в то время как эпитоп Т1 (7) TTATATLVEPARIT (20), локализованный на неструктурированном N-концевом участке белка презентировался зрелыми молекулами ГКГС класса II вне зависимости от низкого рН и без видимой потребности в протеолитическом процессинге. Расположенный между ними четвертый эпитоп (а.о. 48-61) обладал промежуточными свойствами. Гидролиз белка в процессе его презентации начинался с N-конца. В целом, данные, представленные в работе, согласовываются с моделью последовательной презентации Caf1 антигена во время прохождения его через эндосомальный путь антигенпрезентирующих клеток. Дифференциальная зависимость от рН и протеолитической обработки эпитопов Caf1 позволяет предположить, что адьюванты, нацеленные на вакцинный антиген в лизосомах, могут приводить

к индукции Т-клеток, специфичных для эпитопов CD4-Т-клеток [122]. Интересно, что Т3 и Т4 эпитопы, локализованные Musson *et al.* [122] практически совпадали с В2 протективным эпитопом, обнаруженным Tripathi *et al.* [160].

G. Gupta *et al.* [88], проанализировав аминокислотную последовательность Caf1 с помощью программы DNA STAR, выявили четыре В-клеточных: В1 (а.о. 105-123), В2 (а.о. 142-165), В3 (а.о. 96-106), В4 (а.о. 141-154), и два Т-клеточных эпитопа: Т1 (а.о. 123-137), Т2 (а.о. 137-148). Среди синтезированных пептидов наиболее иммуногенным оказался В2, за ним следовали В1 и В3, а использование химерных В-Т пептидов позволило авторам получить антительный ответ, сравнимый с ответом на полноразмерный Caf1 с более эффективной стимуляцией клеточного звена иммунитета. Авторы сделали вывод, что главным иммунодоминантным эпитопом молекулы Caf1 являются а.о. 142–165.

Капсульный антиген чумного микроба является видоспецифичным белком, и иммунодиагностика чумы построена на выявлении F1 или анти-F1-антител [8, 128].

Известно, что формирование устойчивости к инфекции зависит, главным образом, от иммунного ответа на небольшое число антигенов, располагающихся на поверхности микроорганизмов. Покрывающий поверхность микробных клеток капсульный антиген *Y. pestis* — важнейший составной элемент всех современных чумных вакцин. Показана его ведущая роль в создании напряженного иммунитета у белых мышей, крыс, приматов и человека [8, 129]. У морских свинок при введении в микрограммовых количествах с адьювантом препарат F1 стимулирует протективный ответ, но в «миллиграммовых» дозах - иммунопаралич [112, 166].

По данным Г.В. Ермаковой с соавт. [9] и Е.Д. Прокопьевой с соавт. [19] фракция I индуцировала выработку макрофагами интерлейкина-1 и фактора некроза опухолей; наибольшим защитным действием обладал препарат F1, содержащий углеводный компонент, причем лучший эффект оказывала агрегированная форма капсульного антигена. Как упоминалось ранее Т-

клеточные эпитопы, индуцирующие клеточное звено иммунного ответа, присутствуют в собственной структуре субъединицы капсульного антигена [7, 78]. Следует отметить, что основное значение в формировании иммунитета к чуме принадлежит именно клеточным иммунным процессам и главным образом Т-системе лимфоцитов [4].

1.8 Заключение по обзору литературы

Капсула - это один из основных факторов патогенности *Y. pestis*, благодаря которым данный микроорганизм способен противостоять защитным механизмам хозяина. Ее основной компонент – капсульный антиген – обладает целым рядом активностей, направленных на угнетение врожденного иммунитета. Он препятствует захвату бактерии интактными фагоцитами хозяина и истощает систему комплемента за счет избирательной активации C² и C⁴ компонентов системы комплемента, угнетает активность рецепторного аппарата Т-хелперов морских свинок. Структурные составляющие F1 могут вступать в конкуренцию с интерлейкинами 1 α , 1 β и 1 γ за связывание с рецепторами на лимфоидных клетках, препятствуя развитию адекватного иммунного ответа, а также конкурируют с интерлейкином γ IL-1 β за общие рецепторы на иммунокомпетентных клетках.

Капсульный антиген *Y. pestis* - важнейший составной элемент всех современных чумных вакцин. Однако селективное давление иммунной системы хозяина способствует накоплению в макроорганизме бескапсульных (F1⁻) вариантов чумного микроба, сохранивших вирулентность на уровне штаммов «дикого типа», что свидетельствует о нецелесообразности использования моноантигенных вакцин на основе F1. Кроме того возможность циркуляции бескапсульных штаммов в природе необходимо учитывать при лабораторной диагностике чумы, так как большинство диагностических препаратов нацелено именно на капсульный антиген или кодирующий его ген *caf1*.

Представленная выше информация является ярким примером того, что только детальное и всестороннее изучение отдельных факторов патогенности болезнетворных микробов может способствовать их рациональному использованию в качестве молекулярных мишеней для диагностики, профилактики и лечения вызываемых ими болезней.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ¹

2.1. Штаммы микроорганизмов

Панель из 125 штаммов, использованных в диссертационном исследовании, с указанием основных характеристик (видовые и родовые названия, источник получения) представлена в Приложении А.

Классификация чумного микроба, используемая в работе, соответствует правилам Международного кодекса номенклатуры бактерий (МКНБ). Род *Y. pestis* делится на два подвида: основной – *pestis* (включает 4 патогенных для человека биовара: *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *intermedium*), и неосновной – *microti* («полевочьи») биовары *altaica*, *angola*, *caucasica*, *hissarica*, *qinghaiensis*, *talassica*, *ulegeica*, *xilingolensis* и генногруппа 0.РЕ7) [17].

¹ Все исследования, представленные в настоящей работе, проводились 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».

2.2 Среды и условия культивирования

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 выращивали при температуре 37 °С в течение 48 ч в интервале рН от 6,3 до 7,3. В дальнейшем культуру с поверхности плотной питательной среды смывали физиологическим раствором хлорида натрия при помощи стеклянных бус.

Аттенуированные культуры *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *caucasica* С-376pCad⁻ и С-824pCad⁻, рост которых независим от ионов кальция при температуре 37 °С, получали путем высева исходных штаммов на магниевую оксалатный агар в соответствии с рекомендациями [22].

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 следующего состава: сернокислотный гидролизат казеина (20-30 г/л), дрожжевой автолизат (10 г/л), глюкоза (3-9 г/л), K₂HPO₄ (6 г/л), KH₂PO₄ (3 г/л) и MgSO₄ (0,5 г/л) Na₂S₂O₃ (0,6 г/л) при рН 7,2. Биомассу отделяли центрифугированием после 12-14 ч инкубации, супернатант использовали для выделения изоформ Caf1.

2.3 Лабораторные животные

В экспериментах с животными, одобренными комиссией по биоэтике ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Протокол № ВП-2015/2) использовали 7-недельных мышей линии BALB/c (19 ± 2) г (Институт биорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Россия), в соответствии с принципам, установленными Европейским Союзом по

обращению, уходу и защите лабораторных животных (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm).

2.4 Молекулярно-генетические методы

2.4.1. Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.1794 – 03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности». Для выделения ДНК использовали комплект реагентов для выделения ДНК из биопроб производства НПФ «Литех» (Россия). Петлю бактериальной культуры вносили в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и аккуратно суспендировали в 0,2 мл физиологического раствора. К суспензии добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %) с последующим прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 мин. После обработки мертиолятом натрия 100 мкл образца переносили в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 300 мкл лизирующего раствора и 20 мкл сорбента, и инкубировали 15 мин при температуре 65 °С. После выполнения данного этапа материал считали обеззараженным.

2.4.2 Секвенирование гена *cafI*

Нуклеотидную последовательность гена *cafI* определяли путем прямого секвенирования ПЦР-фрагмента, полученного после амплификации части *cafI* оперона соответствующего штамма. Праймеры *cafI*-F (5'-GAATTTGTTCGTGGATTGGA-3') и *cafI*-R (5'-TTAAAGGAGGGCATAATAGC-3'), фланкирующие ген *cafI* и расположен-

ные внутри генов *caf1A* и YPM1.85, использовали и для амплификации фрагментов, и для прямого секвенирования.

Амплификацию участка гена *caf1* проводили на приборе C1000™ (BioRad, США) при следующем температурном режиме: начальная денатурация при температуре 95 °C в течение 5 мин; затем 30 циклов, состоящих из денатурации при температуре 95 °C в течение 40 с, отжига праймеров при температуре 57 °C в течение 30 с и элонгации при температуре 72 °C в течение 1 мин 30 с; завершающий цикл при температуре 72 °C в течение 5 мин 30 с.

Учет результатов ПЦР осуществляли методом горизонтального электрофореза (напряженность электрического поля 10 В/см в течение 40 мин) в 1 %-ном агарозном геле при окрашивании бромистым этидием с применением маркеров размеров ДНК «O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder» (Fermentas, Литва). Очистку продукта амплификации проводили с использованием набора DNA Extraction Kit (Fermentas, Литва) по прилагающейся инструкции.

Секвенирование по Сенгеру проводили с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3500 Life Technologies (Applied Biosystems, США). Проводили амплификацию при следующем температурном режиме: начальная денатурация при температуре 96 °C в течение 1 мин; затем 30 циклов, состоящих из денатурации при температуре 96 °C в течение 10 с, отжига при температуре 50 °C в течение 5 с и элонгации при температуре 60 °C в течение 4 мин. Полученные образцы очищали на колонках с использованием набора Centri-Sep™ Spin (Invitrogen™, США) по инструкции, разработанной производителем.

2.4.3 Полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*

Полногеномное секвенирование 19 штаммов *Y. pestis* подвида *microti*, принадлежащих к биоварам *ulegeica*, *caucasica*, *xilingolensis*, *hissarica*, *talassica*, *altaica* выполняли с использованием системы Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA). В последующем полученные данные депонировали в DDBJ/EMBL/GenBank.

Измерение концентрации ДНК осуществляли на флуориметре Qubit 2.0 с помощью набора реактивов Qubit® dsDNA HS Assay Kit. Деграцию геномной ДНК проводили с использованием настольного прибора для механической фрагментации молекул ДНК и дезагрегации микрочастиц посредством ультразвука Bioruptor sonication system (Diagenode, BELGIUM). ДНК нужных размеров оценивали с использованием системы E-gel Size-select. Очистку ДНК после фрагментации осуществляли 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 при следующем температурном режиме: 50°C – 2 мин, 95°C – 20 с; затем 40 циклов в режиме 95°C – 3 с, 60°C – 30 с (детекция FAM). Расчет необходимого количества каждой библиотеки проводили по формуле из мануала с сервера для обработки информации Torrent Server на сайте <https://ioncommunity.thermofisher.com/welcome>. Клональную амплификацию на микросферах проводили на автоматизированной системе OneTouch 2. При секвенировании использовали чип Ion 318™ Chip v2.

2.5 Выделение и очистка CafI *Y. pestis*

Секретируемый капсульный антиген выделяли из надосадочной фракции бульонных культур трех аттенуированных штаммов *Y. pestis* (EV НИИЭГ – изоформа CafI_{NT1}, С-376pCad⁻ – изоформа CafI_{NT2} и С-824pCad⁻ - изоформа CafI_{NT3}) с последующей хроматографической очисткой. Надосадочную фракцию медленно разбавляли раствором 4 М сульфата аммония для достижения конечной концентрации соли 1 М и выдерживали при температуре 4 °С в течение 2 ч. Осадок после центрифугирования (15000 × g) в течение 30 мин при температуре 4 °С удаляли. Выделение капсульного антигена проводили методом гидрофобной хроматографии на колонке HiTrap Фенил FF (High Sub) 16/10 (GE Healthcare), предварительно уравновешенной пятью объемами буфера 20 мМ Трис-НСl, содержащего 1 М сульфата аммония (рН 8,0). Осветленную надосадочную жидкость пропускали через колонку и промывали последнюю четырьмя объемами того же буфера, после чего элюировали белки понижающимся градиентом сульфата аммония до концентрации 0,0 %. Объем градиента составлял 10 объемов колонки, все буферы содержали 20 мМ Трис, рН 8,0, объем собираемых фракций составлял 10 мл. Пробы анализировали с использованием 12,5 % ДСН-ПААГ. Фракции, содержащие белок CafI, объединяли и концентрировали с помощью второго прогона через ту же колонку, предварительно промытую деионизованной водой и уравновешенную 20 мМ Трис-НСl буфера, с 1 М сульфата аммония (рН 8,0). Фракции анализировали 12,5% ДСН-ПААГ и обессоливали диализом или на колонке ХК 26/30 (GE Healthcare), упакованной хроматографической средой Toyopearl HW-40F (Tosoh Bioscience) и уравновешенной 20 мМ Трис, рН 8,0. Фракции, содержащие очищенный белок CafI_{NT1}, CafI_{NT2} и CafI_{NT3} концентрировали с использованием мембраны YM-10 (Millipore) и хранили при температуре -70 °С. Концентрацию белка определяли с использованием Bio-Rad Protein Assay Kit I (Bio-Rad, USA). Определение примесей ЛПС в препаратах выполняли с помощью электрофоретического разделения в по-

лиакриамидном геле с дальнейшей визуализацией липополисахарида с помощью окрашивания аммиачным раствором оксида серебра после окисления йодной кислотой по общепринятой методике.

2.6 Изучение иммунологических свойств изоформ капсульного антигена

2.6.1 Иммунизация мышей изоформами CafI

Препараты антигенов CafI_{NT1}, CafI_{NT2} и CafI_{NT3}, выделенные из штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, С-376pCad⁺ и С-824pCad⁺, соответственно, стерилизовали, пропуская через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм, и сорбировали в соотношении 1:10 (в/в) на стерильной гидроокиси алюминия (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере при перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. Концентрацию антигена рассчитывали таким образом, чтобы 200 мкл суспензии содержали 10 мкг белка. Мышей линии BALB/c случайным образом разделили на четыре группы по 96 особей в каждой. Препараты вводили мышам в объеме 200 мкл подкожно в область верхней трети правого бедра. Четвертая контрольная группа была представлена животными, иммунизированными гидроокисью алюминия в дозе равной количеству препарата, вводимого вместе с белками CafI.

Иммунизацию мышей BALB/c и последующее заражение проводили по следующей схеме:

0-й день - иммунизация мышей 10 мкг препарата антигена, сорбированного на гидроокиси алюминия;

29-й день - отбор крови у пяти случайно выбранных животных иммунизированных и контрольной групп путем пункции ретроорбитального синуса после анестезии с использованием CO₂ для определения титров специфичных антител методом твердофазного ИФА;

30-й день - повторная иммунизация в дозе 10 мкг;

62-й день - отбор крови у пяти случайно выбранных животных иммунизированных и контрольной групп путем пункции ретроорбитального синуса после анестезии с использованием CO₂ для определения титров специфичных антител методом ИФА;

64-й день - заражение мышей вирулентными штаммами *Y. pestis* 231, *Y. pestis* C-376 и *Y. pestis* C-824 в дозах от 2 LD₅₀ до 2 × 10³ LD₅₀;

85-й день (21-й день после заражения) - окончательный учет результатов эксперимента.

2.6.2 Перекрёстная протективность изоформ Caf1

Для оценки LD₅₀ мышей трех иммунизированных и контрольной групп заражали вирулентными штаммами, продуцирующими разные изоформы Caf1 (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Схема эксперимента по изучению перекрестной протективной активности препаратов Caf1

Иммунизирующий препарат	Заражающий штамм			Кол-во мышей
	231	C-376	C-824	
Caf1 _{NT1}	32	32	32	96
Caf1 _{NT2}	32	32	32	96
Caf1 _{NT3}	32	32	32	96
Al(OH) ₃	32	32	32	96

Каждая группа была подразделена на три подгруппы по 32 мыши, которым подкожно в область верхней трети левого бедра вводили 10-кратные разведениями двухсуточных бактериальных культур штаммов *Y. pestis* 231 (NT1), *Y. pestis* C-376 (NT2) и *Y. pestis* C-824 (NT3) в 0,9 %-ном растворе

NaCl, (от 2 LD₅₀ до 2 × 10³ LD₅₀; 8 мышей на дозу). Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Погибших животных вскрывали и исследовали бактериологическим методом. Животные, которые выжили, были гуманно подвержены эвтаназии.

Напряженность противочумного иммунитета (ИИ), т.е. способность вакцинного препарата (экспериментального образца) предохранять животное от заражения массивными дозами вирулентной культуры, определяли по формуле:

$$\text{ИИ} = \frac{LD50_{\text{имм}}}{LD50_{\text{инт}}}, \quad (1)$$

где ИИ – индекс иммунитета;

LD50_{имм} - LD₅₀ для животных, иммунизированных экспериментальными образцами препаратов, в дозе 10 мкг, КОЕ;

LD50_{инт} - LD₅₀ для интактных животных, КОЕ.

2.6.3 Перекрёстная серологическая активность изоформ Caf1

Серологическую перекрёстную активность трех изоформ Caf1 *Y. pestis* (Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3}) оценивали в иммунохроматографическом (ИХ) тесте и иммуноферментном анализе (ИФА). Для проведения иммунохроматографического теста использовали набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ тест *Yersinia pestis*» (ФБУН ГНЦ ПМБ) согласно прилагаемой инструкции. ИФА выполняли с использованием тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной (ИФАПестФ1- М) производства РосНИП-ЧИ Микроб в соответствии с рекомендациями производителя.

Перекрёстную активность сывороток вакцинированных мышей с тремя изоформами Caf1 *Y. pestis* выявляли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для оценки титра антител к Caf1 *Y. pestis* в сыворотках иммунных

мышей использовали метод твердофазного ИФА. В лунки микропланшетов (Greiner Bio-One, Австрия) сорбировали растворы соответствующих структурных вариантов *Caf1* (10 мкг/мл) в 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,6) в течение 1 ч при температуре 37 °С. Неспецифическое связывание блокировали 3%-ным раствором желатина из кожи рыб, обитающих в арктических водах (Sigma-Aldrich) в 10 мМ Трис-буфером, рН 7,2, содержащим 0,15 М NaCl. На всех этапах ИФА лунки промывали 10 мМ Трис-буфером, рН 7,2, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05 % твина-20. Пробы сывороток, полученных от иммунных или контрольных животных разводили до 1 : 1000 и далее титровали с шагом в 2,5 в лунках микропланшета. Инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 С. Комплекс антиген-антитело выявляли с помощью антимышинных IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:4000; Sigma) в течение 1 ч при температуре 37 °С. Ферментативную реакцию проводили в растворе ортофенилендиамина (ОФД), субстрата для пероксидазы хрена (Sigma, США), с добавлением перекиси водорода до 0,03 %. Реакцию останавливали добавлением в лунку 100 мкл 1 М H₂SO₄, Оптическую плотность (ОП) считывали при 450 нм с использованием системы EVOLIS Твин Plus (Bio-Rad, США). Титр антител оценивали как максимальное разведение сыворотки, показания ОП, которой на 0,1 превышают фон. Фоновые значения получали при анализе образцов сывороток, полученных от животных, иммунизированных только гидроокисью алюминия.

2.7 Биоинформационные методы

2.7.1 Анализ полиморфизма гена *caf1*

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

проводился с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Результаты, полученные с помощью секвенирования по Сенгеру, анализировали с помощью программы Chromas 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).

2.7.2 Анализ полногеномных последовательностей ДНК

Для фильтрации ридов использовали программу Trimmomatic 0.33, а сборку в контиги выполняли при помощи программ SPAdes 3.9. и Newbler 2.9. В результате были получены первичные полногеномные сборки, на которых осуществляли биоинформационный анализ 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>). Полученные в ходе полногеномного секвенирования нуклеотидные последовательности ДНК *Y. pestis* размещали в международной базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) с присвоением кода доступа.

Для анализа нуклеотидной варибельности шаперон/шерстных систем секреции у 27 штаммов *Y. pestis* из базы данных DDBJ/EMBL/GenBan (таблица 2.3), 19-ть из которых были секвенированы и депонированы нами, а также аналогичных данных о *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (CP009712.1), использовали программы NCBI Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), Mauve - Multiple Genome Alignment (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>), Lasergene 11 (DNASTAR, США).

Таблица 2.3 – Используемые в работе полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis*

SNP-тип	биовар	Штамм	Коды доступа
subsp. <i>microti</i>			
0.PE2	caucasica	C-537	LIYP00000000.1
		C-370	MIDX00000000.1
		C-590	LIYQ00000000.1
		C-346	LIZE00000000.1
		C-359	LIZB00000000.1
		C-666	LIZF00000000.1
		C-197	LIYX00000000.1
		C-267	LIYZ00000000.1
		C-291	LIZC00000000.1
		C-235	LIYY00000000.1
0.PE3	angola	Angola	CP000901.1
0.PE4	altaica	I-3455	LIYV00000000.1
		A-513	LIZA00000000.1
0.PE4	talassica	A-1804	LIYW00000000.1
		A-1807	LIYT00000000.1
0.PE4	hissarica	5307-Gis	LIYS00000000.1
0.PE4	xilingolensis	I-3134	LIYR00000000.1
0.PE5	ulegeica	I-3189	LIYO00000000.1
		I-2422	LIZG00000000.1
		I-2239	LIZD00000000.1
0.PE7		CMCC05009	ADQE00000000.1
		620024	ADPM00000000.1
subsp. <i>pestis</i>			
1.ORI	orientalis	CO92	CP009906.1
2.MED	mediaevalis	KIM10	SAMN02604093
2.ANT	antiqua	Nepal516	CP000305.1
1.ANT	antiqua	Antiqua	CP009906.1
<i>Y. pseudotuberculosis</i>			
IP32953			CP009712.1

2.7.3 Структурно-пространственные свойства изоформ капсульного антигена *Y. pestis*

Для выявления внутренней неупорядоченности родственных белков аминокислотные последовательности трех изоформ CafI анализировали *in*

silico. Внутреннюю неупорядоченность изоформ Caf1 оценивали с использованием трех анализаторов: PONDR® VSL2, PONDR® VLXT, PONDR® FIT. Построение вторичной структуры выполняли с помощью программы LaserGene DNA. Моделирование трёхмерной структуры выполняли с помощью автоматизированного сервера Swiss-model и Bri-shur, поиск гомологов белка осуществляли через сервер Protein Data Bank, PDB.

2.8 Статистические методы

Данные ИФА выражали, как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения. Вычисление величин LD₅₀ и доверительного интервала (для вероятности 95 %) проводили по методу Kärber [1]. Временной диапазон гибели и временной диапазон средней продолжительности жизни животных подсчитывали для каждой группы. Сравнение кривых выживаемости осуществляли с использованием Log-Rank теста (Mantel-Cox).

ГЛАВА 3 СРАВНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И СТРУКТУРНО-ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СВОЙСТВ ИЗОФОРМ Caf1, ВЫЯВЛЕНИЕ ОТЛИЧИЙ

Вариабельность последовательности гена *caf1* впервые была описана грузинскими микробиологами для штаммов биовара *caucasica*, выделенных на территории Грузии и Армении от полевых и их эктопаразитов [139]. Ими же была обнаружена замена в нуклеотидах, приводящая к замене аминокислот относительно последовательности гена в штаммах неосновного подвида *microti*, по сравнению со штаммами основного подвида произошла замена аланина на серин (A48 →S48).

Задачей настоящего этапа исследования явилось изучение полиморфизма последовательностей гена *caf1* и соответствующих полипептидов у представителей различных подвидов *Y. pestis*, циркулирующих на территории природных очагов чумы СНГ и Монголии. Особое внимание было уделено Caf1 антигену из штаммов *Y. pestis* подвида *microti*. Было проведено компьютерное моделирование структуры белка для обнаруженных вариантов генов.

3.1 Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *caf1* генов *Y. pestis* и кодируемых ими аминокислотных последовательностей белков

Секвенирование капсульного антигена проводили с целью сравнения нуклеотидных последовательностей *caf1* для выявления вариабельности аминокислотных последовательностей соответствующих полипептидов у представителей различных внутривидовых групп *Y. pestis*.

В настоящем исследовании провели секвенирование по методу Сенгера нуклеотидной последовательности гена *caf1* у 122 штаммов *Y. pestis* подвида *microti*, относящихся к биоварам *caucasica*, *hissarica*, *talassica*, *altaica*, *xilingolensis*, *qinghaiensis* и *ulegeica*, выделенных на территории природных

очагов чумы СНГ и Монголии (таблица 3.1). Результаты анализа аминокислотных последовательностей белка Caf1 изученных штаммов чумного микроба приведены в приложении Б.

Таблица 3.1 - Типы Caf1, характерные для штаммов *Y.pestis* subsp. *microti*, принадлежащих к различным биоварам

Изоформа	Биовар	Очаг (мезоочаг)	Кол-во штаммов
Caf1 _{NT1}	altaica	36	16
		M01	3
	qinghaiensis	M20	2
	xilingolensis	M20	2
		M27	1
	hissarica	34	4
	talassica	40	4
	ulegeica	M01	5
		M02	2
M13		4	
Caf1 _{NT2}	caucasica	04	18
		05	10
		06	13
		07	12
Caf1 _{NT3}	caucasica	39	25

В результате сравнения аминокислотных последовательностей установили, что, как и у представителей подвида *pestis*, белок Caf1 изолятов *Y. pestis* биоваров *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica* и *ulegeica* несет в позиции 48 аминокислоту аланин, а в позиции 117 фенилаланин. Исследованные нами 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*, цирку-

лирующих в Восточно-Кавказском высокогорном природном очаге чумы (№ 39), в позиции 48 обнаружили аминокислоту аланин, а в 117 - валин.

Таким образом, белок Caf1 *Y. pestis* образует три изоформы: глобальная - NT1 (A48 F117), тип NT2 (S48 F117), свойственный штаммам из Закавказского высокогорного и граничащего с ним Приараксинского низкогорного природных очагов, и новый тип NT3 (A48 V117), эндемичный для представителей Восточно-Кавказского высокогорного природного очага чумы (рисунок 3.1). Тип Caf1_{NT2}, характерный для представителей Закавказского высокогорного и Приараксинского низкогорного очагов чумы, отличается от глобальной изоформы Caf1_{NT1} заменой A48→S48, в то время как Caf1_{NT3} штаммов, выделенных в Восточно-Кавказском высокогорном природном очаге чумы, характеризуется заменой F117→V117.

```

Caf1NT1      MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGAPITIMDNGNIDT
Caf1NT2      -----S-----
Caf1NT3      -----
*****:*****

Caf1NT1      ELLVGTLTLGGYKTGTTSTSVNFTDAAGDPMYLTFTSQDGNNHQFTTKVIGKDSRDFDIS
Caf1NT2      -----
Caf1NT3      -----V-----
*****.***

Caf1NT1      PKVNGENLVGDDVVLATGSQDFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Caf1NT2      -----
Caf1NT3      -----
*****

```

Рисунок 3.1 – Множественное выравнивание последовательностей изоформ Caf1 белка, 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) является эндемичным в Восточно-Кавказском высокогорном природном очаге чумы.

3.2 Внутренний фолдинг структуры различных вариантов Caf1 антигена *Y. pestis*

3.2.1 Вторичная структура

Пространственную структуру трёх изоформ капсульного антигена *Y. pestis* моделировали с помощью программы LaserGene DNASTAR NovaFold. На рисунке 3.2 (а, б) представлен элемент вторичной структуры изоформ Caf1 в нестабильных областях, соответствующих аминокислотам в позициях 48 и 117 (полная вторичная структура каждой изоформы отображена в приложении В). Замены аминокислот A48→S48 в Caf1_{NT2} и F117→V117 в Caf1_{NT3} внесли изменения в α , β регионы белка, области поворотов участков и их частоту. Известно, что все аминокислоты в цепочке имеют определённые свойства: гидрофобность, гидрофильность, электрический заряд, изменение которых влияет на конформацию белка [29]. Обнаруженные замены оказывают незначительное влияние на профиль гидрофобности белковой молекулы (рисунок 3.3).

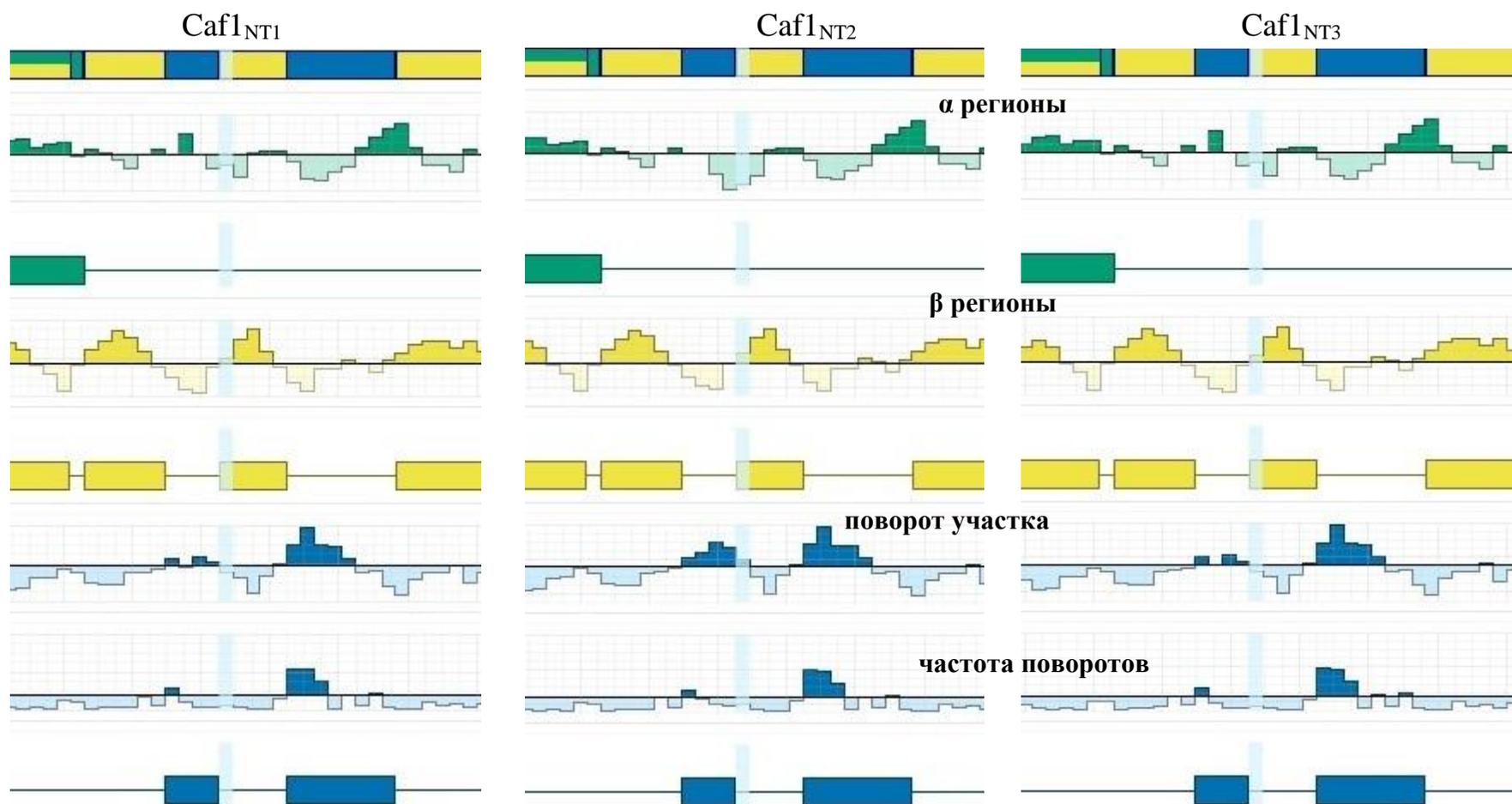


Рисунок 3.2(а) – Элемент вторичной структуры Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2}, Caf1_{NT3} в области 48 а.о.

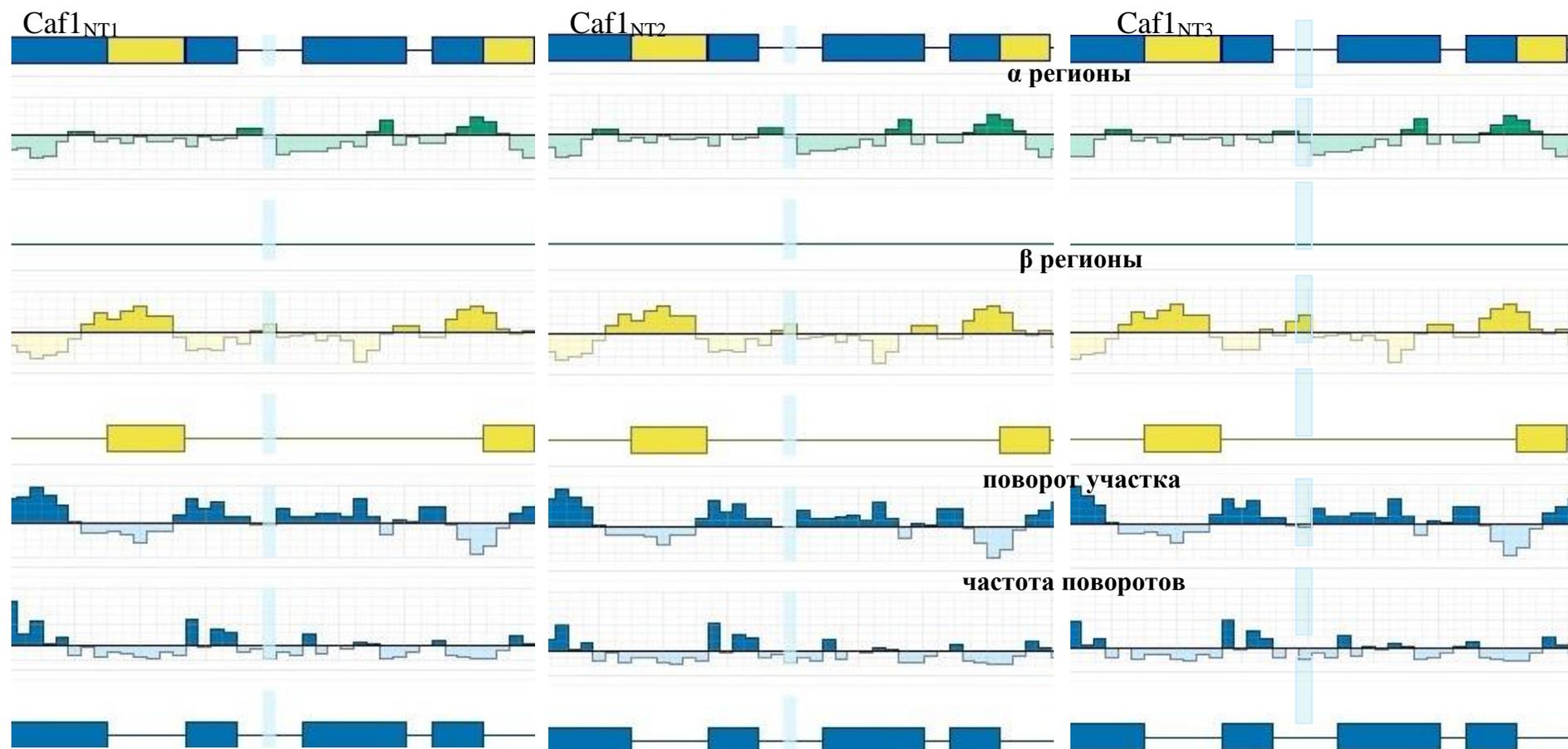
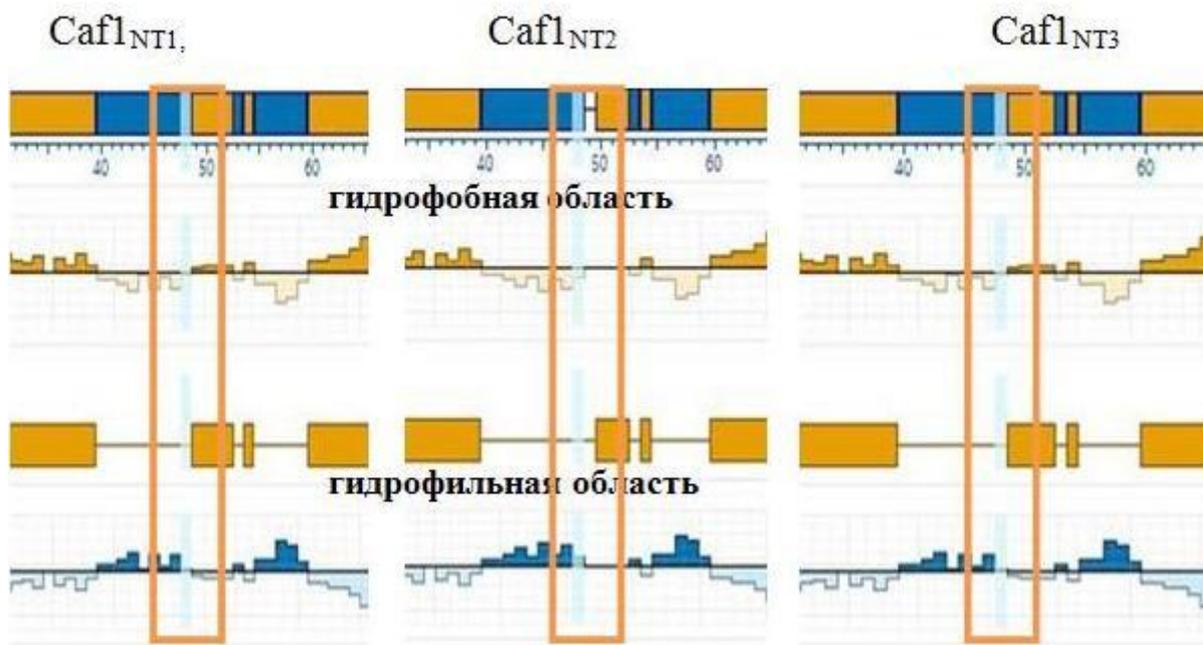


Рисунок 3.2(b) – Элемент вторичной структуры Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2}, Caf1_{NT3} в области 117 а.о.



Область окружения аминокислоты в позиции 48 обозначена голубой пунктирной линией в оранжевом прямоугольнике

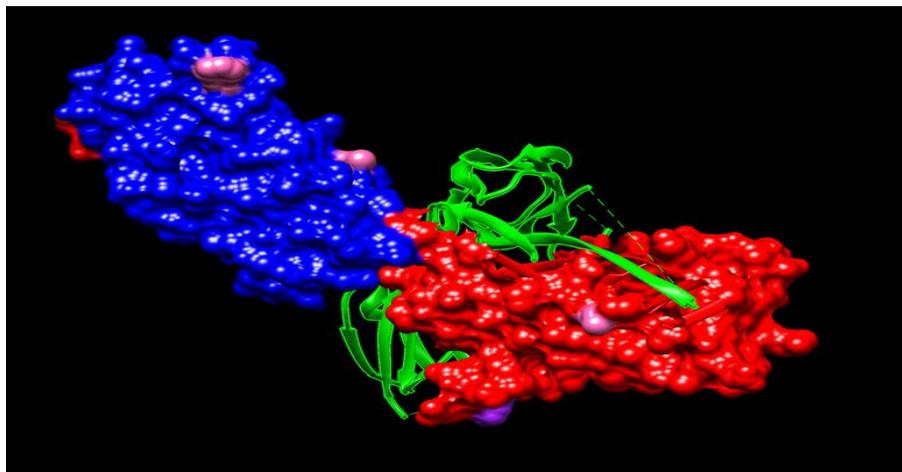
Рисунок 3.3 – График гидрофобности

3.2.2 Компьютерное моделирование третичной структуры изоформ Cafl антигена

Белки с шаперон/ашерной системой секреции образуют на поверхности клетки длинные полимерные пилы. Шаперон стабилизирует мономеры, секретруемые в периплазму, и переносит их на конец растущей полимерной структуры, расположенной в пределах внешнего мембранного белка, который транспортирует возникающие полимеры на поверхность клетки [13, 87, 173]. Таким образом, шапероны помогают складывать субъединицы и отвечают за правильность сборки в конечных органеллах. Биогенез пилей ШАСС зависит также и от интегрального белка наружной мембраны, называемого ашером, который обеспечивает платформу для секреции пилей. Для выхода

белка из клетки в периплазму должны соблюдаться определённые условия: белок не должен спонтанно полимеризоваться, он должен пройти внешнюю мембрану грамотрицательной микробной клетки, полимеризуясь на внешней стороне мембраны, и создать пилеподобные структуры, формирующие капсулу. При этом сами эти структуры должны быть гидрофильными. Непилевые органеллы, такие как капсульный антиген F1, состоят только из одного или двух типов субъединиц и не содержат специализированного адгезина. Тем не менее, большинство из них демонстрируют адгезивные свойства, важные для связывания и/или инвазии клеток [180].

Капсульный антиген F1 чумного микроба *Y. pestis* состоит из линейных волокон Caf1, служит прототипом для непилевых органелл, собранных по шаперон/ашерному пути, и образует комплекс субъединиц (рисунок 3.4): одна субъединица Caf1M и две субъединицы Caf1 [180].



Розовым цветом обозначены области, соответствующие а.о. 48 и 117

Caf1M – ашер (зелёный): субъединица Caf1, формирующая пилеподобную структуру (синий): субъединица Caf1, связанная с шапероном (красный)

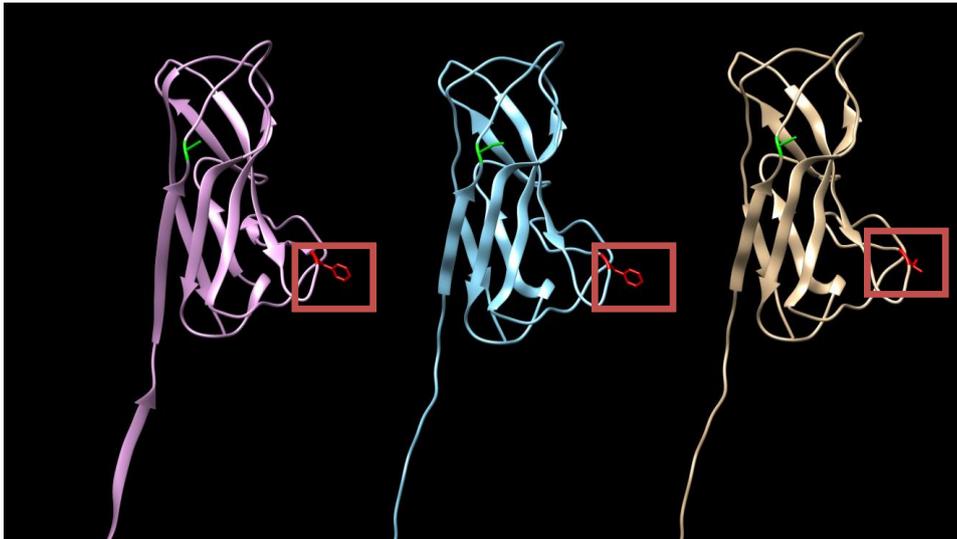
Рисунок 3.4 – Кристаллическая структура комплекса Caf1M:Caf1:Caf1

Y. pestis

Кристаллическая структура комплекса «шаперон-субъединица-субъединица» (Caf1M:Caf1:Caf1), представляет собой минимальное (первичное) волокно капсульного антигена чумного микроба.

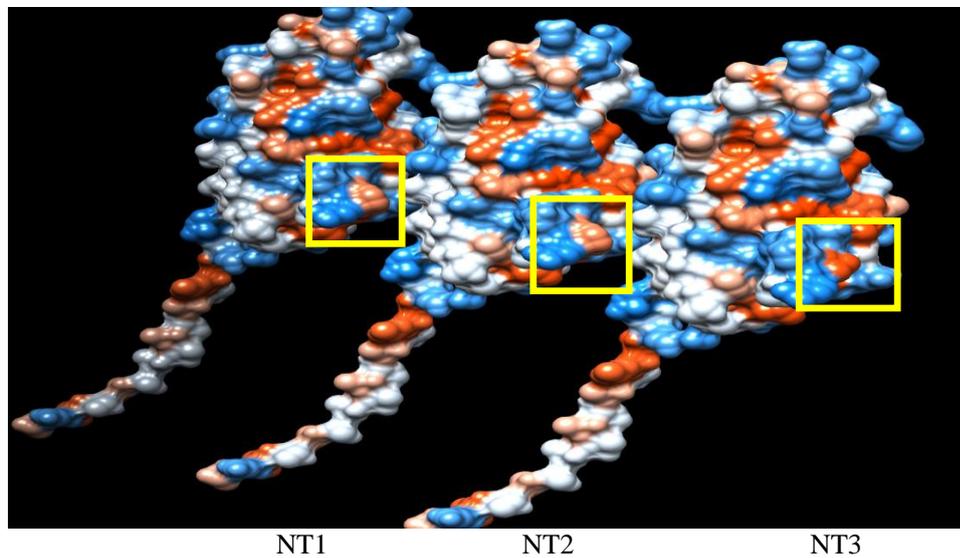
Поиск гомологов Caf1 чумного микроба осуществляли с помощью автоматизированного сервера моделирования гомологии структуры белка Swiss-model, доступного через веб-сервер ExPASy или через программы DeepView (Swiss Pdb-Viewer), используя депонированные в Protein Data Bank (PDB) последовательности. Ближайшим по структуре гомологом к Caf1 *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica* и *ulegeica* являлся депонированный в PDB гетеротример Caf1 - кристаллическая структура нативный шаперон:субъединица:субъединица (Caf1M:Caf1:Caf1), а именно β цепь [178]. При этом идентичность гомолога составила 100 %. С помощью программы UCSF Chimera вычленили β цепь белка. Данный проект стал предполагаемой трёхмерной структурной моделью Caf1_{NT1}. Трёхмерные модели Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} сформировали с помощью сервера Bri-shur.

На рисунках 3.5 и 3.6 показаны пространственные модели трех изоформ белка Caf1 с отличиями в нестабильных аминокислотных позициях. Сформированные предполагаемые модели трех изоформ Caf1 чумного микроба визуально не отличались друг от друга (рисунок 3.6). Единственное отличие отмечено нами в области а.о. 117. В Caf1_{NT3} данная область окрашена в более насыщенный оранжевый цвет, что свидетельствует об увеличении гидрофобных свойств.



Зелёным цветом обозначена позиция а.о. 48; красным – а.о. 117. Розовым обозначен Caf1_{NT1}; голубым - Caf1_{NT2}; жёлтым -Caf1_{NT3}

Рисунок 3.5 – Пространственные модели изоформ капсульного антигена



Жёлтым квадратом выделена область, соответствующая а.о. 117

Рисунок 3.6 – Визуализация анализа молекулярных структур трёх изоформ Caf1

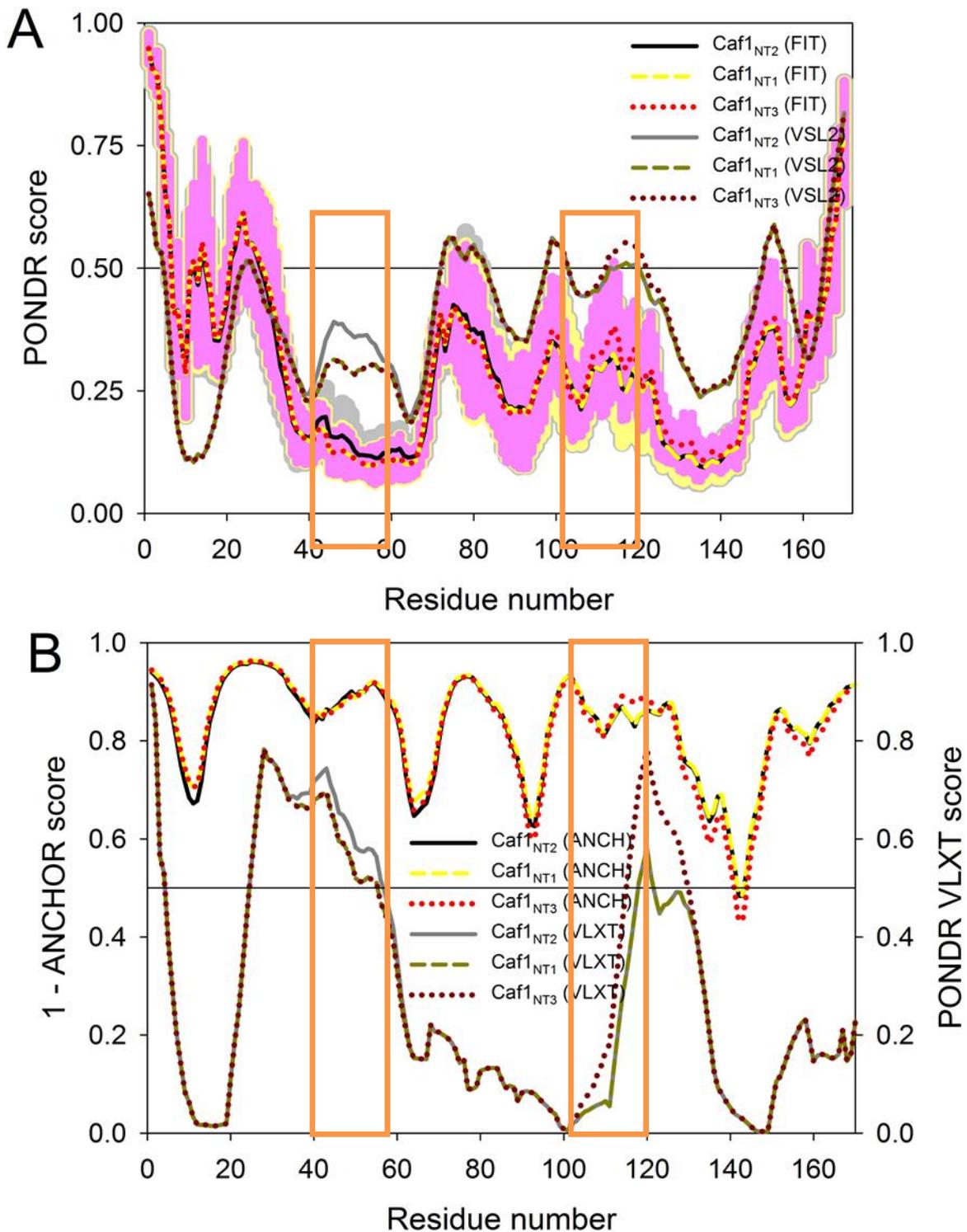
3.2.3 Внутренняя неупорядоченность изоформ Caf1 чумного микроба

Для того, чтобы понять, влияет ли обнаруженный полиморфизм на структурные и функциональные свойства белка Caf1 чумного микроба, оценили склонность к неупорядоченности у трех изоформ Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} и проанализировали эффект произошедших аминокислотных замен на потенциальные области неупорядоченности белка. Профили неупорядоченных областей разных изоформ белка Caf1, полученные путем сравнения с помощью алгоритмов PONDR[®]VSL2 [126] (A), PONDR[®]FIT [169] (A) и PONDR[®]VLXT(B) [140], приведены на рисунке 3.7.

Несмотря на то, что по прогнозам Caf1 является упорядоченным белком, проведенный анализ выявил существование нескольких неупорядоченных областей. Обе аминокислотные замены, найденные в структуре Caf1 (A48 → S48 в Caf1_{NT2} и F117 → V117 в Caf1_{NT3}), вызывают увеличение склонности к внутренней неупорядоченности в местах коротких регионов, их окружающих. Важно отметить, что, хотя последствия произошедших замен не оказывают значительного влияния на внутреннюю неупорядоченность изоформ Caf1, наблюдается согласованность между результатами, полученными с помощью трех вычислительных алгоритмов.

Затем оценили присутствие потенциально неупорядоченных областей связывания в различных изоформах Caf1 с использованием алгоритма ANCHOR [71, 121], который использует следующие критерии: (1) остатки потенциально неупорядоченной области относятся к длинному неупорядоченному сегменту и не являются частью глобулярного домена; (2) остатки такой области не способны образовывать достаточно благоприятные контакты для фолдинга со своими локальными последовательными соседями; (3) эти потенциальные связывающие остатки могут образовывать достаточно благоприятные взаимодействия с глобулярными белками при связывании [71,

120]. Кроме того, данный алгоритм отфильтровывает потенциально неупорядоченные области короче, чем семь аминокислотных остатков. Результаты проведенного анализа представлены на рисунке 3.7 В.



(А) Профили неупорядоченности, полученные при анализе белков с помощью PONDR1VSL2 (Caf1_{NT1} (пунктирная зеленая линия), Caf1_{NT2} (сплошная серая линия) и

Caf1_{NT3} (пунктирная темно-красная линия) и PONDR-FIT (Caf1_{NT1} (пунктирная желтая линия), Caf1_{NT2} (сплошная черная линия) и Caf1_{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.

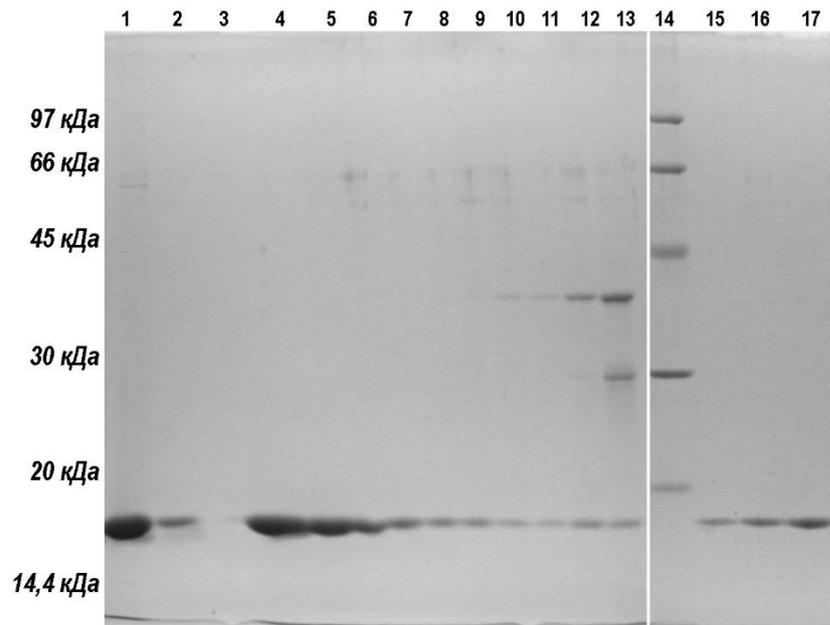
(В) Сравнение профилей неупорядоченности, полученных для изоформ Caf1 с помощью PONDRVLXT (Caf1_{NT1} (пунктирная темно-желтая линия), Caf1_{NT2} (сплошная серая линия) и Caf1_{NT3} (пунктирная темно-красная линия) и основанных на внутренней неупорядоченности взаимодействиях (Caf1_{NT1} (пунктирная желтая линия), Caf1_{NT2} (сплошная черная линия) и Caf1_{NT3} (пунктирная красная линия)), полученные при использовании алгоритма ANCHOR [71, 120]. 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 PONDRVLXT регионы со значением выше 0,5 являются внутренне неупорядоченными, а для профилей ANCHOR регионы с вероятностью ниже 0,5 предсказаны, как регионы связывания.

Рисунок 3.2 – Оценка внутренней неупорядоченности различных изоформ Caf1 *Y. pestis*

Согласно полученным данным, изоформы Caf1_{NT1} и Caf1_{NT2} имеют очень короткий потенциальный сайт связывания (а.о. 142-143), который был отфильтрован с помощью алгоритма из-за его небольшого размера. С другой стороны, замена F117→V117, найденная в Caf1_{NT3}, вызывает расширение этого участка до 4 а.о. (141-144). Так как эта длина находится ниже порогового значения длины, используемой алгоритмом ANCHOR, возможный сайт связывания также был отфильтрован. Из-за короткого размера потенциальных сайтов связываний, предсказать области внутренней неупорядоченности сложно, однако можно заметить, что замена F117→V117 в Caf1_{NT3} влияет на расположение внутренней неупорядоченности. Полученные нами данные о свойствах внутренней неупорядоченности позволяют предположить, что формы белка могут отличаться по физико-химическим свойствам.

3.3 Выделение и очистка изоформ Caf1

Выделение белка Caf1 осуществляли из надосадочной части бульонных культур трех аттенуированных штаммов *Y. pestis* (EV НИИЭГ – изоформа Caf1_{NT1}, С-376 – изоформа Caf1_{NT2} и С-824 - изоформа Caf1_{NT3}) методом гидрофобной хроматографии (рисунок 3.8). На первом этапе изоформы белка Caf1 сорбировали на фенил-сефарозу в присутствии 1 М аммония сернокислого, элюцию белков проводили пропусканием 10-кратного объема раствора соли, концентрацию которой плавно снижали до нуля. При выделении высокоочищенных вариантов белка Caf1 (Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3}) отмечали, что элюирование изоформ Caf1_{NT1} и Caf1_{NT2} происходило в основном в области концентрации сульфата аммония, соответствующей 350 мМ, в то время как элюирование Caf1_{NT3} происходило в широком диапазоне концентраций соли, от 600 до 50 мМ при тех же условиях эксперимента. В дальнейшем, фракции, содержащие Caf1, объединяли, доводили концентрацию сульфата аммония до 1 М и проводили повторно хроматографию, отличающуюся тем, что уже очищенный белок элюировали буфером без сульфата аммония, при этом целевой белок концентрировался и его острый пик собирали в минимальном объеме. Препарат диализовали с заменой следов рабочего буфера на физраствор, а неизбежное разбавление корректировали ультрафильтрацией на мембране УМ-10.



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

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 Caf1_{NT3}, в отличие от замены A48→S48 в изоформе Caf1_{NT2}.

3.4 Заключение по Главе 3

Бактерия *Y. pestis* - факультативный внутриклеточный патоген, который может выживать и размножаться внутри макрофагов [153]. Взаимодействие возбудителя чумы с макрофагами хозяина уже давно считается важным для патогенеза бубонной чумы [52]. Особую роль в тканевой специфичности грамотрицательных бактерий играют связанные с патогенностью поверхностные структуры (пили, фимбрии, капсулы). Caf1 чумного микроба является основным иммунодоминантным компонентом чумных вакцин [67, 84, 93, 185] и основной мишенью для лабораторной диагностики [144].

Недавно было показано, что некоторые штаммы *Y. pestis*, выделенные на территории Грузии и Армении от полевых и их эктопаразитов, обладают NT2 аллелью гена *caf1*, отличающейся от типичной для возбудителя чумы аллели NT1 единичной нуклеотидной заменой, приводящей к замене аланина на серин (A48 →S48) [86, 87, 139]. Наши результаты позволяют утверждать, что данная замена характерна для всех штаммов биовара *caucasica*, циркулирующих на территории Закавказского высокогорного (№ 04-06) и Приараксинского низкогорного (№ 07) природных очагов чумы (рисунок 3.9). Возможно, что подобные штаммы циркулируют и в прилегающих районах Турции и Ирана. В ходе выполнения настоящего исследования обнаружили новый тип Caf1_{NT3} (A48 V117), эндемичный для штаммов Восточно-Кавказского высокогорного очага чумы (№ 39). 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*.

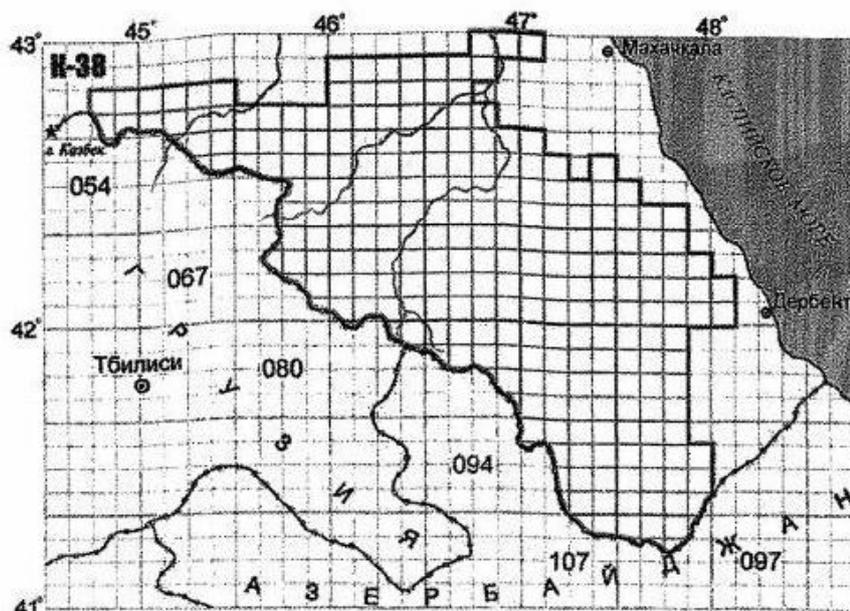


Рисунок 3.9 – Картограмма Восточно-Кавказского природного очага чумы

В последнее время стали появляться экспериментальные работы, свидетельствующие о том, что многие белки не способны образовывать в водном растворе уникальную пространственную структуру, присущую глобулярным белкам, [26]. Эти активные белки при физиологических условиях не имеют жесткой 3D структуры и существуют как динамический ансамбль взаимопревращающихся конформационных структур [161], но при этом являются нативными, то есть способны выполнять присущие им функции [26]. Такие белки назвали «нативно-денатурированными» или «нативно-развёрнутыми» [26], V.N. Uversky [161] называет их «внутренне неупорядоченными белками» (*intrinsically disordered proteins, IDPs*). Следующим немаловажным этапом настоящей работы было сравнение структурно-пространственных свойств Caf1.

В строении белка Caf1 есть внутренне неупорядоченные области, то есть его полипептидная цепь не может образовывать полноценно собранную глобулу. Этот вывод был сделан в ходе настоящего исследования с применением программы PONDR, которая позволяет предсказать частично или пол-

ностью неупорядоченные белки или белковые участки [26]. Проведенный компьютерный анализ показал, что замены A48→S48 и F117→V117, найденные в изоформах Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3}, соответственно, оказывают некоторое влияние на их внутреннюю неупорядоченность. Обе замены вызывают заметное изменение упорядоченности, но только последняя оказывает влияние на интерактивность белка. Даже в этом случае, изменения, вызванные ростом интерактивности, минимальны. Однако 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. Кроме того, формирование предполагаемых трехмерных моделей трех изоформ Caf1 *Y. pestis* продемонстрировало увеличение гидрофобных свойств Caf1_{NT3}, вызванных заменой F117→V117.

В последние годы выполнено значительное количество исследований, направленных на поиск потенциальных иммуногенных центров капсульного антигена, ответственных за индукцию протективного иммунного ответа. Попытки выявить *in silico* локализацию В- и Т-клеточные эпитопов в аминокислотной последовательности Caf1, выполненные к началу настоящего исследования, предоставили конфликтующие между собой данные [102, 123, 160, 182]. Было обнаружено, что Caf1 обладает высокой степенью гомологии с антагонистом рецептора IL-1 (IL-1ra). При сравнении авторы обнаружили 28 %-ную идентичность одного из регионов белка Caf1 (29 а.о.) при вероятности случайного совпадения равной 4×10^3 [80]. Но при этом Caf1 *Y. pestis* не имеет IL-1ra-подобной активности [110]. По данным V. Zav'yalov *et al* [182] основной В-клеточный эпитоп данного белка находится на гидрофильной петле в области а.о. 72-95, а два Т-клеточных эпитопа расположены в С-концевых областях доменов (а.о. 51-71 и а.о. 129-149). Напротив, H. Neubauer *et al.* [123] обнаружили, что как минимум два линейных В-клеточных эпитопа расположены на С-концевом участке Caf1 и предположили наличие у кап-

сульного антигена как минимум одного конформационного В-клеточного эпитопа. Позднее J.A. Musson *et al* [122] исследовали четыре CD4-клеточных эпитопа Caf1: два эпитопа, расположенных в карбокситерминальном домене глобулы (а.о. 134-147 и а.о. 123-136), третий эпитоп, находящийся на неструктурированном N-концевом участке (а.о. 7-20) белка, четвертый эпитоп (а.о. 48-61) локализованный между данными двумя регионами Caf1. В целом, результаты, представленные в данной работе, согласуются с моделью последовательного разворачивания и расщепления гCaf1 с N-конца во время прохождения эндосомального пути антигенпрезентирующих клеток. Другие авторы обнаружили в Caf1 четыре В-клеточных эпитопа: В1 (а.о. 105-123), В2 (а.о. 142-165), В3 (а.о. 96-106), В4 (а.о. 141-154), и два Т-клеточных эпитопа: Т1 (а.о. 123-137), Т2 (а.о. 137-148) с главным иммунодоминантным эпитопом а.о. 142–165 [88].

Этап выделения и очистки изоформ капсульного антигена чумного микроба, необходимый для дальнейшей работы, проводили с помощью гидрофобной хроматографии. Хроматография – это метод разделения и определения веществ, основанный на разделении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. В свою очередь гидрофобная хроматография основана на свойстве гидрофобности белков. Белки, содержащие на поверхности гидрофобные аминокислоты, могут обратимо связываться с гидрофобными группами сорбента [12]. Поведение капсульного антигена во время гидрофобной хроматографии тоже имело отличия: пик элюирования изоформы Caf1_{NT3} распределился между градиентом сульфата аммония 600 и 50 мМ, в то время как изоформы Caf1_{NT1} и Caf1_{NT2} достигли максимума при 350 мМ.

Таким образом, все три изоформы капсульного антигена чумного микроба имеют молекулярно-генетические, структурно-пространственные и физико-химические отличия. Изучение влияния данного полиморфизма на иммуногенную активность, в том числе и перекрестную, штаммов с различными вариантами Caf1 антигена явилось целью следующего раздела нашего исследования.

ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ТРЁХ ИЗО- ФОРМ CafI *Y. pestis*

К моменту начала настоящего исследования было установлено, что изоформа CafI_{NT1} *Y. pestis* защищает бактерию от фагоцитоза [52] и истощает систему комплемента путем избирательной активации компонентов C`2 и C`4, таким образом, предотвращая опосредованную комплементом опсонизацию микробных клеток [168]. Кроме того, общепризнано, что CafI_{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 чумы [66, 67, 77, 135, 136]. Однако до настоящего времени не известно могут ли штаммы, несущие NT2 и NT3 аллели гена *cafI*, преодолеть протективный иммунитет, опосредованный изоформой CafI_{NT1}, а также способны ли существующие методы иммуноанализа обнаруживать чумной микроб с аллелями *cafI* гена.

Задачей настоящего этапа исследования явилась оценка перекрестной серологической активности и перекрестной протективности изоформ CafI.

4.1 Перекрёстная серологическая активность

Перекрёстную серологическую активность трех изоформ Caf1 *Y. pestis* (Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3}) оценивали в иммунохроматографическом тесте с использованием набора реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ тест *Yersinia pestis*» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и иммуноферментом анализе с применением тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной «ИФАПестФ1- М» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов).

Иммунохроматографические тест-полоски с одинаковой эффективностью выявляли три варианта белка (рисунок 4.1). Лимит детекции Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} составил 1,0 нг/мл.



Для всех изоформ капсульного Аг результат был идентичным

Рисунок 4.1 – Результат теста с использованием набора реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ тест *Yersinia pestis*» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск)

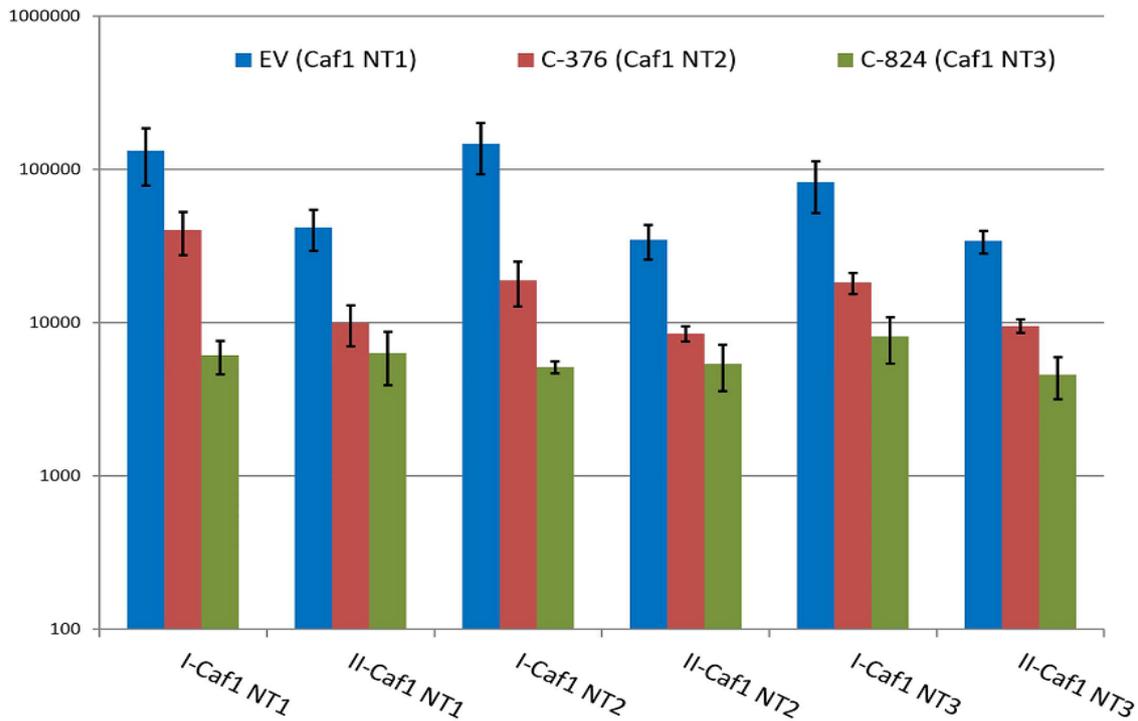
Иммуноферментная моноклональная тест-система для детекции чумного микроба с одинаковой эффективностью выявляла все три изоформы капсульного антигена. Чувствительность метода по обнаружению белков составила $(19 \pm 1,0)$ нг/мл, что согласно пропорции пересчета, прилагаемой в инструкции к набору, приблизительно соответствовало 4×10^3 м.к./мл чумного микроба.

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 (рисунок 4.2). Гуморальный иммунный ответ у животных, индуцированный введением изоформы Caf1_{NT3}, был самым низким.

После повторной иммунизации во всех трех случаях титры антител против капсульного антигена были более низкими, чем после первого введения. Вероятно, это связано со сроками забора крови у животных после повторной вакцинации (43 сут по сравнению с 29 сут). Возможно, после повторного введения антигенов высокие титры антител постепенно снизились к 43 сут наблюдения.

На следующем этапе работы проводили сравнительную оценку перекрестной протективности исследуемых препаратов.

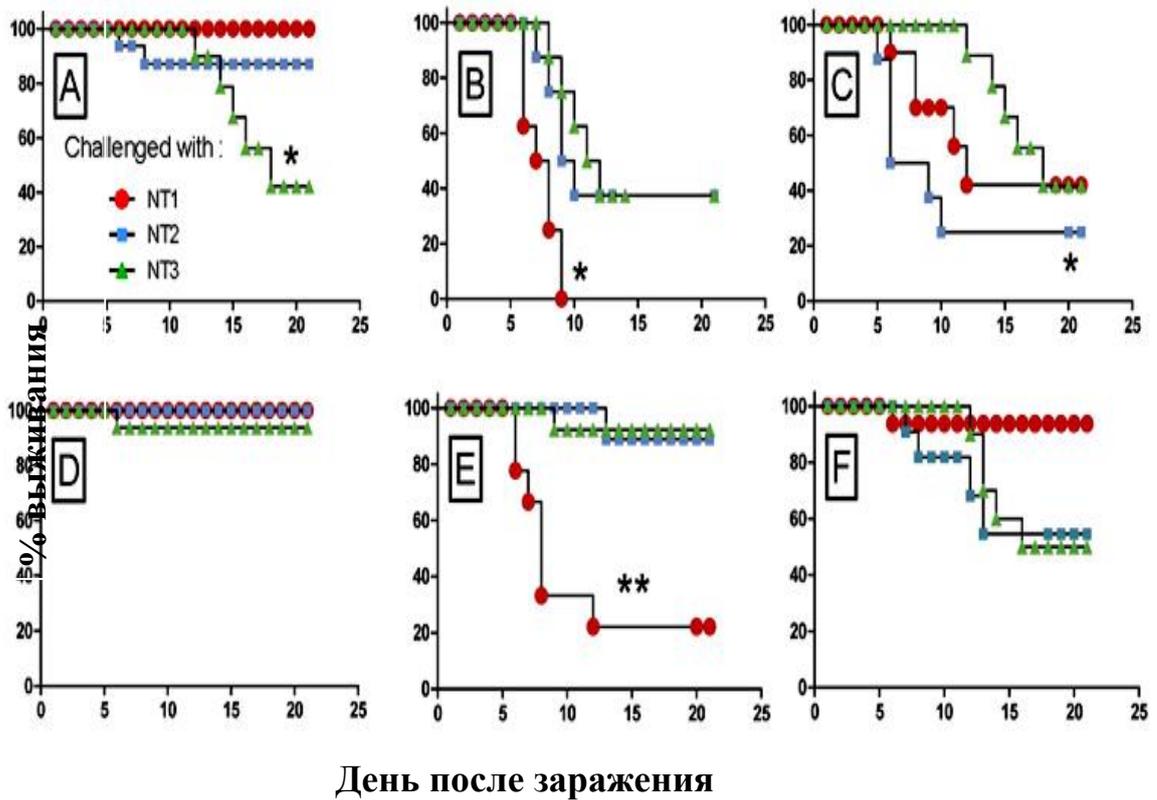


Мышей иммунизировали Caf1_{NT1} (синие столбцы), Caf1_{NT2} (красные столбцы) или Caf1_{NT3} (зеленые столбцы), кровь забирали: (I) на 29 день после первой иммунизации и (II) на 43 день после второй иммунизации; антительный ответ определяли в ИФА против изоформ NT1, NT2 и NT3. Данные представляют собой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

Рисунок 4.2 – Перекрёстная серологическая активность изоформ Caf1

4.2 Перекрёстная протективность

Результаты определения перекрёстной протективности препаратов Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} приведены на рисунке 4.3 и в таблице 4.1. Поскольку при подкожном заражении мышей штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 ($LD_{50} = 10$ КОЕ) превосходит по вирулентности штаммы *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *caucasica* C-376 и C-824 ($LD_{50} = 5.0 \times 10^2$ КОЕ и $LD_{50} < 2.0 \times 10^3$ КОЕ, соответственно), заражающие дозы выравнивали. Животным вводили равное количество LD_{50} (от $2 LD_{50}$ до $2 \times 10^3 LD_{50}$).



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 подкожно (n = 8 BALB/c).

*P < 0.05; **P < 0.01 (Log-rankMantel-Coxtest).

Рисунок 4.3 – Выживаемость иммунизированных мышей после подкожного введения высоких (2000 LD₅₀ панели A-C) и низких (200 LD₅₀, панели D-F) заражающих доз *Y. pestis*

Таблица 4.1—Показатели напряженности иммунитета, индуцированного введением трех изоформ Caf1 антигена

Заражающий штамм <i>Y.pestis</i>	Мыши после введения Al(OH) ₃		Мыши, вакцинированные Caf1								
			EV (Caf1 _{NT1})			C-376 (Caf1 _{NT2})			C-824 (Caf1 _{NT3})		
	LD ₅₀ (КОЕ)	средние сроки гибели (сут)*	LD ₅₀ (КОЕ)	средние сроки гибели (сут)*	ИИ	LD ₅₀ (КОЕ)	средние сроки гибели (сут)*	ИИ	LD ₅₀ (КОЕ)	средние сроки гибели (сут)*	ИИ
231 (Caf1 _{NT1})	6 (1 ÷ 22)	4,6 ± 0,6	> 3,2 × 10 ⁴	но	> 5334	562 141 ÷ 2,2 × 10 ³	9,2 ± 1,0	94	3,2 × 10 ³ (7,9 × 10 ² ÷ 1,3 × 10 ⁴)	7,7 ± 1,4	527
C-376 (Caf1 _{NT2})	178 (45 ÷ 708)	7,8 ± 1,3	7,1 × 10 ⁵ (2,2 × 10 ⁵ ÷ 5,6 × 10 ⁶)	6	3996	2,2 × 10 ⁵ (5,6 × 10 ⁴ ÷ 1,1 × 10 ⁶)	9,3 ± 1,4	1264	4,0 × 10 ⁴ 1,0 × 10 ⁴ ÷ 1,6 × 10 ⁵	7,8 ± 1,3	225
C-824 (Caf1 _{NT3})	10 ³ (251 ÷ 3987)	6,3 ± 1,0	1,1 × 10 ⁶ (2,8 × 10 ⁵ ÷ 5,6 × 10 ⁷)	12,0 ± 2,7	1125	1,1 × 10 ⁶ 2,8 × 10 ⁵ ÷ 5,6 × 10 ⁷	9,3 ± 1,0	1125	2,0 × 10 ⁶ 5,0 × 10 ⁵ ÷ 1,3 × 10 ⁷	13	2000

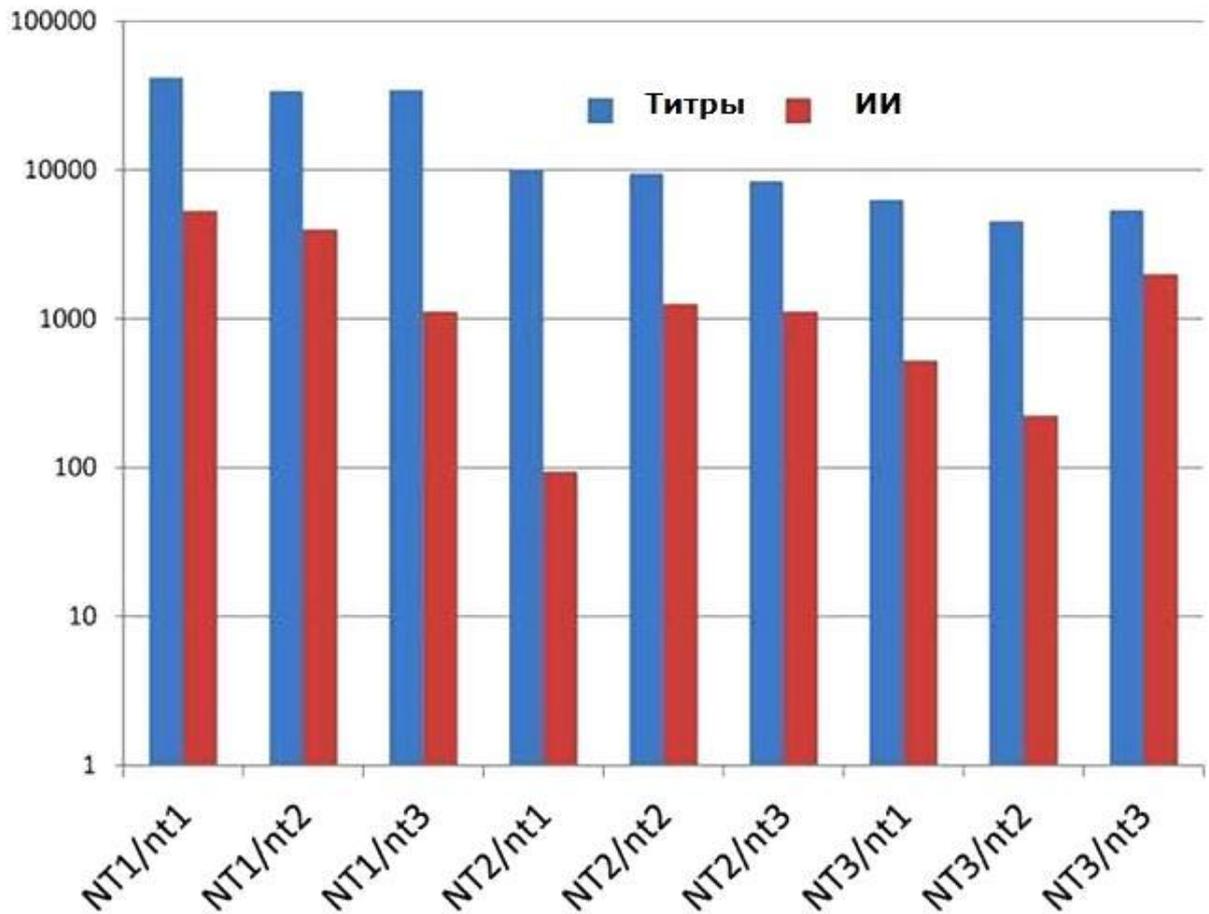
* Значения указаны как среднее ± стандартное отклонение и доверительный интервал для вероятности 95%

н.о., не определялось

По нашим данным изоформа Caf1_{NT1} , которая традиционно используется в коммерческих и экспериментальных вакцинных препаратах, обладала наилучшими протективными свойствами и обеспечивала 100 %-ную защиту для двукратно вакцинированных мышей, зараженных 2000 LD_{50} штамма *Y. pestis* 231; 85 %-ную защиту при заражении штаммом *Y. pestis* С-376 и 40 %-ную защиту от штамма *Y. pestis* С-824 (рисунок 4.3). 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* С-376 и С-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 LD_{50} , 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, вакцинированные только гидроокисью алюминия, пали в течение первой недели после введения бактериальных штаммов.

Уровень защиты животных после двукратного подкожного введения изоформы Caf1_{NT1} и заражения штаммом, экспрессирующим Caf1_{NT1} , превысил показатель контрольной группы (мыши после введения гидроокиси алюминия) в 5334 раза. Индексы иммунитета после вакцинации двумя другими изоформами Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} и заражения одноименным штаммом *Y. pestis* С-376 и С-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 иммунизацию двумя другими изоформами.

Корреляция между титрами анти-Caf1 антител в сыворотке крови животных после вакцинации и индексом иммунитета представлена на рисунке 4.4.



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

Рисунок 4.4 – Корреляция между титрами антител в сыворотке крови животных и индексом иммунитета

4.3 Заключение по Главе 4

По данным целого ряда исследователей препараты Caf1 с аминокислотной последовательностью, характерной для штаммов *Y. pestis* основного подвида, обладают способностью индуцировать напряженный противочумный иммунитет у белых мышей, крыс, морских свинок, приматов, человека [8, 112, 129, 166].

В настоящем исследовании напряженность иммунитета, т.е. способность вакцинного препарата предохранять животное от гибели при заражении массивными дозами вирулентной культуры, характеризовали по индексу иммунитета. Этот показатель отражает разницу в инфицирующей дозе, необходимой для гибели иммунизированных животных, по сравнению с аналогичным показателем для интактных (таблица 4.1). Подобные данные были получены из анализа графика выживаемости животных (рисунок 4.3). Принимая во внимание, что в инфицированной блохе может содержаться до 5000 КОЕ *Y. pestis*, но в среднем при трансмиссивном пути млекопитающему передаётся около 80 КОЕ [117], можно прогнозировать, что иммунитет, индуцированный изоформой Caf1_{NT1}, достаточен для защиты при укусах блох, несущих низкую дозу возбудителя, от инфекции, вызванной не только штаммами с той же изоформой, но и от изолятов, продуцирующих Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} варианты. Тем не менее, уровень перекрестной защиты может оказаться не всегда достаточными в случае инфицирования высокими дозами штаммов с Caf1_{NT2} или Caf1_{NT3}.

Выявленный в ИФА уровень титров анти-Caf1 антител положительно коррелировал с индексом иммунитета (рисунок 4.4). Например, индекс иммунитета 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 типами Caf1_{NT2} или Caf1_{NT3}, наблюдали более низкий индекс иммунитета и

более низкую иммунореактивность сывороток по результатам ИФА (рисунок 4.4).

Все тестируемые изоформы белка Caf1 показали высокую степень перекрёстной серологической активности, о чём судили по иммунохроматографии и иммуноферментному анализу, 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.

Полученные результаты принципиально важны с точки зрения биологической безопасности, так как прямо отвечают на вопрос о способности Caf1_{NT1}-специфичного иммунитета, индуцированного коммерческими чумными вакцинами, защищать от гибели при заражении вирулентными штаммами чумного микроба, экспрессирующими Caf1 типов NT2 или NT3. Напряженность такого иммунитета достаточно высока для защиты от *Y. pestis* с нетипичными формами капсульного антигена. Мы можем прогнозировать, что иммунитет, индуцированный изоформой Caf1_{NT1}, достаточен для надежной защиты организма при заражении штаммами с изоформами Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} в дозах, соответствующих таковым при укусе блохи.

ГЛАВА 5 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 [75]. Геном чумного микроба содержит 10 кластеров генов, относящихся к шаперон/ашерным системам секреции (рисунок 1.4). 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 [1]. 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* [75; 90]. Однако данные о наличии полиморфизма у белков ШАСС штаммов чумного микроба, относящихся к различным филогенетическим группам, до начала настоящего исследования отсутствовали.

Целью настоящего раздела диссертационного исследования явился поиск вариабельности шаперон/ашерных систем секреции изолятов *Y. pestis* относящихся к различным SNP-типам, а также сравнение аминокислотных последовательностей продуктов генов ШАСС *Y. pestis* КИМ10+ с продуктами генов гомологичных ШАСС референтного штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953. Полногеномные последовательности штаммов большинства биоваров неосновного подвида *Y. pestis* к моменту начала настоящего исследования в международной базе данных GenBank отсутствовали. Исходя из этого, было принято решение провести полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* всех биоваров относящихся к подвиду *microti*, и депонировать полученные последовательности в базе данных, доступной на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

5.1 Полногеномное секвенирование штаммов чумного микроба, отличающихся по продуцируемым изоформам капсульного антигена

В данном исследовании провели секвенирование 19-ти штаммов *Y. pestis* подвида *microti* шести биоваров: *ulegeica*, *caucasica*, *xilingolensis*, *hissarica*, *talassica*, *altaica*, выделенных на территории различных природных очагов чумы. Информация о выбранных штаммах с присвоенными им названиями в GenBank, а также информация о проведении секвенирования представлена в таблице 5.1 [104].

В результате секвенирования получили полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов *Y. pestis* неосновного подвида, отличающихся по изоформам Caf1: **Caf1_{NT1}** – bv. *talassica* A-1804 и A-1807, циркулирующие в Таласском высокогорном природном очаге чумы; bv. *altaica* I-3455 и A-513 из Алтайского горного очага; bv. *ulegeica* I-3189, I-2422, I-2239 из Гурван-Сайханского M13, Бухен-Ульского M02 и Сайлюгемского очага чумы M01, соответственно; bv. *xilingolensis* I-3134, выделенного на территории Баян-Хонгорского аймака M20, bv. *hissarica* 5307-Gis из Гиссарского очага; **Caf1_{NT2}** – штаммы bv. *caucasica* C-590, C-290, C-197, C-235, C-267, C-359, C-291, C-346, C-666, выделенных в Закавказском высокогорном очаге, включающем мезоочаги Ленинаканский горный (04), Присеванский горный (05) и Зангезуро-Карабахский горный (06) и Приараксинском низкогорном очаге песчаночьего типа (07); **Caf1_{NT3}** – bv. *caucasica* C-537, изолированного в Восточно-Кавказском высокогорном очаге чумы (39).

Всего было выполнено 7 запусков, штаммам присваивали соответствующие баркоды–индексы (идентификационные номера) (таблица 5.1). Некоторые штаммы были секвенированы дважды для повышения качества выходных данных.

Таблица 5.1 – Основная информация о запусках полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis*

Название штамма	Название штамма ГКПМ-Оболенск	Изоформа <i>CafI</i>	SNP-тип	Количество запусков	№ запуска	№ бар-кода
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>caucasica</i>						
C-537	SCPM-O-B-6904	NT3	0.PE2	2	1,3	18
C-590	SCPM-O-B-7761	NT2	0.PE2	1	1	19
C-290	SCPM-O-B-6990	NT2	0.PE2	1	3	27
C-197	SCPM-O-B-6974	NT2	0.PE2	2	4,5	24
C-235	SCPM-O-B-6757	NT2	0.PE2	2	4,5	31
C-267	SCPM-O-B-6984	NT2	0.PE2	2	4,5	32
C-359	SCPM-O-B-7832	NT2	0.PE2	2	6,7	20
C-291	SCPM-O-B-6300	NT2	0.PE2	1	6	18
C-346	SCPM-O-B-6536	NT2	0.PE2	1	7	28
C-666	SCPM-O-B-6540	NT2	0.PE2	1	7	23
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>talassica</i>						
A-1804	SCPM-O-B-7019	NT1	0.PE4	2	1,5	25
A-1807	SCPM-O-B-7074	NT1	0.PE4	1	3	26
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>altaica</i>						
I-3455	SCPM-O-B-7812	NT1	0.PE4	1	2	30
A-513	SCPM-O-B-7075	NT1	0.PE4	1	5	1
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>ulegeica</i>						
I-3189	SCPM-O-B-6706	NT1	0.PE5	1	6	26
I-2422	SCPM-O-B-6906	NT1	0.PE5	2	3,4	21
I-2236	SCPM-O-B-6213	NT1	0.PE5	1	7	31
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>xilingolensis</i>						
I-3134	SCPM-O-B-6216	NT1	0.PE4	1	1	22
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>hissarica</i>						
5307-Gis	SCPM-O-B-6304	NT1	0.PE4	1	1	23

В результате процесса одного из запусков полногеномного секвенирования (для примера взят 4-й запуск) произошла загрузка чипа микросферами на 60 % (рисунок 5.1), из них 82 % – клональные и 18 % – поликлональные, а средняя длина ридов составила 273-3630 п.н. (рисунок 5.2). Качество черновых ридов оценили с помощью программы NextGen Sequence Workbench v 3.2.3 (рисунок 5.3).

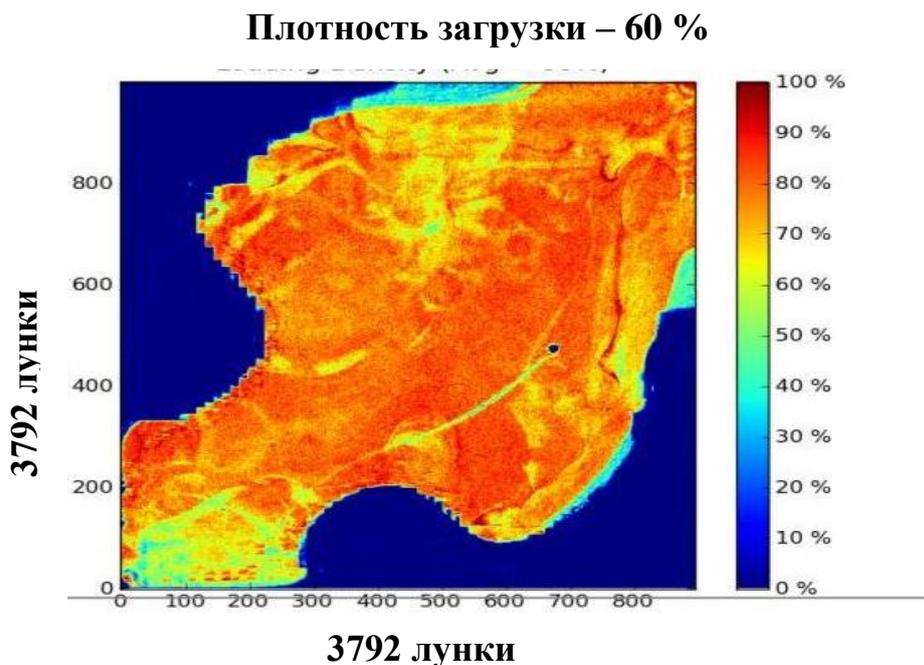


Рисунок 5.1 – Эффективность загрузки чипа Ion 318™ Chip v2 микросферами при секвенировании штаммов *Y. pestis* в 4-ом запуске

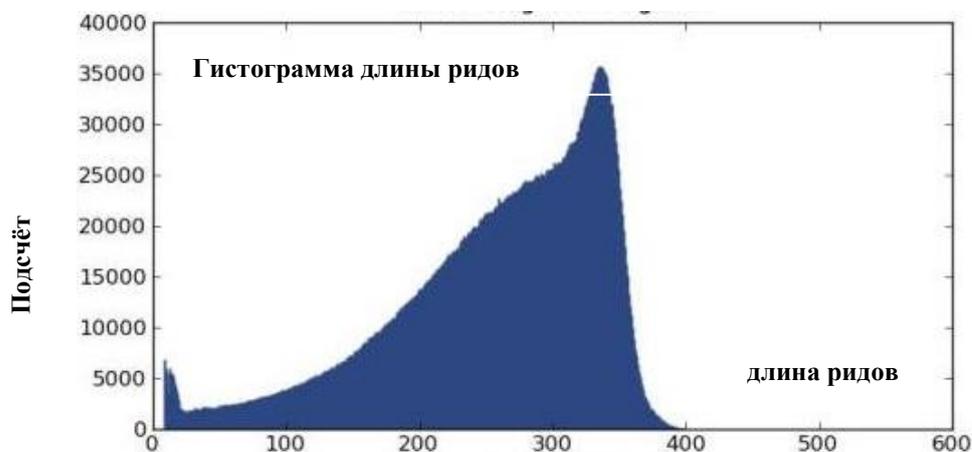


Рисунок 5.2 – Распределение количества прочтений от длины рида при секвенировании штаммов *Y. pestis* в 4-ом запуске

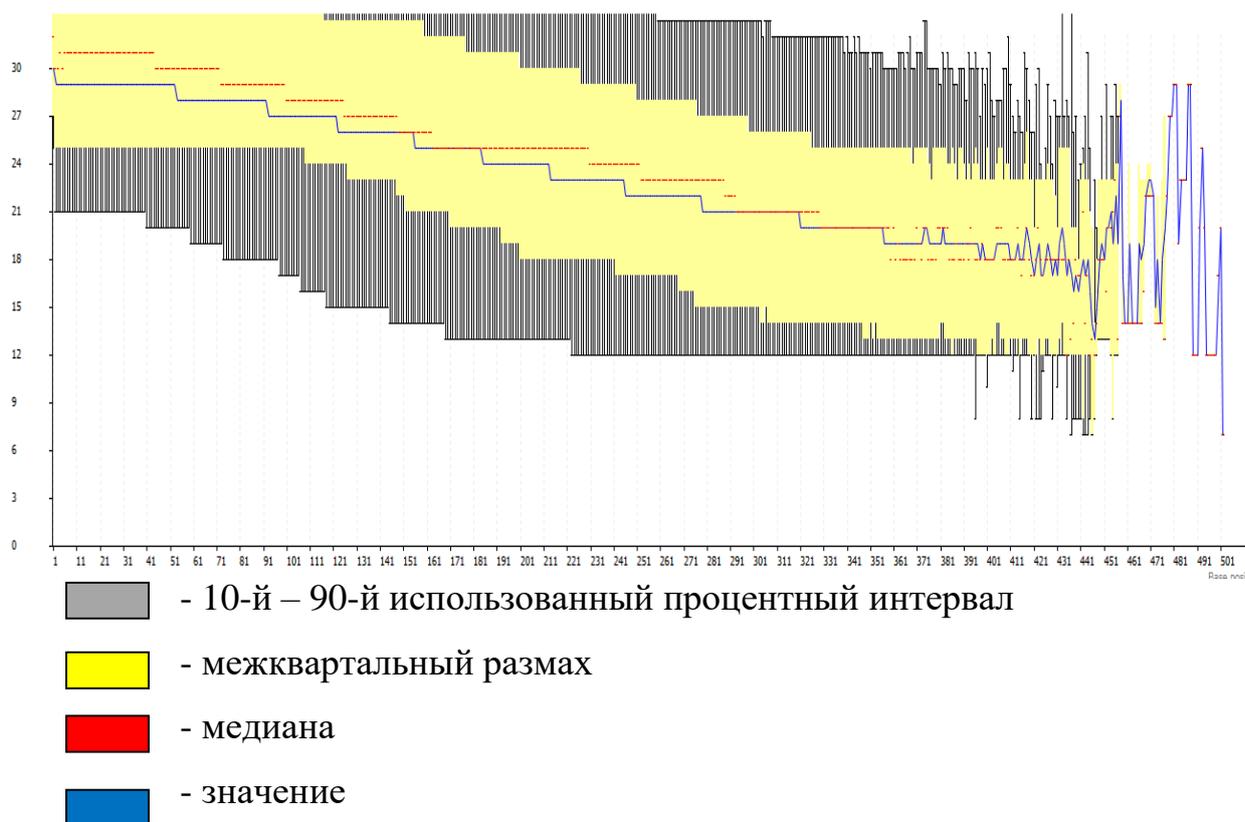


Рисунок 5.3 – Качество ридов, полученных в ходе полногеномного секвенирования, штамма *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *caucasica* C-235 (B-6757)

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 соответствовало полному геному возбудителя чумы. Каждый геном содержал от 3711 до 4008 кодирующих последовательностей (таблица 5.2). Во всех исследуемых штаммах удалось реконструировать последовательности десяти ШАСС.

Таблица 5.2 – Идентификационная информация и базовая статистика по сборкам и аннотациям штаммов *Y. pestis*

Название штамма	Очаг	Изоформа Caf1	№ исходных данных	№ сборки GenBank	Размер (п.н.)	Кол-во контингов	Кол-во генов	Плазмиды		
								pMT	pCD	pPCP
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>caucasica</i>										
C-537	39	NT ₃	SRR2094286,SRR2094287	LIYP00000000	4510568	190	4203	+	+	-
C-590	4	NT ₂	SRR2094294	LIYQ00000000	4560303	207	4249	+	+	-
C-290	4	NT ₂	SRR2094306	LIYU00000000	4561770	180	4245	+	+	-
C-197	6	NT ₂	SRR2124156,SRR2124157	LIYX00000000	4522840	270	4255	+	+	-
C-235	7	NT ₂	SRR2124162,SRR2124163	LIYY00000000	4554747	228	4253	+	+	-
C-267	6	NT ₂	SRR2124165,SRR2124167	LIYZ00000000	4555511	231	4251	+	+	-
C-359	5	NT ₂	SRR2124169,SRR2124170	LIZB00000000	4557841	205	4265	+	+	-
C-291	7	NT ₂	SRR2124185	LIZC00000000	4559661	202	4250	+	+	-
C-346	4	NT ₂	SRR2124186	LIZE00000000	4560069	204	4243	+	+	-
C-666	5	NT ₂	SRR2124207	LIZF00000000	4559559	183	4247	+	+	-

Продолжение таблицы 5.2

<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>talassica</i>										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A-1804	40	NT ₁	SRR2124154, SRR2124155	LIYW00000000	4626244	275	4308	+	+	+
A-1807	40	NT ₁	SRR2094300	LIYT00000000	4565589	207	4237	+	+	+
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>altaica</i>										
I-3455	36	NT ₁	SRR2094311	LIYV00000000	4575487	223	4261	+	+	+
A-513	36	NT ₁	SRR2124168	LIZA00000000	4595298	229	4,263	+	+	+
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>ulegeica</i>										
I-3189	M13	NT ₁	SRR2093957	LIYO00000000	4636832	189	4281	+	+	+
I-2422	M02	NT ₁	SRR2124208, SRR2124209	LIZG00000000	4520537	341	4212	-	+	+
I-2239	M01	NT ₁	SRR2511857	LIZD00000000	4636905	189	4288	+	+	+
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>xilingolensis</i>										
I-3134	M20	NT ₁	SRR2094295	LIYR00000000	4587862	230	4255	+	+	+
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>hissarica</i>										
5307- Gis	34	NT ₁	SRR2094296	LIYS00000000	4531080	209	4169	+	-	+

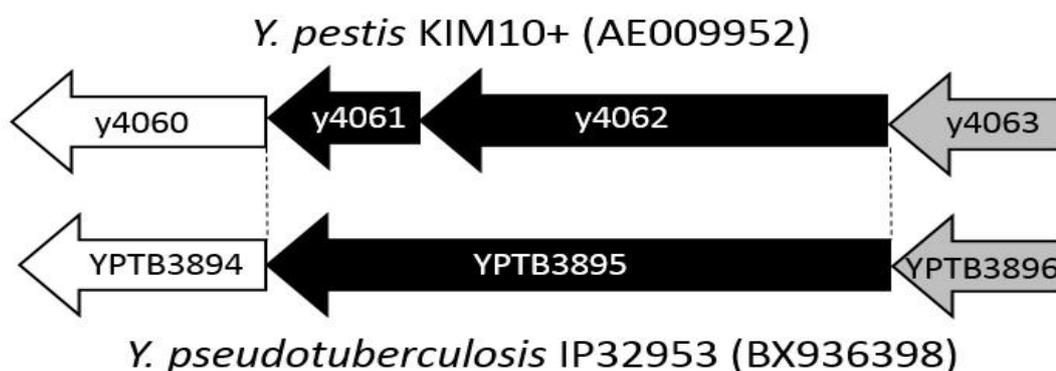
5.2 Вариабельность шаперон/ашерных систем секреции у штаммов *Y. pestis* различных SNP-типов

Помимо ШАСС *cafI* по данным М. Natkoff *et al.* [90] у *Y. pestis* имеется ещё 9 аналогичных систем секреции IV типа, кодируемых кластерами генов: *y0348-y0352*; *y0561-y0563*; *y1539-y1544*; *y1858-y1862*; *y1869-y1873*; *y2388-y2392*; *y3478-y3480*; *y4060-y4063* и *psaEFABC*. Известно, что в процессе дивергенции от *Y. pseudotuberculosis* [31, 32] в геноме *Y. pestis* произошли изменения, которые привели к утрате/повреждению генов, продукты которых оказались избыточными после смены экологической ниши [125], а также к изменениям аминокислотной последовательности продуктов ряда генов, способствовавшим возникновению эпидемических/пандемических штаммов [69, 82, 90], и/или к нарушениям процессов транскрипции генов. В этом разделе нашей работы провели анализ вариабельности аминокислотных последовательностей белков, входящих в состав вышеперечисленных систем секреции штаммов *Y. pestis* различных внутривидовых групп. В качестве исходных последовательностей использовали таковые из штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953, который часто играет роль «предшественника» при построении филогенетического дерева *Y. pestis*. В ходе выполнения данной работы акцент был сделан на поиск несинонимичных нуклеотидных замен, ведущих к изменению кодируемой аминокислоты. Результаты сравнения аминокислотных последовательностей штаммов *Y. pestis* различных SNP-типов, кодируемых кластерами ШАСС, отражены в таблице 5.3.

В кластере *y1539-y1544* штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* KIM10+ продукт гена *y1543* (ашер) нарушен вставкой IS285, поэтому предположительно не функционирует. Данное изменение наблюдали у штаммов *Y. pestis* всех SNP-типов.

Кластер *Y. pestis y4060-y4063* включает 4 гена: *y4060* – субъединица, *y4061* – ашер, *y4062* – ашер, *y4063* – шаперон, а у *Y. pseudotuberculosis* в го-

мологичном участке имеется всего 3 гена: *YPTB3894* – субъединица, *YPTB3895* – ашер, *YPTB3896* – шаперон. Предположительно, в ходе эволюции в последовательности гена *YPTB3895* (832 а.о.) возбудителя псевдотуберкулеза единичные нуклеотидные замены привели к формированию стоп-кодона и образованию второй рамки считывания (рисунок 5.5). Вероятно, продукты двух открытых рамок считывания *y4061* (211 а.о.) и *y4062* (609 а.о.) не могут образовывать полноценно функционирующий ашер. Так как в данном кластере у штаммов *Y. pestis* всех SNP-типов имеются два гена *y4061* и *y4062*, то можно предположить, что данное изменение произошло на ранних стадиях дивергенции *Y. pestis*.



Белые стрелки – белки субъединицы; чёрные – белки ашеры; серые – белки шапероны

Рисунок 5.4 – Сравнение кластеров генов ШАСС *y4060*-*y4063* *YPTB3894*-*YPTB3896* штамма *Y. pestis* KIM10+ и *Y. pseudotuberculosis* IP32953

На рисунках 5.5 (а-і) изображены схемы филогенетических деревьев представителей основного и неосновного подвидов *Y. pestis*, отличающихся по исследуемым генам ШАСС. Филогенетические деревья были построены на основе данных SNP-типирования штаммов чумного микроба [120].

Аминокислотная последовательность продуктов генов, входящих в кластеры *y0348*-*y0352* и *psaEFABC* у штаммов чумного микроба разных SNP-типов была идентичной. Кластеры *y1858*-*y1862* и *y1869*-*y1873* у большинства

представителей также являлись высококонсервативными. В продукте гена *y1858* (ашер) у штамма Angola (0.РЕ3) в позиции 526 обнаружили единственную аминокислотную замену аргинина на гистидин (526R→H) (рисунок 5.5 а). Аргинин - аминокислота с полярным заряженным положительно алифатическим гидрофильным радикалом заменилась на гистидин - аминокислоту с полярным заряженным положительно гетероциклическим гидрофильным радикалом.

У штаммов 0.РЕ7 в позиции 178 в N-концевом домене продукта гена *y1871*(ашер) произошла замена глицина на аспарагиновую кислоту (178G→D). Глицин - аминокислота с неполярным алифатическим гидрофобным радикалом заменилась на аспарагиновую кислоту - аминокислоту с полярным заряженным отрицательно алифатическим гидрофильным радикалом.

У представителя 2.ANT – штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* Nepal 516 в позиции 167 выявили замену аргинина на цистеин (167R→C) (рисунок 5.5 б). Аргинин - аминокислота с полярным заряженным положительно алифатическим гидрофильным радикалом заменилась на цистеин - серосодержащую аминокислоту с полярным незаряженным алифатическим гидрофильным радикалом.

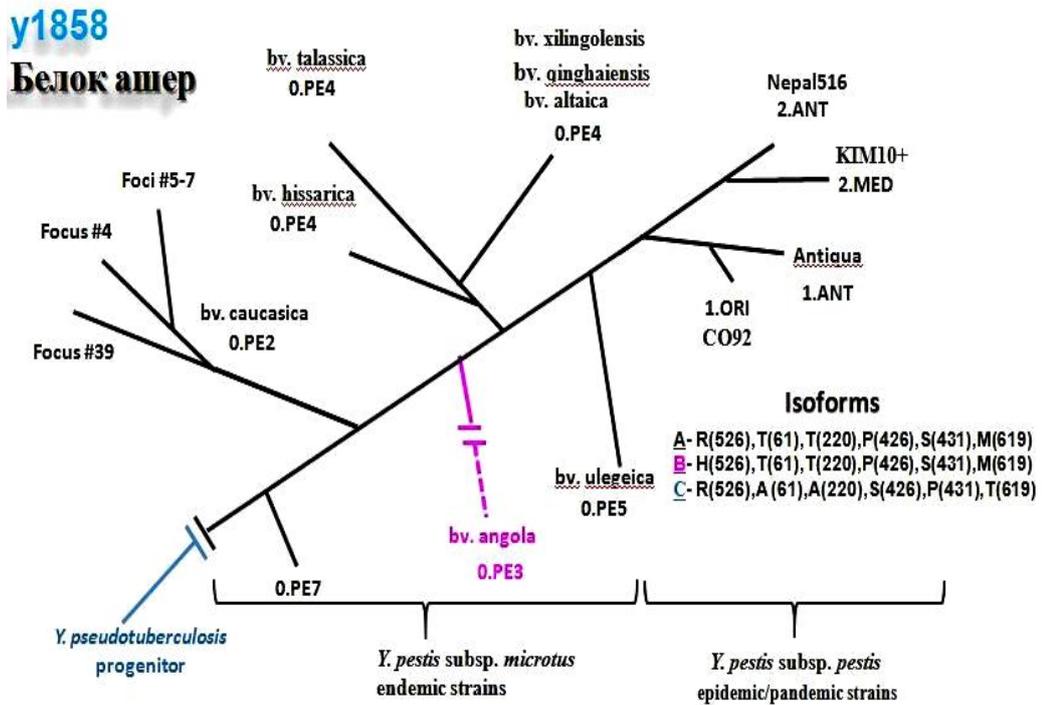


Рисунок 5.5 (а) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвидов *Y. pestis*, построенная для анализа продукта гена *y1858*, окрашенная по найденным отличиям

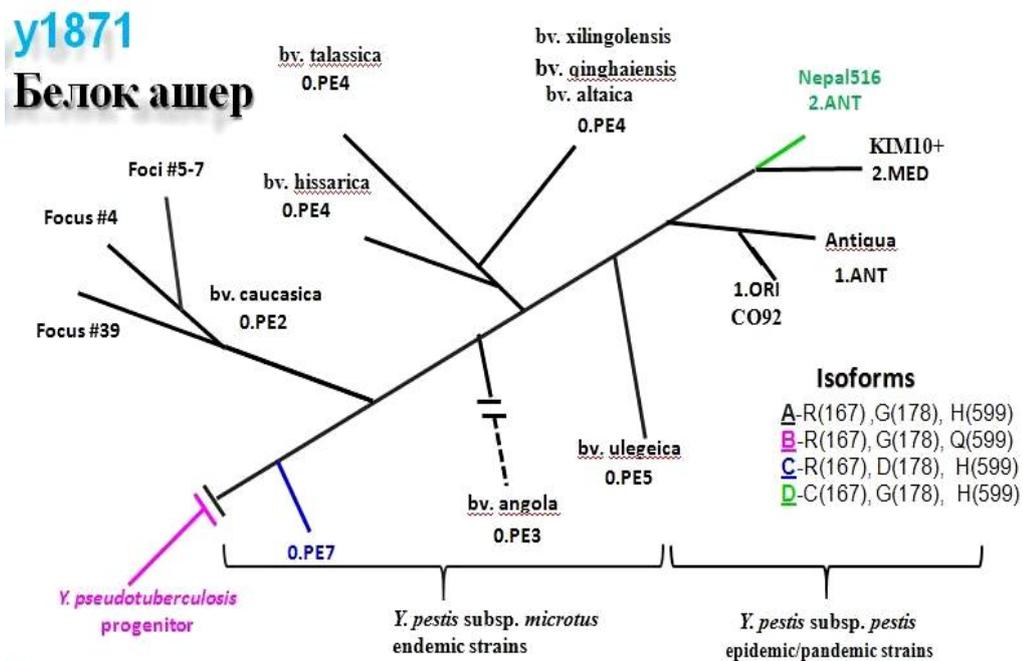


Рисунок 5.5 (b) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвидов, построенная для анализа продукта гена *y1871*, окрашенная по найденным отличиям

Продолжение таблицы 5.3.

кластер	ген	функция	0.PE7	0.PE2		0.PE3	0.PE4				0.PE5	1.ORI	1.ANT	2.ANT
			CMCC 05009; 620024	<i>caucasica</i> #39 _{NT3}	<i>caucasica</i> #4-7 _{NT2}	<i>angola</i>	<i>talassic</i> <i>a</i> _{NT1}	<i>hisarica</i> _{NT1}	<i>altaica</i>	<i>xilingol</i> <i>ensi s</i> _{NT1}	<i>ulegei</i> <i>ca</i> _{NT1}	CO92	<i>antiqu</i> <i>a</i>	Nepal 516
<i>psaEFA</i> <i>BC</i>	<i>psaA</i>	субъ- единица	н.д.	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о
	<i>psaB</i>	шаперон	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о
	<i>psaC</i>	ашер	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о
	<i>psaF</i>	субъ- единица	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о
	<i>psaE</i>	регуля- тор	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о
<i>caf</i> (pFra/p MT)	<i>caf1A</i>	ашер	п/о	п/о	п/о	-	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о
	<i>caf1R</i>	регуля- тор тран- скрип- ции	п/о	п/о	п/о	-	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о
	<i>caf1M</i>	шаперон	п/о	п/о	п/о	-	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	253 S→T
	<i>caf1</i>	субъ- единица	п/о	117 F→V	48 A→S	-	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о	п/о

Примечание: E – глутаминовая кислота; K – лизин; R – аргинин; I – изолейцин; H – гистидин; G – глицин; D – аспарагиновая кислота; C – цистеин; V – валин; L – лейцин; Q – глутамин; S – серин; F – фенилаланин; T – треонин; A – аланин. п/о – полиморфизм отсутствует. «-» – ген отсутствует. н.д. – нет данных (в ходе неполноценной сборки генома)

В кластере *y0561-y0563* гетерогенность обнаружена только у штаммов SNP-типа 0. PE4 и у штамма Angola (0. PE3). В продукте гена *y0562* у первых штаммов произошла замена аргинина на изолейцин (190R→I). Аргинин – аминокислота с полярным заряженным положительно алифатическим гидрофильным радикалом заменилась на изолейцин – аминокислоту с незаряженным алифатическим гидрофобным радикалом. У штамма Angola произошла замена глутаминовой кислоты на лизин на N-концевом домене белка (28E→K) (рисунок 5.5 с). Глутаминовая кислота с полярным заряженным отрицательно алифатическим гидрофильным радикалом заменилась на лизин – аминокислоту с полярным заряженным положительно алифатическим гидрофильным радикалом.

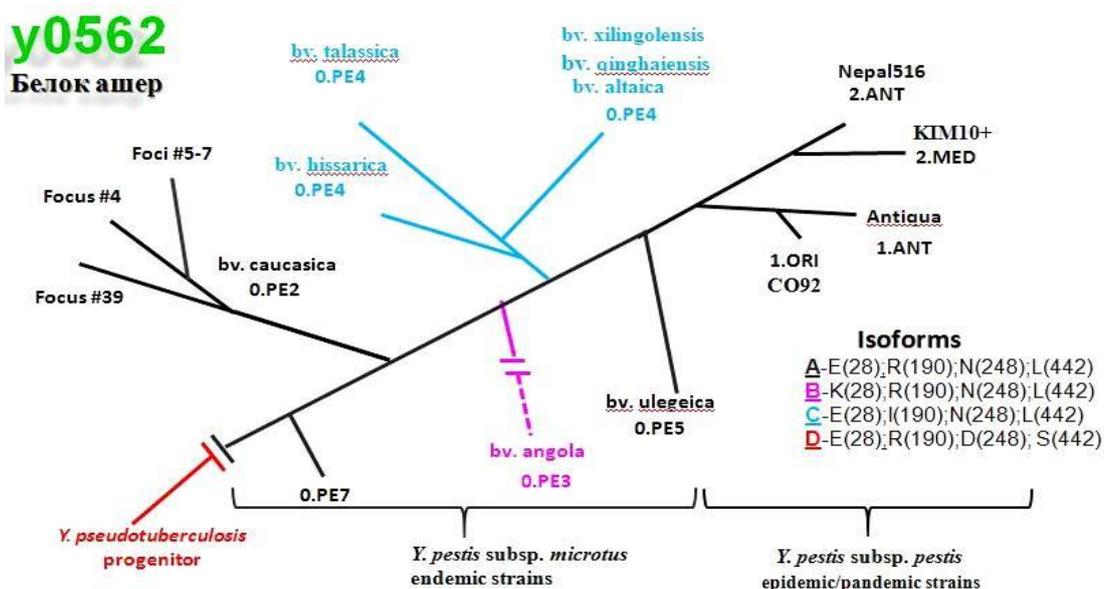


Рисунок 5.5 (с) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвидов *Y. pestis*, построенная для анализа продукта гена *y0562*, окрашенная по найденным отличиям

Кластер *y2388-y2392* оказался полиморфным. У штаммов разных SNP-типов не найдено различий только в аминокислотных последовательностях

продукта гена *y2391*. Представители подвида *microti* не имели различий в продукте гена *y2389* (шаперон). Продукты генов *y2388*, *y2390*, *y2391* и *y2392* у штамма-представителя основного подвида Nepal 516 (2.ANT) отсутствовали в связи с делецией около 100 т.п.н. При анализе нуклеотидной последовательности продукта гена *y2392*, кодирующего шаперон, в штаммах, относящихся к биовару *caucasica* (0.PE2) обнаружено встраивание IS285. Вариативность последовательности, заключающаяся в замене глицина на серин, отмечена только у штамма Angola (0.PE3) (180G→S) (С-концевой домен) (рисунок 5.5 d). Глицин – аминокислота с неполярным алифатическим гидрофобным радикалом заменилась на серин – аминокислоту с полярным незагруженным алифатическим гидрофильным радикалом.

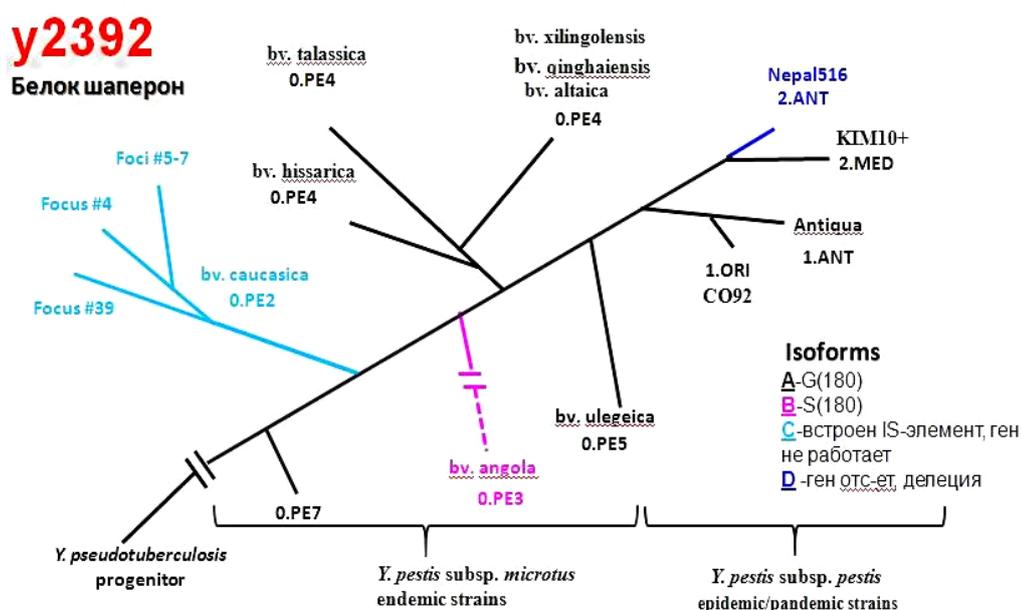


Рисунок 5.5 (d) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвигов *Y. pestis*, построенная для анализа продукта гена *y2392*, окрашенная по найденным отличиям

Продукт гена *y2388*, кодирующий субъединицу - белок компонента фимбрии типа 1, в штаммах, относящихся к биовару *caucasica* (0.PE2), несет замену валина на лейцин в позиции 49 (49V→L) (рисунок 5.5 e). Валин -

аминокислота с неполярным алифатическим гидрофобным радикалом заменилась на лейцин - аминокислоту с неполярным алифатическим гидрофобным радикалом.

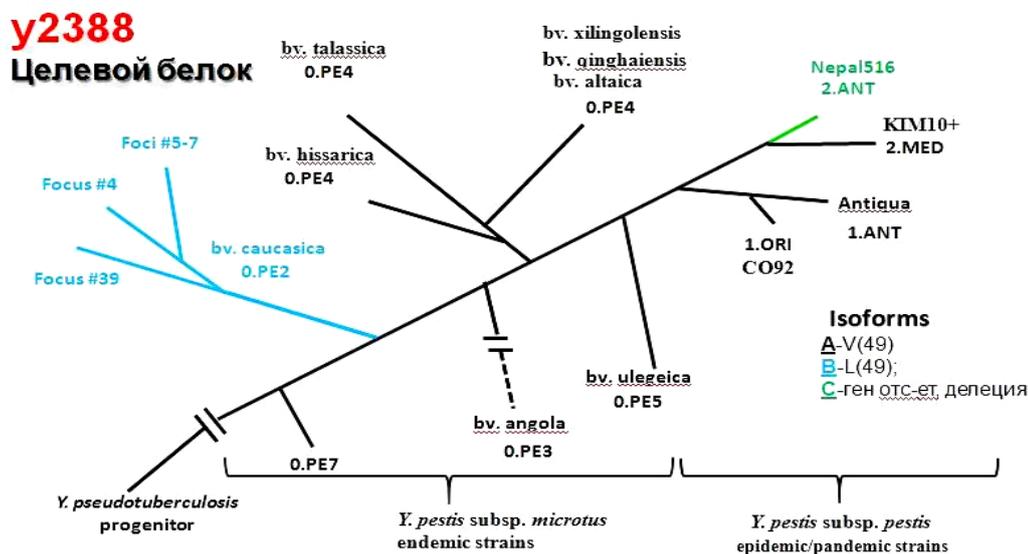


Рисунок 5.5 (е) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвидов *Y. pestis*, построенная для анализа продукта гена y2388, окрашенная по найденным отличиям

Аминокислотная последовательность y2390 отличается у штаммов, относящихся к биовару ulegeica (O.PE5), у которых произошла замена аргинина на гистидин в позиции 207 (207R→H). Аргинин – аминокислота с полярным заряженным положительно алифатическим гидрофильным радикалом заменилась на гистидин - гетероциклическую аминокислоту с полярным заряженным положительно гидрофильным радикалом.

У изолятов биовара caucasica (O.PE2), выделенных на территории природных очагов № 4-7, обнаружили замену аспаргиновой кислоты на глутаминовую кислоту (840D→E) (С-концевой домен). Аспарагиновая кислота - аминокислота с полярным заряженным отрицательно алифатическим гидрофильным радикалом заменилась на глутаминовую кислоту - аминокислоту с полярным заряженным отрицательно алифатическим гидрофильным радикалом.

лом. При этом у штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, выделенных на территории природного очага № 5, дополнительно присутствовала замена аргинина на глутамин в позиции 392 (392R→Q) (рисунок 5.5 f). Аргинин – аминокислота с полярным заряженным положительно алифатическим гидрофильным радикалом заменилась на глутамин - аминокислоту с полярным незаряженным алифатическим гидрофильным радикалом, содержащим амидную группу.

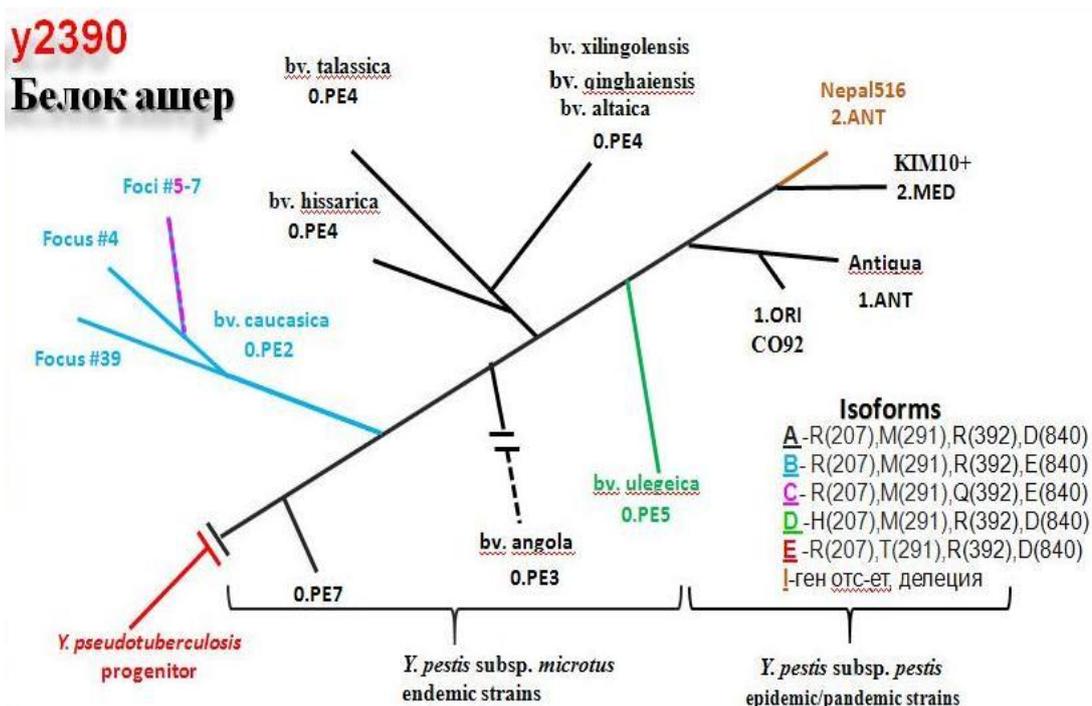


Рисунок 5.5 (f) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвидов *Y. pestis*, построенная для анализа продукта гена *u2390*, окрашенная по найденным отличиям

В кластере *u3478-u3480* у штамма Angola (O.PE3) в продукте гена *u3480*, кодирующего ашер, обнаружили замену фенилаланина на серин (163F → S) (N-концевой домен). Фенилаланин - аминокислота с ароматическим углеводородным радикалом незаряженным, гидрофобным заменилась на серин – аминокислоту с полярным незаряженным алифатическим гидрофильным радикалом.

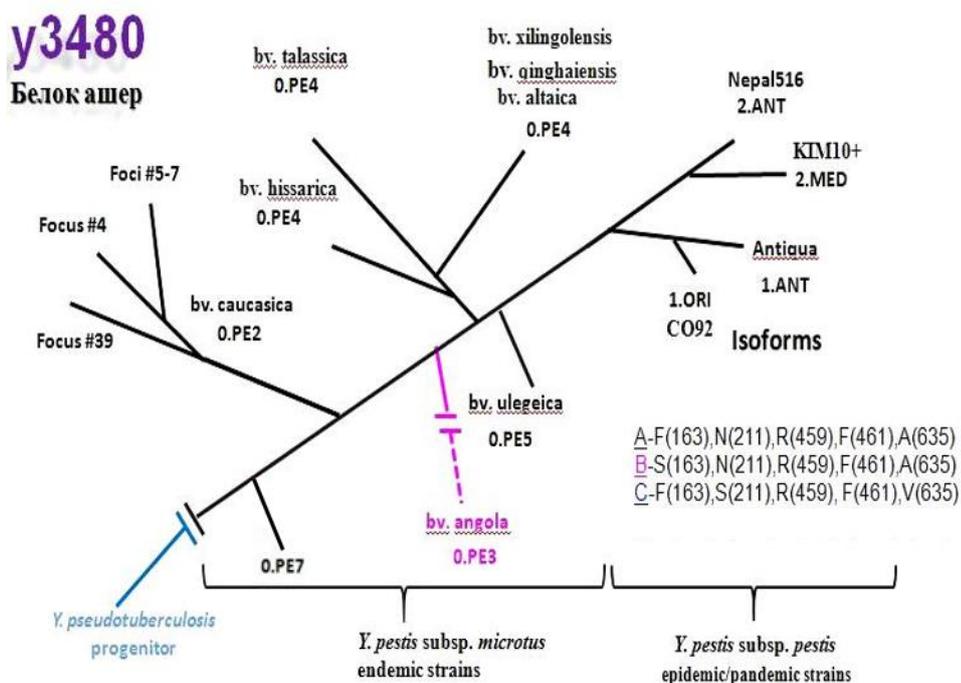


Рисунок 5.5 (g) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвидов *Y. pestis*, построенная для анализа продукта гена *у3480*, окрашенная по найденным отличиям

При анализе кластера *у3478-у3480* в продукте гена *у3478*, кодирующего субъединицу, в штаммах биовара *caucasica* (O.PE2) делеция одного нуклеотида привела к сдвигу в рамке считывания и формированию стоп кодона через 33 нуклеотида. Вероятно, этот кластер генов не функционирует у штаммов O.PE2. У штаммов, относящихся к биоварам *talassica* и *hissarica* (SNP-тип O.PE4) в этом же продукте была найдена замена валина на глицин (114V→G) (рисунок 5.5 h). Валин аминокислота с неполярным алифатическим гидрофобным радикалом заменилась на глицин - аминокислоту с неполярным алифатическим гидрофобным радикалом.

У представителей биовара *talassica* в шапероне *у3479* произошла замена аланина на валин (235A →V) (рисунок 5.5 i). Аланин - аминокислота с неполярным алифатическим гидрофобным радикалом заменилась на валин – аминокислоту с неполярным алифатическим гидрофобным радикалом.

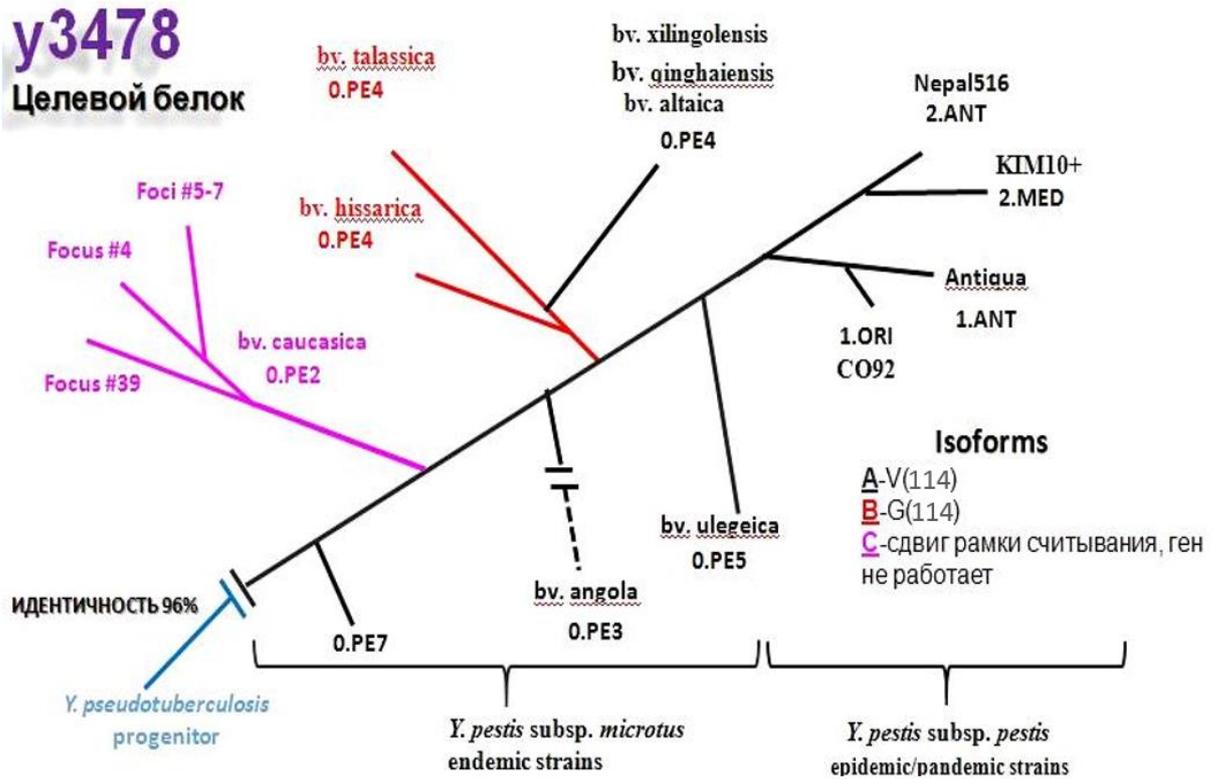


Рисунок 5.5 (h) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвидов *Y. pestis*, построенная для анализа продукта гена *у3478*, окрашенная по найденным отличиям

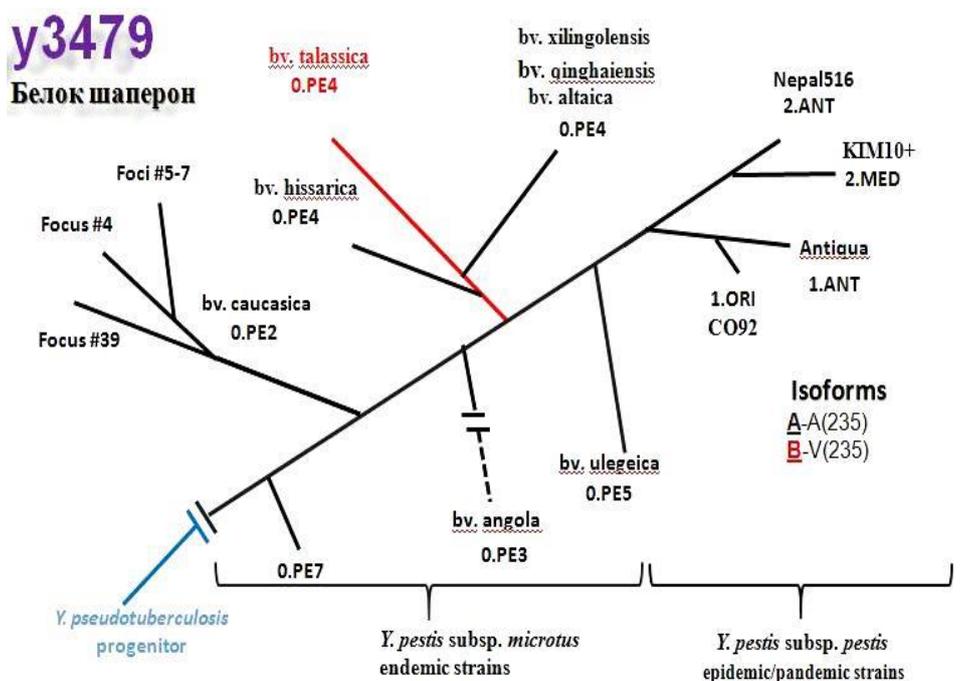


Рисунок 5.5 (i) – Схема филогенетического дерева представителей основного и неосновного подвидов *Y. pestis*, построенная для анализа продукта гена *у3479*, окрашенная по найденным отличиям

ШАСС *caf1*, которая включает в себя несколько генов (*caf1* – субединица, *caf1A* – ашер, *caf1R* – регулятор транскрипции и *caf1M* – шаперон) находится на плазмиде pFra/pMT *Y. pestis* [20]. Результаты анализа полиморфизма последовательностей гена *caf1* и соответствующих полипептидов у представителей различных подвидов *Y. pestis*, циркулирующих на территории природных очагов чумы СНГ и Монголии, представлены в главе 3 настоящего исследования. В аминокислотной последовательности продуктов остальных генов кластера *caf* отличие обнаружили только у представителя геногруппы 2.ANT штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* Nepal 516, у которого в продукте гена *caf1M* в позиции произошла замена серина на треонин (253S→T). Серин – аминокислота с полярным незаряженным алифатическим гидрофильным радикалом заменилась на треонин – аминокислоту с полярным незаряженным алифатическим гидрофильным радикалом.

На свойства белка и его пространственную форму оказывают влияние аминокислоты, входящие в его состав [15]. Радикалы аминокислот определяют пространственную структуру, заряд, растворимость в воде. Радикалы делятся на гидрофобные и гидрофильные. Гидрофобные радикалы способны «склеиваться» друг с другом, образуя гидрофобные связи, гидрофильные – образуют диполь-дипольные или водородные связи с водой. Наличие заряда также влияет на растворимость - радикалы с зарядом лучше растворяются в воде. Гидрофобные и гидрофильные радикалы определяют пространственное строение белка - его конформацию [15]. Третичная структура белка возникает в водном растворе за счет гидрофобного взаимодействия неполярных или гидрофобных боковых радикалов, дисульфидных ковалентных мостиков, образованных при окислении цистеина, водородных и ионных связей [15]. Изменение даже одной аминокислоты может повлечь за собой формирование совершенно другой структуры белка. Поэтому в ходе выполнения данной работы провели сравнение замен аминокислот по наличию полярности, заряда, структуре и взаимодействию с водой (гидрофобность/гидрофильность). Результаты приведены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Сравнение аминокислотных замен продуктов генов ШАСС *Y. pestis*

Ген	Функция	SNP-тип	Замена	Полярность/заряд радикала	Структура радикала	Гидрофильность, -фобность радикала
y0562	ашер	0.PE3	28E→K	полярный заряженный отрицательно/полярный заряженный положительно	алифатическая/ алифатическая	гидрофильный/ гидрофильный
		0.PE4	190R→I	полярный заряженный положительно/ неполярный	алифатическая/ алифатическая	гидрофильный/ гидрофобный
y1858	ашер	0.PE3	526R→H	полярный заряженный положительно/ полярный заряженный положительно	алифатическая/ гетероциклическая	гидрофильный/ гидрофильный
y1871	ашер	0.PE7	178G→D	неполярный/полярный заряженный отрицательно	алифатическая/ алифатическая	гидрофобный/ гидрофильный
		2.ANT	167R →C	полярный заряженный положительно/ полярный незаряженный	алифатическая/ алифатическая серосодержащая	гидрофильный/ гидрофильный
y2388	субъединица	0.PE2	49V→L	неполярный/неполярный	алифатическая/ алифатическая	гидрофобный/ гидрофобный
y2390	ашер	0.PE2 очаги 4, 5, 6, 7	831D→E	полярный заряженный отрицательно/ полярный заряженный отрицательно	алифатическая/ алифатическая	гидрофильный/ гидрофильный
		0.PE2 очаг 5	382R→Q	полярный заряженный положительно/ полярный незаряженный	алифатическая/ алифатическая	гидрофильный/ гидрофильный
		0.PE5	198R→H	полярный заряженный положительно/ полярный заряженный положительно	алифатическая/ гетероциклическая	гидрофильный/ гидрофильный
y2392	шаперон	0.PE3	180G→S	неполярный/полярный незаряженный	алифатическая/ алифатическая	гидрофобный/ гидрофильный
y3478	субъединица	0.PE4 <i>talassica hisarica</i>	114V→G	неполярный/неполярный	алифатическая/ алифатическая	гидрофобный/ гидрофобный

Продолжение таблицы 5.4

Ген	Функция	SNP-тип	Замена	Полярность/заряд радикала	Структура радикала	Гидрофильность, -фобность радикала
y3479	шаперон	0.PE4 <i>talassica</i>	235A→V	неполярный/неполярный	алифатическая/ алифатическая	гидрофобный/ гидрофобный
y3480	ашер	0.PE3	163F → S	неполярный/полярный незаряженный	ароматическая/алифатическая	гидрофобный/ гидрофильный
Caf	шаперон	2.ANT	253S→T	полярный незаряженный/ полярный незаряженный	алифатическая/алифатическая	гидрофильный/ гидрофильный
	субъединица	0.PE2 очаг 39	117F→ V	неполярный/ неполярный	ароматическая/ алифатическая	гидрофобный/ гидрофобный
		0.PE2 очаги 4, 5, 6, 7	48A→S	неполярный/полярный незаряженный	ароматическая/ алифатическая	гидрофобный/ гидрофильный

Примечание: E –глутаминовый кислота; K – лизин; R – аргинин; I - изолейцин; H – гистидин; G – глицин; D – аспарагиновый кислота; C – цистеин; V – валин; L – лейцин; Q – глутамин; S – серин; F – фенилаланин; T – треонин; A – аланин. Цветом выделены изменения свойств радикалов аминокислот

В ходе выполнения настоящего раздела работы в продуктах генов ШАСС *Y. pestis* обнаружили 16 аминокислотных замен, девять из которых произошли в ашерах, четыре в субъединицах и три в шаперонах. Пять аминокислотных замен (по две замены в шаперонах и субъединицах и одна в ашере) не привели к изменению физико-химических свойств (полярность, заряд, структура и гидрофобность/гидрофильность). Из 11 аминокислотных замен (восемь - в ашерах, одна – в шапероне, две в субъединице), несущих изменение полярности, заряда, структуры, или гидрофобности/гидрофильности радикалов, четыре обнаружили у штамма SNP-типа 0.PE3 Angola, по одной выявили у штаммов 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.

Нуклеотидный полиморфизм в генах, входящих в кластеры ШАСС различных SNP-типов *Y. pestis* (учтены несинонимичные нуклеотидные замены), представлен в таблице 5.6. Определение SNP и детекция генов кластеров ШАСС позволяет дифференцировать филогенетические ветви 0.PE7, 0.PE2, 0.PE3, 0.PE4 bv. talassica, 0.PE4 bv. hissarica, 0.PE4 bv. altaica/xilingolensis, 0.PE5, 2.ANT, а также штаммы природного очага чумы № 05 внутри ветви 0.PE2 bv. caucasica.

Таблица 5.6 – Нуклеотидный полиморфизм в генах, входящих в кластеры ШАСС различных SNP-типов *Y. pestis* (учтены несинонимичные нуклеотидные замены)

ген	По- зи- ция ¹	0.PE7	0.PE2		0.PE3	0.PE4				0.PE5	1.ORI	1.ANT	2.ANT
			caucasica #39	caucasica #4-7	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 №5	G	G	G	G	G	G	G	G	
				G очаги №№4, 6, 7									
2520	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
y2392	538	G	IS285 ²	IS285 ²	A	G	G	G	G	G	G	G	
y3478	767	A	A	A	A	C	C	A	A	A	A	A	A
	807	C	delC	delC	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.

Количество различий, обнаруженных при сравнении аминокислотных последовательностей продуктов генов ШАСС *Y. pestis* KIM10+ с гомологичными продуктами штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953, оказалось небольшим (таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Сравнение аминокислотных последовательностей продуктов генов ШАСС *Y. pestis* KIM10+ и *Y. pseudotuberculosis* IP32953

Кластер	Ген	Функция	Отличие (кол-во а.о.)
y0348-y0352	y0348	шаперон	п/о
	y0349	субъединица	п/о
	y0350	ашер	8del
	y0351	шаперон	1*
	y0352	субъединица	п/о
y0561-y0563	y0561	субъединица	п/о
	y0562	ашер	2*
	y0563	шаперон	п/о
y1858-y1862	y1858	ашер	5*
	y1859	шаперон	4*
	y1860	субъединица	2*
	y1861	субъединица	п/о
	y1862	субъединица	п/о
y1869-1873	y1869	субъединица	п/о
	y1870	шаперон	п/о
	y1871	ашер	1*
	y1872	субъединица	п/о
	y1873	шаперон	1*
y2388-y2392	y2388	субъединица	п/о
	y2389	шаперон	1*
	y2390	ашер	1*
	y2391	субъединица	п/о
	y2392	шаперон	п/о
y3478-y3480	y3478	субъединица	13*
	y3479	шаперон	п/о
	y3480	ашер	2*
psaEFABC	psaA	субъединица	п/о
	psaB	шаперон	п/о
	psaC	ашер	п/о
	psaF	субъединица	п/о
	psaE	регулятор	п/о

Примечание: п/о – полиморфизм отсутствует; * – количество аминокислотных замен в продукте гена; del – делеция.

В кластере *psaEFABC* полиморфизм отсутствовал вообще. Кластеры *y0561-y0563*, *y1869-1873* и *y2388-y2392* оказались высококонсервативными. В первом только продукт гена *y0562* отличался на две аминокислоты, во втором и третьем кластере по два продукта генов обладали отличиями в один аминокислотный остаток (*y1871* и *y1873*; *y2389* и *y2390*). В кластере *y0348-y0352* в продукте гена *y0350* обнаружили делецию восьми аминокислот, а у *y0351* - одну аминокислотную замену.

В кластере *y3478-y3480* обнаружили тринадцать аминокислотных замен в продукте гена *y3478*, кодирующего субъединицу, кроме этого, в ашере, кодируемом геном *y3480*, было найдено две аминокислотные замены. Кластер *y1858-y1862* оказался полиморфным, в продукте гена *y1858*, кодирующего ашер, имелось пять аминокислотных замен, в *y1859* (шаперон) - четыре, а в субъединице, кодируемой *y1860* - две.

5.3 Заключение по Главе 5

Бактерии для взаимодействия с внешней средой формируют на своей поверхности различные пили (фимбрии) - длинные, тонкие белковые гомо- или гетерополимеры, которые осуществляют разнообразные функции [92]. Многообразие структур и функций бактериальных пилей отражает адаптацию микроорганизмов к различным экологическим условиям. Адаптация как эволюционный процесс обеспечивает выживание в условиях конкретного местообитания, устойчивость к воздействию факторов абиотического и биогического характера, а также успех в конкуренции с другими видами, популяциями, особями. В случае возбудителей инфекционных заболеваний, бактериальные пили в совокупности с токсинами, ферментами и другими факторами патогенности обеспечивают адаптацию микроорганизма к организму чувствительного хозяина.

Геном *Y. pestis* содержит 10 кластеров генов, относящихся к шаперон/ашерным системам секреции, отвечающим за биогенез пилей адгезии [75; 90]. Две из ШАСС возбудителя чумы кодируемые оперонами *cafI* и *psaEFABC* достаточно хорошо изучены [1]. Исследования, выполненные на штамме *Y. pestis* subsp. *pestis*, показали, что остальных ШАСС чумного микроба, способны образовывать дополнительные пили адгезии и, вероятно, играют роль в патогенности *Y. pestis*. Однако о функциях ШАСС, их роли во взаимодействиях патоген-хозяин и в патогенезе чумы известно немного. Мы впервые проанализировали вариабельность ШАСС у штаммов чумного микроба, принадлежащих к разным SNP-типам. Интерес к определению генетических различий в группах штаммов *Y. pestis* обусловлен задачей объяснения существования двух подвидов: высоковирулентного для широкого круга млекопитающих (*Y. pestis* subsp. *pestis*) и слабовирулентного или даже авирулентного для человека и морских свинок (*Y. pestis* subsp. *microti*) [2, 61, 63, 185]. Кроме этого, эволюция приспособила отдельные внутривидовые груп-

пы чумного микроба к циркуляции в популяциях более 200 видов грызунов или зайцеобразных, невзирая на то, что *Y. pestis* является довольно «молодым» видом [31, 32]. Дивергенция возбудителя чумы от *Y. pseudotuberculosis* и превращение энтеропатогенных бактерий с фекально-оральным путем передачи в возбудителя генерализованной септической инфекции — чумы, передающейся кровососущими насекомыми — блохами, привела к значительным изменениям в структуре генома *Y. pestis*. В результате этих процессов бактерия *Y. pestis* приобрела 32 хромосомных гена и две плазмиды, кодирующих ряд важных факторов патогенности, однако, при этом потеряла часть хромосомных генов в результате крупных делеций, встраивания IS-элементов и однонуклеотидных замен [31, 32]. По нашим данным, несмотря на существование внутривидовых групп чумного микроба и их циркуляцию на территории географически изолированных природных очагов, генетическая вариабельность ШАСС штаммов *Y. pestis* разных SNP-типов не отличается разнообразием.

Два кластера генов *y1539-y1544* и *y4060-y4063* с большой вероятностью не функционируют у штаммов *Y. pestis*; в первом продукт гена *y1543* нарушен вставкой IS-элемента, а во втором - *y4062* - единичные нуклеотидные замены привели к формированию стоп-кодона и образованию второй рамки считывания. Так как у всех SNP-типов *Y. pestis* структура нефункционирующих кластеров *y1539-y1544* и *y4060-y4063* одинакова, вероятно, данные изменения произошли на ранних стадиях формирования чумного микроба. Возможно, эти ШАСС необходимы для полноценного обеспечения адгезии у энтеропатогенной бактерии *Y. pseudotuberculosis*, но оказались не нужны для возбудителя чумы.

Кластер *psaEFABC* кодирует гены, ответственные за формирование рН6 антигена, который образует на клеточной поверхности *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* гомополимерные пили адгезии [6, 115]. рН6 антиген обладает адгезивной активностью в отношении эритроцитов [24, 45] и культивируемых эпителиальных клеток млекопитающих, а также он препятствует

фагоцитозу [24]. В ходе проведения анализа показали, что аминокислотная последовательность продуктов генов, входящих в кластер *psaEFABC*, идентична не только у представителей разных SNP-типов *Y. pestis*, но и идентична штамму *Y. pseudotuberculosis* IP32953. Скорее всего, отсутствие генетической variability у данного кластера свидетельствует о важной роли кодируемых им белков в патогенезе двух непохожих друг на друга инфекций, вызванных генетически близкими микроорганизмами - *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Но даже этот высококонсервативный адгезин бактерий комплекса *Y. pseudotuberculosis* не является обязательным фактором патогенности чумного микроба – его Δ *psaA* мутанты сохраняли вирулентность при подкожном заражении на уровне штаммов «дикого типа» [39].

Продукты генов, входящих в кластер *y0348-y0352*, имели идентичную аминокислотную последовательность у штаммов разных SNP-типов, кластеры *y1858-y1862* и *y1869-y1873* также являлись высококонсервативными. В кластере *y1858-y1862* variability заключалась в существовании всего одной аминокислотной замены у штамма Angola (0.PE3) в продукте гена, кодирующего ашер. В кластере *y1869-y1873* у штаммов, относящихся к 0.PE7, обнаружили также одну аминокислотную замену в продукте гена, кодирующего ашер.

М.К. Nospenthal *et al.* [92] показали роль трех ШАСС *y0348-0352*, *y1858-1862* и *y1869-1873* в патогенезе легочной чумы на мышинной модели. Штаммы с делетированными генами ашеров этих кластеров были авирулентны при интраназальном введении. При подкожном заражении мышей инфекционный процесс, вызванный штаммами с делецией в гене ашера этих кластеров, не отличался от инфекции, вызванной родительским высоковирулентным штаммом. Установлено, что ШАСС *y0348-0352* и *y1858-1862* играют роль в адгезии бактерий к эпителиальным клеткам и макрофагам, а *y1869-1873* участвует только в связывании с макрофагами. Исходя из имеющейся информации и низкой степени variability среди штаммов *Y. pestis* (полиморфизм обнаружен только у одного штамма, относящегося к SNP-типу

0.PE3, двух - 0.PE7 и одного 2.ANT), можно предположить, что ШАСС *y0348-0352*, *y1858-1862* и *y1869-1873* играют важную роль в патогенезе чумы, вне зависимости от конечного хозяина или переносчика, однако для ее выяснения требуется проведение специального исследования.

При сравнении продуктов генов *Y. pestis* ШАСС *y0348-0352* и *y1858-1862* *Y. pestis* KIM10+ и *Y. pseudotuberculosis* IP32953 оказалось, что в ашере *y1858* чумного микроба есть пять аминокислотных замен, в шапероне *y1859* - четыре, а в ашере *y0350* обнаружили делецию восьми аминокислот. Выявленные различия при отсутствии вариабельности внутри различных SNP-типов возбудителя чумы позволяют предположить, что два вышеперечисленных кластера важны при развитии инфекционного процесса, вызванного именно *Y. pestis*. Кластер *y1869-1873* *Y. pestis* KIM10+, роль которого была показана только в связывании с макрофагами, отличается от гомологичных продуктов *Y. pseudotuberculosis* IP32953 только двумя аминокислотными заменами, что может свидетельствовать о вовлечении этого ШАСС в общий патогенетический процесс.

Функции остальных ШАСС (*y0561-y0563*, *y2388-y2392* и *y3478-y3480*) в патогенезе чумы и их роль во взаимодействиях хозяина-патогена пока не установлены. Первые две ШАСС мало отличаются от гомологичных продуктов *Y. pseudotuberculosis* IP32953 и, вероятно, являются дополнительными общими факторами патогенности. В продукте гена *y3478*, кодирующего субъединицу в кластере *y3478-y3480* обнаружили тринадцать аминокислотных замен, что может свидетельствовать о различиях в структуре данного типа фимбрий у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. В работе E. Pradel *et al.* [132] показали, что кластер *y3478-y3480* *Y. pestis* играет роль в патогенности чумного микроба, но выполняемая его продуктами функция точно не установлена.

В результате исследования оказалось, что в штаммах, относящихся к биовару *caucasica* (0.PE2), предположительно не функционируют ШАСС *y2388-y2392* и *y3478-y3480*, вследствие встраивания IS285 в шаперон *y2392* и

сдвига в рамке считывания в продукте гена субъединицы *u3478*. Несмотря на две нефункционирующие ШАСС штаммы SNP-типа 0.PE2 остаются успешными инфекционными агентами для различных видов полевок на протяжении достаточно долгого времени (ветвь 0.PE2 по близости к «предшественнику» *Y. pseudotuberculosis* находится на эволюционном древе на втором месте после 0.PE7).

Выявленный в ходе выполнения настоящего исследования полиморфизм продуктов ШАСС у штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* актуализирует направление дальнейших исследований, которые должны быть посвящены определению роли отдельных шаперон/ашерных систем секреции в патогенезе чумной инфекции. Кроме того, необходимо определить при каких условиях они собираются в полноценные структуры, поскольку *Y. pestis* циркулирует в популяциях гомойотермных организмов (грызуны, зайцеобразные), а передача осуществляется пойкилотермными организмами (блохи). Только нокаутный мутагенез входящих в состав кластеров ШАСС генов с последующей комплементацией могут пролить свет на вклад отдельных систем секреции IV типа, в патогенез чумы.

Вместе с тем полученные данные о вариабельности продуктов шаперон/ашерных систем секреции у штаммов *Y. pestis* различных SNP-типов можно использовать для определения биоварной принадлежности штаммов. Это позволит проводить верификацию неоднозначных данных, полученных с помощью других методов, при выделении атипичных природных изолятов и музейных штаммов, изменивших свои свойства в процессе хранения, а также служить дополнительным критерием для внутривидового типирования штаммов *Y. pestis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Y. pestis, грамотрицательная бактерия, является этиологическим агентом лёгочной и бубонной чумы, которая все еще активна в различных регионах мира. Возбудитель чумы является одним из главных потенциальных агентов биотерроризма, поскольку способен распространяться и аэрозольным путём, что может приводить к массовому заражению людей. Эффективная вакцина против чумы должна стимулировать развитие не только гуморального, но и клеточного иммунитета [102]. Живые (на основе аттенуированных штаммов) и убитые цельноклеточные чумные вакцины были доступны с начала прошлого века. Однако они обладали целым рядом недостатков. Живая аттенуированная вакцина высоко реактогенна. Убитая цельноклеточная вакцина также реактогенна и не обеспечивает защиты от чумной пневмонии, для развития напряженного иммунитета необходимо повторное введение препарата [156]. Разработка вакцин против чумы второго поколения основана на сочетании двух иммунодоминантных факторов патогенности *Y. pestis*, одним из которых является Caf1 - капсульный антиген [169], а вторым - LcrV антиген, либо в одиночку, либо в сочетании с соответствующими адьювантами.

Целью настоящей работы явилось получение новых сведений о распространённости полиморфизма капсульного антигена *Y. pestis*, а также изучение влияния данного полиморфизма на иммунодиагностику и вакцинопрофилактику чумы.

Для изучения полиморфизма гена *caf1* чумного микроба и его продукта Caf1 антигена, необходим, прежде всего, набор природных изолятов, представляющий различные внутривидовые группы. В данной работе исследовали 124 штамма *Y. pestis*, циркулирующих на территории природных очагов

чумы СНГ и Монголии. Два из них относилось к основному подвиду *Y. pestis* subsp. *pestis*, а 122 штамма – к неосновному *Y. pestis* subsp. *microti*.

В ходе выполнения диссертационной работы провели полногеномное секвенирование 19 штаммов *Y. pestis* подвида *microti* шести биоваров: *ulegeica*, *caucasica*, *xilingolensis*, *hissarica*, *talassica*, *altaica*, выделенных на территории различных природных очагов чумы, с последующим депонированием последовательностей в GenBank. Кроме того, при проведении исследований *in silico* использовали полногеномные последовательности семи штаммов *Y. pestis*, депонированных в GenBank ранее.

Анализ аминокислотных последовательностей гена *cafI* позволил выделить три изоформы CafI антигена *Y. pestis*: NT1, NT2, NT3. В данной работе впервые представлены доказательства того, что тип NT2 (S48 F117) является уникальным в Закавказском высокогорном и Приараксинском природных очагах чумы, в то время как новый тип NT3 (A48 V117) является эндемичным в Дагестанском высокогорном природном очаге чумы. При этом классическая изоформа CafI_{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*. Это подтверждается данными секвенирования гена *cafI* из 119 штаммов *Y. pestis*, принадлежащих к семи из восьми известных биоваров подвида *microti*.

Для того, чтобы понять, влияет ли обнаруженный полиморфизм на структурные и функциональные свойства CafI чумного микроба проанализировали двухмерную и трехмерную структуру белка, а также существование потенциальных областей неупорядоченности. Появление единичной аминокислотной замены в положении 48 у CafI_{NT2} и в положении 117 у CafI_{NT3} внесло изменение во вторичную структуру двух изоформ капсульного антигена, а именно изменения затронули α , β регионы, области поворотов участков и их частоту. Кроме того, формирование предполагаемых трехмерных моделей трех изоформ CafI *Y. pestis* продемонстрировало увеличение гидро-

фобных свойств Caf1_{NT3}, вызванных заменой F117→V117. В дальнейшем оценили склонность к неупорядоченности у трех 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 некоторое влияние на их внутреннюю неупорядоченность. Обе замены вызывают заметное изменение упорядоченности, но только последняя оказывает влияние на интерактивность белка.

Для проведения оценки перекрестной серологической активности и перекрестной протективности трех изоформ Caf1 были выбраны три аттенуированных штамма-продуцента *Y. pestis* EV НИИЭГ – изоформа Caf1_{NT1}, С-376 – изоформа Caf1_{NT2} и С-824 - изоформа Caf1_{NT3}. Выделение белка Caf1 осуществляли из надосадочной части бульонных культур штаммов *Y. pestis* методом гидрофобной хроматографии. Поведение капсульного антигена во время гидрофобной хроматографии тоже имело отличия: пик элюирования изоформы Caf1_{NT3} распределился между градиентом сульфата аммония 600 мМ и 50 мМ, в то время как изоформы Caf1_{NT1} и Caf1_{NT2} достигли максимума при 350 мМ.

До начала настоящего исследования не было известно могут ли штаммы, несущие NT2 и NT3 аллели гена *caf1*, преодолеть протективный иммунитет, опосредованный изоформой Caf1_{NT1}, а также способны ли существующие методы иммуноанализа обнаруживать чумной микроб с другими аллелями гена *caf1*. Был очевиден вопрос о способности коммерческих препаратов к Caf1_{NT1} обеспечивать эффективную защиту от гибели при заражении штаммами с NT2 и NT3 изоформами белка, а также возможна ли индикация подобных изоформ существующими методами иммуноанализа. Чтобы отве-

тить на данные вопросы, оценили серологическую перекрестную реактивность и перекрестную протективность изоформ CafI. Все три изоформы в равной степени детектировались с помощью иммунохроматографического теста для обнаружения чумного микроба «ИХ тест *Yersinia pestis*» и иммуноферментного анализа с применением тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной «ИФАПестФ1- М». По сравнению с сыворотками мышей, иммунизированных классической изоформой CafI_{NT1}, сыворотки животным после иммунизации эндемичными CafI_{NT2} и CafI_{NT3} показали более низкую иммунореактивность в ИФА. Кроме того, после их введения наблюдали более низкую напряженность иммунитета как в отношении заражающего штамма, продуцирующего использованную для иммунизации изоформу, так и штаммов, носителей двух других изоформ белка. Однако, несмотря на заметное снижение перекрестной защиты, наблюдаемой между всеми изоформами, полиморфизм в гене *cafI* не может обеспечить штаммам *Y. pestis* с изоформами CafI_{NT2} или CafI_{NT3} возможность «укрыться» от CafI_{NT1}-опосредованного иммунитета. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что иммунитет, индуцированный изоформой CafI_{NT1}, достаточен для надежной защиты организма при заражении штаммами с изоформами CafI_{NT2} и CafI_{NT3} в дозах, соответствующих таковым при укусе блохи.

Грамотрицательные энтеробактерии экспрессируют поверхностные структуры - фимбрии, отвечающие за адгезию к биотическим и абиотическим поверхностям. Описано три пути сборки таких органелл, один из которых - шаперон/ашерная система секреции. Полногеномное секвенирование многих энтеробактерий показало, что наличие большого количества кластеров, кодирующих ШАСС в геноме – это норма [57], и возбудитель чумы, обладающий 10-тью описанными системами секреции, не выделяется среди других грамотрицательных бактерий. Пили, собранные в системе шаперон/ашер, являются критическими факторами патогенности бактерий, они инициируют контакт и опосредуют прикрепление к поверхности клетки-хозяина. Однако, за-

дачи ШАСС могут быть и более сложными, нежели функционирование в качестве адгезинов. Они могут модулировать пути передачи сигналов клетки-хозяина, стимулировать или ингибировать бактериальную инвазию внутрь клеток-хозяев или участвовать во взаимодействиях бактерия-бактерия, как например, образование биопленки [154]. Обобщая имеющиеся результаты можно сделать вывод о мультифункциональной роли ШАСС в патогенезе инфекционного заболевания и персистенции патогена. Еще одним важным пунктом при исследовании роли ШАСС является определение условий окружающей среды, при которых они не только экспрессируются, но и собираются в полноценные структуры. Ключевым этапом в этом процессе является регуляция генов. Однако исследования выполненные на разных кластерах фимбриальных генов продемонстрировали, что регулоны могут быть весьма разнообразными и регуляция может включать в себя сложные схемы с множественными компонентами [57].

Функции капсульного и рН 6 антигенов чумного микроба хорошо изучены. Однако о функциях остальных ШАСС и их роли в патогенезе чумы известно только то, что они способны образовывать дополнительные пили адгезии и некоторые из них, вероятно, играют роль в патогенности *Y. pestis*. При сравнении аминокислотной последовательности продуктов генов, входящих в кластеры ШАСС штаммов *Y. pestis* разных SNP-типов оказалось, что их вариабельность не отличается разнообразием. Два кластера ШАСС, в отличие от штаммов *Y. pseudotuberculosis*, не функционируют у представителей *Y. pestis*. Возможно, эти ШАСС необходимы для обеспечения развития инфекционного процесса, вызванного энтеропатогенными бактериями, но оказались не нужны возбудителю чумы. Однако нельзя исключить и другую версию – функции утраченных фимбрий взяли на себя оставшиеся. У представителей *Y. pestis* SNP-типа 0.PE2 предположительно не функционируют еще два кластера ШАСС, но, несмотря на это, данные штаммы не утратили вирулентность и циркулируют в популяциях полевок.

Низкая степень вариабельности кластеров *y1869-1873*, *y0561-y0563*, *y2388-y2392* чумного и псевдотуберкулезного микроба может свидетельствовать о вовлеченности этих ШАСС в общий для двух видов иерсиний процесс патогенеза. Предположительно к важным для развития инфекционного процесса, вызванного именно возбудителем чумы можно отнести кластеры *y0348-0352* и *y1858-1862*. А выявленные различия в продукте гена *y3478* могут свидетельствовать об отличиях в структуре фимбрий у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Выявленный в ходе полногеномного секвенирования и сравнительного анализа полиморфизм генов, кодирующих компоненты систем секреции IV типа, специфический для филогенетических групп чумного микроба, может быть использован для надежной идентификации и определения биоварной принадлежности изолятов чумного микроба.

В заключение следует отметить, что основным практическим итогом настоящей работы является доказательство того, что коммерческие диагностические препараты и вакцина чумная живая сухая способны обеспечить эффективную индикацию/идентификацию и напряженный иммунитет в отношении любых штаммов *Y. pestis*, независимо от изоформы их капсульного антигена.

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. Выдены 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 сульфата аммония; изоформа Caf1_{NT3} присутствовала во фракциях элюата с концентрациями сульфата аммония 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 сорбиро-

ванного 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 CafI 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 CafI 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 CafI и других компонентов ШАСС.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ,
ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

а.о.	- аминокислотный остаток
в/б	- <u>в</u> нутри <u>б</u> рюшинно
ВНБ (IDP)	- <u>в</u> нутренне <u>н</u> еупорядоченные <u>б</u> елки (intrinsically <u>d</u> isordered protein)
ГКПМ-Оболенск	- <u>Г</u> осударственная <u>к</u> оллекция <u>п</u> атогенных <u>м</u> икроорганизмов - Оболенск
ИИ	- <u>и</u> ндекс <u>и</u> ммунитета (индекс резистентности)
ИркНИПЧИ	- <u>И</u> ркутский <u>н</u> аучно- <u>и</u> сследовательский <u>п</u> ротиво <u>ч</u> умный <u>и</u> н- ститут Сибири и Дальнего Востока
ИФА	- <u>и</u> ммуно <u>ф</u> ерментный <u>а</u> нализ
ИХ	- <u>и</u> ммуно <u>х</u> роматография
КОЕ (cfu)	- <u>к</u> олоние <u>о</u> бразующая <u>е</u> диница (colony <u>f</u> orming <u>u</u> nit)
ЛПС	- <u>л</u> ипо <u>п</u> оли <u>с</u> ахарид
МЖК	- <u>м</u> узей <u>ж</u> ивых <u>к</u> ультур
МКНБ	- <u>М</u> еждународный <u>к</u> одекс <u>н</u> оменклатуры <u>б</u> актерий
НД	- <u>н</u> ет <u>д</u> анных
п.н. (bp)	- <u>п</u> ар <u>н</u> уклеотидов (<u>b</u> ase <u>p</u> air)
п/к	- <u>п</u> од <u>к</u> ожно
ПААГ	- <u>п</u> оли <u>а</u> крила <u>м</u> идный <u>г</u> ель
ДСН-ПААГ	-белковый электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)
персистенция	- в контексте настоящего исследования под этим термином подразумевается способность бактерий сохранять свою жизнеспособность в организмах хозяина, переносчика и окружающей среде

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РКПБ «Микроб»	- Российская коллекция патогенных бактерий «Микроб»
РосНИПЧИ "Микроб"	- Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"
РостНИПЧИ	- Ростовский научно-исследовательский противочумный институт
СА	- сульфат аммония
СтавНИПЧИ	- Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт
ФБУН ГНЦ ПМБ	- Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ШАСС	- шаперон/ашерные системы секреции
ЭДТА	- этилендиаминтетраацетат натрия
bv.	- биофар
Caf1(F1)	- капсульный антиген чумного микроба
Fra ⁺ / Fra ⁻	- способность к синтезу капсульного антигена "фракция I" и образованию капсулы или ее отсутствие
<i>in vitro</i>	- эксперимент "в пробирке", без использования животных
<i>in vivo</i>	- эксперимент на животных
kDa	- килодальтон ²
LD ₅₀	- доза, летальная для 50 % животных (dosis letalis 50)
PDB	- Protein Data Bank (Банк данных о белках)
pFra (pYT)	- 60-65 MDa плазида, кодирующая синтез капсульного ан-

² Согласно Международной системе СИ молекулярная масса измеряется в атомных единицах массы (а. е. м.); 1 а. е. м. $\approx 1,66057 \times 10^{-27}$ кг. В биохимии молекулярную массу макромолекул принято выражать в дальтонах; 1 дальтон = 1 а. е. м.

	тигена 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")

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Анисимов, А.П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*: дис. докт. мед. наук: 03.00.07 / Андрей Павлович Анисимов. – Саратов, Оболенск. – 1999. – 325 с.
2. Анисимов, А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов / А.П. Анисимов // Сообщение 1: Мол. генетика, микробиология и вирусология. – 2002. – № 3. – С. 3 – 23.
3. Анисимов, А.П. Электрокинетический потенциал клеток *Yersinia pestis* и *Escherichia coli* с интактным или дефектным геном *ucaA (cafIM) fra*-оперона возбудителя чумы / А.П. Анисимов, В.М. Фомченков, Н.К. Фурсова // Генетика. – 1994. – Т. 30. – № 9. – С. 1160 – 1165.
4. Вейнблат, В.И. Гидродинамическая характеристика капсульного антигена возбудителя чумы. Вопросы генетики, молекулярной биологии и микробиологии чумы и холеры / В.И. Вейнблат, В.В. Никифоров, А.В. Кормилицин. – Саратов: Коммунист, 1985. – С. 37 – 42с.
5. Вейнблат, В.И. Методы получения и очистки капсульного антигена и эндотоксина возбудителя чумы / В.И. Вейнблат, С.М. Дальвадянц, М.С. Веренков // Лаб. дело. – 1983. – № 12. – С. 37 – 39.
6. Водопьянов, С.О. Феномен пилеобразования при взаимодействии *Yersinia pestis* с макрофагами экспериментальных животных / С.О. Водопьянов, Г.О. Попова, Г.И. Васильева и др. // микробиология. – 1990. – № 3. – с. 3–6.
7. Гребцова, Н.Н. Изучение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов в отношении *Yersinia pestis* с дефектными и полноценными *fra*-генами / Н.Н. Гребцова, А.С. Чернявская, С.А. Лебедева, В.С. Иванова // Журн. микробиология. – 1990. – № 5. – С. 7 – 11.

8. Домарадский, И.В. Чума / И.В. Домарадский. – 1998. – М.: Медицина. – 176с.
9. Ермакова, Г.В. Изучение протективной активности различных по химическому составу препаратов капсульного антигена чумного микроба / Г.В. Ермакова, Т.М. Тараненко, А.В. Наумов // Микробиол., биохим. и специфическая профилактика карантинных инф. – 1990. – Саратов. С. 84 – 89.
10. Желтенков, А.И. О чумном токсине, анатоксине, противочумной анти-токсической сыворотке и методах стандартизации их на белых мышах / А.И. Желтенков // Вестник микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. – 1939. – V. 17. – P. 272 – 301.
11. Золотарев, А.Г. Изучение локализации антигена Ф1 *Yersinia pestis* EB иммуноферритиновым методом / А.Г. Золотарев, В.А. Кедров, В.Н. Паутов // Журн. микробиол.. – 1983. – № 7. – С. 62 – 64.
12. Ибрагимов, А.Н. Хроматографические методы очистки белков: учебно - методическое пособие / А.Н. Ибрагимов, А.Г. Бикмуллин, Д.А. Сатаева, Л.В. Лопухов, Л.И. Зайнуллин, Ф.К. Алимова. – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. – 48 с.
13. Карлышев, А.В. Способ получения мутантов чумного микроба дефектных по синтезу капсульного антигена фракции I / А.В. Карлышев, В.И. Кравченко, В.М. Красильникова, А.П. Анисимов А. С. – № 1754779, кл. С 12 N 15/00. – Заявка № 4863570. Приоритет изобретения 22.06.90, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР 15.04.92.
14. Кац, Л.Н. О субмикроскопической структуре *Pasteurella pestis* / Л.Н. Кац // Журн. микробиол. – 1966. – № 7. – P. 84 – 86.
15. Классификация и номенклатура аминокислот по строению радикалов [электронный ресурс] // Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/6199358/page:2/> Последний визит 15.06.2018

- 16.Кутырев, В.В. Ультраструктура и локализация в переносчике / В.В. Кутырев, Н.П. Коннов, Ю.П. Волков. – М: Медицина. – 2007. – С. 222.
- 17.Платонов, М.Е. Молекулярное типирование *Yersinia pestis* / М.Е. Платонов, В.В. Евсеева, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – № 2. – С. 3–12.
- 18.Приложение 3: биологические агенты [электронный ресурс] // World Health Organization. Режим доступа: <http://www.who.int/en/>
- 19.Прокопьева, Е.Д. Изучение индукции интерлейкина - I и фактора некроза опухоли мышинными макрофагами под воздействием капсульного антигена возбудителя чумы. / Е.Д. Прокопьева, А.А. Прокопьев, С.Н. Дальвадянц // Микробиология, биохимия и специфическая профилактика карантинных инф. – 1990. – Саратов. – С. 77 – 84.
- 20.Проценко, О.А. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина 1, антигена фракция 1 и экзотоксина "мышинного" токсина / О.А. Проценко, П.И. Анисимов, О.Т. Можаров, Н.П. Коннов, Ю.А. Попов, А.М. Кокушкин // Генетика. – 1983. – V. 19. – С.1081 – 1090.
- 21.Проценко, О.А. Гетерогенность популяций штаммов возбудителя чумы по плазмидному составу / О.А. Проценко, А.А. Филиппов, В.В. Кутырев // Мол. генетика. // 1992. – № 3-4. –С. 20 – 24.
- 22.Руководство по профилактике чумы [Текст] : рук. / под общ. ред. Н. И. Николаева; Всесоюзный н.-и. противочумный ин-т "Микроб". – Саратов. – 1972. – 200 с.
- 23.Сердобинцев, Л.Н. Получение капсульного антигена методом одноэтапной гелевой фильтрации / Л.Н. Сердобинцев, Т.М. Тараненко, М.С. Веренков, А.В. Наумов // Вопросы профилактики природно-очаговых инфекций: Саратов. – 1983. – № 37 – 41с.
- 24.Степаншина, В.Н. Физико-химическая и биологическая характеристика рН 6 антигена *Yersinia pestis*, выделенного иммуносорбционным методом / В.Н. Степаншина, Т.А. Гремякова, А.П. Анисимов и др. // Мик-

- робиология, эпидемиология и иммунобиология. – 1993. – № 3. – с. 12–17.
25. Титенко, М.М. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации / М.М. Титенко, В.И. Вейнблат, М.С. Веренков, А.С. Васенин // Диагностика и профилактика ООИ. Саратов. – 1983. – С. 34 – 39.
26. Туроверов, К.К. Нативно глобулярные и нативно частично или полностью неупорядоченные белки. Фолдинг, образование надмолекулярных комплексов, агрегация/ К.К. Туроверов, В.Н. Уверский, И.М. Кузнецова // Цитология. – 2009. – Т.51. – №3. – С. 190 – 203.
27. Тюлембаев, М.А. Влияние аминокислот, витаминов, урацила и некоторых солей на синтез фракции 1 чумного микроба / М.А. Тюлембаев, Б.Б. Атчабаров, О.С. Соорбеков // Патологическая физиология, иммунология и аллергология ООИ.– 1984. – С. 27 – 30.
28. Филиппов, А.А. Изучение плазмидного состава штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов / А.А. Филиппов, Н.С. Солодовников, Л.М. Куклева, О.А. Проценко // Микробиология. – 1992. – № 3. – С.10 – 13.
29. Фолдинг белка [электронный ресурс] // Википедия. – 2017. Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Фолдинг_белка
30. Abramov, V.M. Structural and functional properties of *Yersinia pestis* Caf1 capsular antigen and their possible role in fulminant development of primary pneumonic plague / V.M. Abramov, A.M. Vasiliev, V.S. Khlebnikov *et al.* // Proteome Res. – 2002. – Vol. 1. – P. 307 – 315.
31. Achtman, M. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. / M. Achtman, G. Morelli, P. Zhu, *et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 17837–17842.
32. Achtman, M. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* / M. Achtman, G. Morelli, P. Zhu, *et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – P. 14043–14048.

33. Anderson, G.W. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis* / G.W. Anderson, S.E. Leary, E.D. Williamson, R.W. Titball, S.L. Welkos, P.L. Worsham, A.M. Friedlander // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol. 64. – No. 11. – P. 4580-4585.
34. Anderson, K.L. An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesions / K.L. Anderson, J. Billington, D. Pettigrew *et al.* // *Molecular cell.* – 2004 a. – Vol. 101. – P. 647–657.
35. Andrews, G.P. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge / G.P. Andrews, D.G. Heath, G.W. Anderson, S.L. Welkos, A.M. Friedlander // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol.64. – P. 2180 – 2187.
36. Anisimov, A.P. Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis* / A.P. Anisimov, L.E. Lindler, G.B. Pier // *Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 17. – No. 2. – P. 434–464.
37. Anisimov, A.P. A novel mechanism of antibiotic resistance in plague? / A.P. Anisimov, I.A. Dyatlov // *Med. Microbiol.* – 1997. – Vol. 46. – P. 887 – 889.
38. 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, P.Kh. Kopylov, B.W. Segelke, A. Zemla, M.V. Telepnev, V.L. Motin // *Infect. Genet Evol.* – 2010. – Vol. 10. – No.1. – P.137 – 45.
39. Anisimov, A.P. The subcutaneous inoculation of pH 6 antigen mutants of *Yersinia pestis* does not affect virulence and immune response in mice / A.P. Anisimov, I.V. Bakhteeva, E.A. Panfertsev, T.E.Svetoch, T.B. Kravchenko, M.E. Platonov, G.M. Titareva, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, A.V. Rakin, K.K. Amoako, S.V. Dentovskaya // *Med. Microbiol.* – 2009. – Vol. 58. – P. 26-36.

40. Baker, E.E. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of the *Pasteurella pestis*. / E.E. Baker, H. Sommer, L.E. Foster, E. Meyer, K.F. Meyer // J. Immunol. – 1952. – Vol. 68. – P. 131 – 145.
41. Behrens, S. Periplasmic chaperones - preservers of subunit folding energy for organelle assembly / S. Behrens // Cell. – 2003. – V. 113. – P. 556 – 557.
42. Ben-Efraim, S. New antigenic component of *Pasteurella pestis* formed under specific conditions of pH and temperature / S. Ben-Efraim, M. Aronson, L. Bichowsky-Slomnicki // J. Bacteriol. – 1961. – Vol. 81. – P. 704–714.
43. Bennett, L.G. Characterization of the antigenic subunits of the envelope protein of *Yersinia pestis* / L.G. Bennett, T.G. Tornabene // J. Bacteriol. – 1974. – Vol. 117. – P. 48 – 55.
44. Bertin, Y. The ClpE protein involved in biogenesis of the CS31A capsule-like antigen is a member of a periplasmic chaperone family in Gram-negative bacteria / Y. Bertin, J.-P. Girardeau, M. Der Vartanian, C. Martin // FEMS Microbiol. Lett. – 1993. – Vol. 108. – P. 59 – 68.
45. Bichowsky-Slomnicki, L. Biological activities in extracts of *Pasteurella pestis* and their relation to the “ph 6 antigen” / L. Bichowsky-Slomnicki, S. Ben-Efraim // J. Bacteriol. – 1963. – Vol. 86. – No. 1. – P. 101-111.
46. Bos, K.I. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus / K.I. Bos, A. Herbig, J. Sahl, *et al.* // J. eLife. - 2016. – Vol. 12994. – P. 1–11.
47. Boyd, E.F. Analysis of the Type 1 Pilin Gene Cluster *fim* in *Salmonella*: Its Distinct Evolutionary Histories in the 5' and 3' Regions / E.F. Boyd, D.L. Hartl // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – No. 4. – P. 1301 – 1308.
48. Bramanti, B. Chapter 1 Plague: A Disease Which Changed the Path of Human Civilization / B. Bramanti, N. Chr. Stenseth, L. Walløe, X. Lei // *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective*, Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – Vol. 918 – P. 1 – 26.

49. Brubaker, R.R. Factors promoting acute and chronic diseases caused by *Yersinia* / R.R. Brubaker // Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 4. – No. 3. – P. 309–324.
50. Brubaker, R.R. The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence / R.R. Brubaker / Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 1972. – Vol. 57. – P. 111–158.
51. Cantor, N.F. In the Wake of the Plague: The Black Death and the World it Made / N.F. Cantor. – New York: Harper Perennial. – 2001.
52. Cavanaugh, D. The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague / D.C. Cavanaugh, R. Randall // J. Immunol. – 1959. – Vol. 83. – P. 348–363.
53. Chapman, D.A. Structural and functional significance of the FGL sequence of the periplasmic chaperone Caf1M of *Yersinia pestis* / D.A. Chapman, A.V. Zavialov, T.V. Chernovskaya, A.V. Karlyshev, G.A. Zav'yalova, A.M. Vasiliev, I.V. Dudich, V.M. Abramov, V.P. Zav'yalov, S. MacIntyre // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P. 2422 – 2429.
54. Charnetzky, W.T. Survival and growth of *Yersinia pestis* within macrophages and on 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.
55. Chen, T.H. Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* type I / T.H. Chen, S.S. Elberg // Infect. Immun. – 1977. – Vol. 15. – P. 972 – 977.
56. Chichester, J.A. A single component two-valent LcrV-F1 vaccine protects non-human primates against pneumonic plague / J.A. Chichester *et al.* Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – P. 3471–3474.
57. Clegg, S. More than one way to control hair growth: regulatory mechanisms in enterobacteria that affect fimbriae assembled by the chaperone/usher

- pathway / S. Clegg, J. Wilson, J. Johnson // *J. Bacteriol.* – 2011. – Vol. 193. – No. 9. – P.2081-2088.
- 58.Cornelis, G.R. The *Yersinia* deadly kiss / G.R. Cornelis // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180. – P. 5495 – 5504.
- 59.Cornelius, C. Protective immunity against plague / C. Cornelius, L. Quenee, D. Anderson, O. Schneewind // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2007. – Vol. 603. – P. 415– 424.
- 60.Crocker, T.T. Electron microscopic study of the extracellular materials of *Pasteurella pestis* / T.T. Crocker, T.H. Chen, K.F. Meyer // *J. Bacteriol.* – 1956. – Vol.72. – P. 851 – 857.
- 61.Cui, Y. Genotyping and Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: Insights into the Worldwide Expansion of Central Asia Plague Foci / Y. Cui, Y. Li, Y. Hauck *et al.* // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4. – No. 5. – P.1 – 9.
- 62.Cui, Y. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis* / Y. Cui, C. Yu, Y. Yan, D. Li, Y. Li, T. Jombart, *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* . – 2013. – Vol. 110. – No. 2. – P.577 – 82.
- 63.Cui, Y. Insight into Microevolution of *Yersinia pestis* by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / Y. Cui, Y. Li, O. Gorge *et al.* // *PLoS ONE.* – 2008. – Vol. 3. – P.1 – 10.
- 64.DeBord, K.L. Immunogenicity and protective immunity against bubonic plague and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of LcrV / K.L. DeBord, D.M. Anderson, M.M. Marketon, K.A. Overheim, R.W. DePaolo, N.A. Ciletti, B. Jabri, O. Schneewind // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol. 74. – P. 4910–4914.
- 65.Deng, W. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. / W. Deng *et al.* // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – P. 4601– 4611.
- 66.Dennis, D.T. Plague manual: epidemiology, distribution surveillance and control / D.T. Dennis, K.L. Gage, N. Gratz, J.D. Poland, E. Tikhomirov // *Epidémiologie, répartition, surveillance et lutte.* – 1999. – Vol. 74. – P. 51 – 52.

67. Dentovskaya, S.V. Molecular bases of vaccine-prevention of plague / S.V. Dentovskaya, P.K. Kopylov, S.A. Ivanov, S.A. Ageev, A.P. Anisimov // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. – 2013. – Vol. 28. – No. 3. – P. 87 – 98.
68. 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.K. Kopylov, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, R.Z. Shaikhutdinova, L.V. Kolombet, S. Chauhan, V.G. Ablamunits, V.L. Motin, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – No. 12.
69. 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.K. Kopylov, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, R.Z. Shaikhutdinova, L.V. Kolombet, S. Chauhan, V.G. Ablamunits, V.L. Motin, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – No.12.
70. Dodd, D.C. Eisenstein B.I. Dependence of secretion and assembly of type 1 fimbrial subunits on normal protein export / D.C. Dodd, B.I. Eisenstein // *J. Bacteriol.* – 1984. – Vol.159. – P. 1077 – 1079.
71. Dosztanyi, Z. ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins / Z. Dosztanyi, B. Meszaros, I. Simon // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25. – No. 20. – P. 2745–2746.
72. Drozdov, I.G. Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis / I.G. Drozdov, A.P. Anisimov, S.V. Samoilo, I.N. Yezhov, S.A. Yeremin, A.V. Karlyshev, V.M. Krasilnikova, V.I. Kravchenko // *Med. Microbiol.* – 1995. – Vol. 42. – No.4. – P. 264 – 268.
73. Du, Y. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis / Du, Y., R. Rosqvist, A. Forsberg // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – No.3. – P. 1453 – 1460.

74. Duplantiera, J.M. From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence / J.B. Ducheminc, S. Chanteauc, E. Carnield // *Veterinary res.* – 2005. – Vol. 36. – No. 3. – P.437- 453.
75. Felek, S. Characterization of Six Novel Chaperone / Usher Systems in *Yersinia pestis* / S. Felek, L. M. Runco, D.G. Thanassi, E. S. Krukoni. – Part of the *Advances in Experimental Medicine and Biology* book series. – 2011. – P. 97 – 105.
76. Felek, S. Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate YOP delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence/ S. Felek, T.M. Tsang, E.S. Krukoni // *Infect. Immun.* – 2010. – Vol. 78 – No. 10. – P. 4134-4150.
77. Feodorova, V.A. Plague vaccines: current developments and future perspectives / V.A. Feodorova, V.L. Motin // *Emerg Microbes Infect.* – 2012. – Vol. 1. – No. 11. – P.1 – 5.
78. Finlay, B.B. Common themes in microbial pathogenicity revisited / B.B. Finlay, S. Falkow // *Microbiol. Mol. Biol.* – 1997. – R. 61. – P. 136-169.
79. Finney, D.J. *Statistical method in biological assay* / Finney, D.J. // Charles Griffin London. – 1978.
80. Finzel, B.C. Crystal structure of recombinant human interleukin-1 β at 2.0 Å resolution / B.C. Finzel, L.L. Clancy, D.R. Holland, S.W. Muchmore, K.D. Watenpugh, H.M. Einspahr // *J.Mol. Biol.* – 1989. – Vol. 209. – No. 4. – P. 779-791.
81. Friedlander, A.M. Relationship between virulence and immunity as revealed in recent studies of the F1 capsule of *Yersinia pestis* / A.M. Friedlander, S.L. Welkos, P.L. Worsham, G.P. Andrews, D.G. Heath, G.W. Anderson, Jr., M.L. Pitt, J. Estep, K. Davis // *Clin. Inf. Dis.* – 1995. – Vol. 21 (Suppl. 2). – P. S178 - S181.
82. Fukuto, H.S. A single amino acid change in the response regulator phop, acquired during *Yersinia pestis* evolution, affects phop target gene transcription and polymyxin b susceptibility / H.S. Fukuto, V. Vadyvaloo, J.B.

- McPhee, H.N. Poinar, E.C. Holmes, J.B. Bliska. // *J. Bacteriol.* – 2018. – Vol. 200. – No. 9. – P. 00050 – 18.
83. Gage, K. L. NATURAL HISTORY OF PLAGUE: Perspectives from More than a Century of Research / K. L. Gage, M. Y. Kosoy // *Annual Review of Entomology.* – 2005. – Vol. 50. – P. 505-528.
84. Galen, J.E. A bivalent typhoid live vector vaccine expressing both chromosome - and plasmid-encoded *Yersinia pestis* antigens fully protects against murine lethal pulmonary plague infection / J.E. Galen, J.Y. Wang, J.A. Carrasco, S.A. Lloyd, G. Mellado-Sanchez, J. Diaz-McNair, *et al.* // *Infect. Immun.* – 2015. – Vol. 83. – No. 1. – P.161–172.
85. Galyov, E.E. Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. Putative T and B cell epitopes / E.E. Galyov, O.Yu. Smirnov, A.V. Karlishev, K.I. Volkovoy, A.I. Denesyuk, I.V. Nazimov, K.S. Rubtsov, V.M. Abramov, S.M. Dalvadyanz, V.P. Zav'yalov // *FEBS Letters.* – 1990. – Vol. 227. – P. 230 – 232.
86. Garcia, E. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union / E. Garcia, P. Chain, P. Worsham, S.W. Bearden, S. Malfatti, D. Lang, F. Larimer, L. Lindler // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2007. – Vol. 603. – P. 17 – 22.
87. Golubov, A. Structural organization of the pFra virulence-associated plasmid of rhamnose-positive *Yersinia pestis* / A. Golubov, H. Neubauer, C. Noelting, J. Heesemann, A. Rakin // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – P. 5613 – 5621.
88. Gupta, G. Cell-Mediated Immune Response and Th1/Th2 Cytokine Profile of B-T Constructs of F1 and V Antigen of *Yersinia pestis* / G. Gupta, A. A. Khan, D. N. Rao // *Immunology.* – 2010. – V.71. – N.3. – P.186 - 198.
89. Haiko, J. The single substitution I259T, conserved in the plasminogen activator Pla of pandemic *Yersinia pestis* branches, enhances fibrinolytic activity / J. Haiko, M. Kukkonen, J.J. Ravantti, B. Westerlund-Wikström, T.K. Korhonen // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191. – No. 15. – P. 4758 – 4766.

90. Hatkoff, M. Roles of Chaperone/Usher Pathways of *Yersinia pestis* in a Murine Model of Plague and Adhesion to Host Cells Infect. Immun. / M. Hatkoff, L.M. Runco, C. Pujol, I. Jayatilaka, M. B. Furie, J.B. Bliska, D.G. Thanassi // Infect. Immun. – 2012. – Vol. 80. – P. 3490 – 3500.
91. Hoschützky, H. Isolation and characterization of the alpha-galactosyl-1, 4-beta-galactosyl-specific adhesin (P adhesin) from fimbriated *Escherichia coli* / H. Hoschützky, F. Lottspeich K., Jann // Infect. Immun. – 1989. – Vol. 57. – No. 1. – P. 76-81.
92. Hospenthal, M.K. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria / M.K. Hospenthal, TRD Costa, G. Waksman // Nat Rev Microbiol. – 2017. – Vol. 15. – No. 6. – P.365 – 379.
93. Huang, S.S. Development of *Yersinia pestis* F1 antigen-loaded microspheres vaccine against plague / S.S. Huang, I.H. Li, P.D. Hong, M.K. Yeh // Int J Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9. – P.813 – 822.
94. Huang, X.Z. The pH6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen / X.Z. Huang, L.E. Lindler // Infect. Immun. – 2004. – Vol. 14. – P. 7212–7219.
95. Hultgren, S.J. Utility of the immunoglobulin-like fold of chaperones in shaping organelles of attachment in pathogenic bacteria / S.J. Hultgren, C.H. Jones // ASM News: The chaperone/usher pathway is a paradigm of certain facets of organelle development.– 1995. – Vol. 61. – P. 457 – 464.
96. Hung, D.L. Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones / D.L. Hung, S.D. Knight, R.M. Woods, J.S. Pinkner, S.J. Hultgren // EMBO. – 1996. – Vol. 15. – P. 3792 – 3805.
97. Janssen, W.A. The pathogenesis of plague. I. A study of the correlation between virulence and relative phagocytosis resistance of some strains of *Pasteurella pestis* / W.A. Janssen, W.D. Lawton, G.M. Fukui, M.J. Surgalla // J. Infect. Dis. – 1963. – Vol.113. – P. 139 – 143.
98. Jones, C. FimH adhesin of Type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae / C. Jones, J. Pinkner, , R. Roth, , J. Heuser,

- A. Nicholes, S. Abraham, S. Hultgren // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. . – 1995. – Vol. 92. – P. 2081 – 2085.
99. Joosten, S.A. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination / S.A. Joosten, T.H. Ottenhoff // Human J. Immunol. – 2008. – Vol. 69. – No. 11. – P. 760 – 770.
100. Kagan, B.L. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes/ B.L. Kagan, M.E. Selsted, T. Ganz, R.I. Lehrer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. . – 1990. – Vol. 87. – P. 210 – 214.
101. Karlyshev, A. Structure and regulation of a gene cluster involved in capsule formation of *Yersinia pestis*, In Jos A.F. Op den Kamp (ed.), Biological membranes: structure, biogenesis and dynamics / A. Karlyshev, E. Galyov, O. Smirnov, V. Abramov, V.P. Zav'yalov. – Berlin, Germany Series H: Cell Biology. – 1994. – Vol. 82. – P. 321 – 330.
102. Karlyshev, A. V. A new gene of the f1 operon of *Y. pestis* involved in the capsule biogenesis / A. V. Karlyshev, E. E. Galyov, O. Smirnov, A. P. Guzayev, V. M. Abramov, V. P. Zav'yalov // FEBS Letters. – 1992. – V.297. – P.77 – 80. Gupta, G. Cell-Mediated Immune Response and Th1/Th2 Cytokine Profile of B-T Constructs of F1 and V Antigen of *Yersinia pestis* / G. Gupta, A. A. Khan, D. N. Rao // J. Immunol. – 2010. – Vol. 71. – No. 3. – P.186 - 198.
103. Kirillina, O. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis* / O. Kirillina, J.D. Fetherston, A.G. Bobrov, J. Abney, R. D. Perry // Mol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54. – No 1. – P. 75 – 88.
104. 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 // Genom A. – 2015. – Vol. 3. – P.1 – 2.

105. Klemm, P. The export systems of type 1 and F1C fimbriae are interchangeable but work in parental pairs / P. Klemm, B.J. Jørgensen, B. Kreft, G. Christiansen // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177. – P. 621 – 627.
106. Knight, S.D. Bacterial adhesins: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis / S.D. Knight, J. Berglund, D. // *Chem. Biol.* – 2000. – Vol. 4. – P. 653 – 660.
107. Knight, S.D. Bacterial adhesins: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis / S.D. Knight, J. Berglund, D. Choudhury // *Chem. Biol.* – 2000. – Vol. 4. – P. 653–660.
108. Korotkova, N. Crystal structure and mutational analysis of the DaaE adhesin of *Escherichia coli* / N. Korotkova, I. Le Trong, R. Samudrala, K. Korotkov, C.P. Van Loy, Bui A-L, S.L. Moseley, R.E. Stenkamp // *Biol. Chem.* – 2006 b. – Vol. 281. – P. 22367–22377.
109. Korotkova, N. Selection for functional diversity drives accumulation of point mutations in Dr adhesins of *Escherichia coli* / N. Korotkova, S. Chattopadhyay, T. A. Tabata, *et al.* // *Mol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 64. – No. 1. – P. 180 – 194.
110. Krakauer, T. Lack of IL-1 receptor antagonistic activity of the capsular F1 antigen of *Yersinia pestis* / T. Krakauer, D. Heath // *J. Immunol Letters.* – 1998. – Vol. 60. – No. 2 – 3. – P. 137-142.
111. Kuehn, M.J. Pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips / M.J. Kuehn, J. Heuser, S. Normark, S.J. Hultgren // *Nature.* – 1992. – Vol. 356. – P. 252–255.
112. Lawton, W.D. Studies on the antigens of *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis* / W.D. Lawton, G.W. Fukui, M.G. Surgalla // *J. Immunol.* – 1960. – Vol. 84. – P. 475 – 479.
113. Levi, M.I. Use of monoclonal antibodies in the ELISA to prove the monovalence of the antigen / M.I. Levi, Y.Y. Vengerov, D.V. Volkov, M.M. Livshits, L.N. Apanovsky, S.N. Kurochkin, P.G. Sveshnikov // *Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 1984. – Vol. 11 – P. 84–88.

- 114.Lindler, L.E. *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. / L.E. Lindler, M.S. Klempner, S.C. Straley // Infect. Immun. – 1990. – Vol. 58 – No. 8. – P. 2569-2577.
- 115.Lindler, L.E. *Yersinia pestis* pH6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages / L.E. Lindler, B.D. Tall // Mol. Microbiol. – 1993. – Vol. 8. – P. 311–324.
- 116.Liu, F. Effects of Psa and F1 on the adhesive and invasive interactions of *Yersinia pestis* with human respiratory tract epithelial cells / F. Liu, H. Chen, E.M. Galvan, M.A. Lasaro, D.M. Schifferli // Infect. Immun. – 2006. – Vol. – P.5636 –5644.
- 117.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. – No. 11. – P. 1907 – 1912.
- 118.Macintyre, S. An extended hydrophobic interactive surface of *Yersinia pestis* Caf1M chaperone is essential for subunit binding and F1 capsule assembly / S. Macintyre, I.M. Zyrianova, T.V. Chernovskaya, M. Leonard, E.G. Rudenko, V.P. Zav'yalov, D.A. Chapman // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P. 12 – 25.
- 119.Makoveichuk, E. pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes / E. Makoveichuk, P. Cherepanov, S. Lundberg, A. Forsberg, G. Olivecrona // Lipid Res. – 2003. – Vol. 44. – P. 320–330.
- 120.Meszaros, B. Prediction of protein binding regions in disordered proteins / B. Meszaros, I. Simon, Z. Dosztanyi // PLoS Comp. Biol.. – 2009. – Vol. 5 – No. 5. – e1000376.
- 121.Morelli, G. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity / G. Morelli, Y. Song, C.J. Mazzoni, M. Eppinger, P. Roumagnac, D.M. Wagner, *et al.* // Nat. Genetics. 2010. – Vol. 42. – No. 12. – P.1140 –11433

122. Musson, J.A. Sequential proteolytic processing of the capsular Caf1 antigen of *Yersinia pestis* for MHC class II-restricted presentation to t lymphocytes / J.A. Musson, M. Morton, N. Walker, H.M. Harper, H.V. McNeill, E.D. Williamson, J.H. Robinson // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 26129 – 26135.
123. Neubauer, H. Mapping of B-cell epitopes of the F1 capsular antigen of *Y. pestis* / H. Neubauer, S. Aleksis, H. Meyer, W.D. Splettstoesser // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*. – 1998. – Vol. 6 (Suppl. II). – P. 10 – 11.
124. Nishiyama, M. Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD / M. Nishiyama, R. Horst, O.T. Eidam *et al.* // *The EMBO.* – 2005. – Vol. 24. – P.1–12.
125. Oyston, P.C. Modern Advances against Plague / P.C. Oyston, Williamson E.D. // *Advances in applied microbiology.* – 2012. – V. 81. – P. 209–241.
126. Parkhill, J. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague / J. Parkhill, B. W. Wren, B. G. Barrell // *Nature.* – 2001. – Vol. 413. – P. 523–527.
127. Peng, K. Optimizing long intrinsic disorder predictors with protein evolutionary information / K. Peng, S. Vucetic, P. Radivojac, C.J. Brown, A.K. Dunker, Z. Obradovic // *jbc.* – 2005. – Vol. 3. – No. 01. – P. 35 – 60.
128. Perry, R.D. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague / R.D. Perry, J.D. Fetherston // *Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 10. – P. 35 – 66.
129. Pettigrew, D. High resolution studies of the Afa / Dr adhesin DraE and its interaction with chloramphenicol / D. Pettigrew, K.L. Anderson, J. Billington *et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 46851–46857.
130. Pirt, S.T. The influence of environment on antigen production by *Pasteurella pestis* studies by means of the continuous flow culture technique / S.T. Pirt, E.T. Theckerey, R. Harris-Smith // *Microbiol.* – 1961. – Vol. 25. – P. 119 – 130.

131. Platonov, M.E. Polymorphism of the Cysteine Protease YopT from *Yersinia pestis* / M.E. Platonov, T.E. Svetoch, V.V. Evseeva, A.I. Knyazeva, S.V. Dentovskaya, V.L. Motin, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *Protein Pept Lett.* – 2016. – Vol. 23. – No.4. – P. 379 – 385.
132. Pradel, E. New insights into how *Yersinia pestis* Adapts to its mammalian host during bubonic plague / E. Pradel, N. Lemaître, M. Merchez, I. Ricard, A. Reboul, A. Dewitte, F. Sebban // *PLoS Pathogens.* – 2014. – Vol. 10. – No. 3. - e1004029.
133. Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins [электронный ресурс] // ANCHOR. Режим доступа: <http://anchor.enzim.hu/pred.php>
134. Protsenko, O.A. Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into *Yersinia pestis* chromosome / O.A. Protsenko, A.A. Filippov, V.V. Kutyrev // *Microb. Pathogen.* –1991. – Vol. 11. – P. 123 – 128.
135. Quenee, L.E. Plague vaccines and the molecular basis of immunity against *Yersinia pestis* / L.E. Quenee, O. Schneewind // *HumVaccin.* – 2009. – Vol. 1– No. 11. – P. 817 – 823.
136. Quenee, L.E. *Yersinia pestis* caf1 variants and the limits of plague vaccine protection / L.E. Quenee, C.A. Cornelius, N.A. Ciletti, D. Elli, O. Schneewind // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76. – No. 5. – P. 2025 – 2036.
137. Reddin, K.M. Large-scale purification of the F1 antigen of *Yersinia pestis* / K.M. Reddin, T.J. Easterbrook, A. Robinson, D. Williamson, R. Rhind-tutt // *Contrib. Microbiol. Immunol.* – 1995. – Vol. 13. – P. 329 – 330.
138. Remaut, H. Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted b strand displacement mechanism / H. Remaut, , R.J. Rose, T.J. Hannan, S.J. Hultgren, S.E. Radford, A.E. Ashcroft, G. Waksman // *Molecular cell.* – 2006. – Vol. 22. – P. 831–842.
139. Revazishvili, T. Characterisation of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries / T. Revazishvili, C .Rajanna, L. Bakanidze, N.

- Tsertsvadze, P. Imnadze, K. O'Connell, A. Kreger, O.C. Stine, Jr J. G. Morris, A. Sulakvelidze // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2008.- Vol. 14. – P. 429 – 436.
- 140.Rodrigues, C.G. Antigen F1 from *Yersinia pestis* forms aqueous channels in lipid bilayer membranes / C.G. Rodrigues, C.M. Carneiro, C.T. Barbosa, R.A. Nogueira // *Braz. J. Med. Biol.* – 1992. – Res. 25. – P. 75 – 79.
- 141.Romero, P. Sequence complexity of disordered protein / P. Romero, Z. Obradovic, X. Li, E.C. Garner, C.J. Brown, A.K. Dunker // *Proteins.* – 2001. – Vol. 42. – No.1. – P. 38 – 48.
- 142.Rowland, S. The morphology of the plague bacillus / S. Rowland // *J. Hyg.* –1914. – Vol. 13. P. – 418 – 422.
- 143.Runco, L.M. Biogenesis of the F1 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. – No.9. – P. 3381 – 3385.
- 144.Russell, A.D. Microbial susceptibility and resistance to biocides / A.D. Russell, J.R. Furr, J.-Y. Maillard // *ASM News.* – 1997. – Vol. 63. – P. 481 – 487.
- 145.Sauer, F.G. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment / F.G. Sauer, M. Barnhart, D. Choudhury, S.D. Knight, G. Waksman, S.J. Hultgren // *Current Opinion in Structural Biology.* – 2000. – Vol. 10. – P. 548–556.
- 146.Sauer, F.G. Fiber assembly by the chaperone – usher pathway / F.G. Sauer, H. Remaut, S.J. Hultgren, G. Waksman // *BBA.* – 2004. – Vol. 1694. – P. 259–267.
- 147.Sauer, F.G. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway / F.G. Sauer, H. Remaut, S.J. Hultgren, G. Waksman // *BBA.* –2004. – Vol. 1694. – No.1–3. – P. 259 – 67.
- 148.Schütze, H. Studies on *Bacterium pestis* antigens. III. The prophylactic value of the envelope and somatic antigens of *B. pestis* / H. Schütze // *Br. J. Exp. Pathol.* –1939. – Vol. 19. – P. 293 – 298.

149. Servin, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges / A. L. Servin // *Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 27. – No. 4. – P.823 – 869.
150. Shaban, H. Effect of natural polymorphism on structure and function of the *Yersinia pestis* outer membrane porin F (OmpF protein): a computational study / Shaban, H., I. Na, A.A. Kislichkina, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov, V.N. Uversky // *J Biomol Struct Dyn.* – 2017. – Vol. 35. – No. 12. – P. 2588-2603.
151. Simonet, M. Electron microscopic evidence for *in vivo* extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid / M. Simonet, S. Richard, P. Berche // *Infect. Immun.* – 1990. – Vol. 58. – P. 841 – 845.
152. Soto, G.E. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly / G.E. Soto, S.J. Hultgren // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181. – P. 1059–1071.
153. Starley, S.C. Growth in mouse peritoneal macrophages of *Yersinia pestis* lacking established virulence determinants / S.C. Starley, P.A. Harmon // *Infect. Immun.* – 1984. – Vol. 45. – No.3. – P. 649-654.
154. Thanassi, D.G. Surface organelles assembled by secretion systems of gram-negative bacteria: diversity in structure and function / D.G. Thanassi, J.B. Bliska, P.J. Christie // *FEMS microbiology reviews.* – 2012. – Vol. 36. – No. 6. – P. 1046 – 1082.
155. Thanassi, D.G. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway / D.G. Thanassi, E.T. Saulino, S.J. Hultgren // *Current opinion in microbiology.* – 1998. – Vol. 1. – P. 223–231.
156. Titball, R. W. *Yersinia pestis* (plague) vaccines / R. W. Titball, E. D. Williamson // *Expert Opinion on Biological Therapy.* – 2004. – Vol.4. – No. 6. – P. 965 – 973.

157. Titball, R.W. Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague / R.W. Titball, A.M. Howells, P.C.F. Oyston, E.D. Williamson // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65. – P. 1926 – 1930.
158. Titball, R.W. Vaccination against bubonic and pneumonic plague / R.W. Titball, E.D. Williamson // *Vaccine.* – 2001. – Vol. –19. – P. – 4175 – 4184.
159. Tomaras, A.P. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system / A.P. Tomaras, C.W. Dorsey, R.E. Edelman, L.A. Actis // *Microbiol.* – 2003. – Vol.149. – P. 3473 – 3484.
160. Tripathi, V. Inducing systemic and mucosal immune responses to B-T construct of F1 antigen of *Yersinia pestis* in microsphere delivery / V. Tripathi, K.T. Chitralkha, A.R. Bakshi, D. Tomar, R.A. Deshmukh, M.A. Baig, D.N. Rao // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24 – P. 3279–3289.
161. Uversky, V. N. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling / V. N. Uversky, C. J. Oldfield, A. K. Dunker // *J. Mol. Recognit.* – 2005. – Vol. 18. – P. 343 – 384.
162. V. Oss, C.J. Phagocytosis as a surface phenomenon / C.J. Van Oss // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1978. – Vol. 32. – P. 19 – 39.
163. Vandemaele, F. Sequence analysis demonstrates the conservation of fimH and variability of fimA throughout avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) / F. Vandemaele, D. Vandekerchove, M. Vereecken, J. Derijcke, M. Dho-Moulin, B.M. Goddeeris, // *Veterinary research.* – 2003. – Vol. 34. – No. 2. – P.153 – 163.
164. Vogler, A.J. Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar / A.J. Vogler, F. Chan, D.M. Wagner, P. Roumagnac, J. Lee *et al* // *Plos Neglected Tropical Diseases.* – 2011. – Vol. 5. – No. 9. – P.1319.

165. Waksman, G. Structural biology of the chaperoneusher pathway of pilus biogenesis / G. Waksman, S.J. Hultgren // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2009. – Vol. –7. – P.–765–774.
166. Walker, R.V. Studies on the immune response of guinea pigs to the envelope substance of *P. pestis*. II. Fluorescent antibody studies of cellular and tissue response in mice and guinea pigs to large doses of fraction I / R.V. Walker // *J. Immunol.* – 1962. – Vol. 88. – P. 164 – 173.
167. Weissman, S. J. Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* / S. J. Weissman, S. Chattopadhyay, P. Aprikian, *et al.* // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59. – No.3. – P. 975 – 988.
168. Williams, R.C. Effects of fraction 1 from *Yersinia pestis* on phagocytosis *in vitro* / R.C. Williams, H. Gewurz, P.G. Quie // *J. Infect. Dis.* – 1972. – Vol. 126. – P. 235 – 241.
169. Williamson E. D. Vaccines against dangerous pathogens / E. D. Williamson, R. W. Titball // *British Medical Bulletin.* – 2002. – Vol. 62. – No.1. – P. 163 - 173.
170. Xue, B. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids / B. Xue, R.L. Dunbrack, R.W. Williams, A.K. Dunker, V.N. Uversky // *BBA.* – 2010. – Vol. 1804. – No. 4. – P. 996 – 1010.
171. Yang, Y. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells / Y. Yang, J.J. Merriam, J.P. Mueller, R.R. Isberg // *Infect. Immun.* – 1996. – V. 64. – P. 2483–2489.
172. Yersin, A. La peste bubonique à Hong-Kong / A. Yersin // *Ann. Inst. Pasteur.* – 1894. – Vol. 8. – P.662 – 667.
173. Yu, X. Caf1A usher possesses a Caf1 subunit-like domain that is crucial for Caf1 fibre secretion / X. Yu, G. R. Visweswaran, Z. Duck, S. Marupakula, S. MacIntyre, S. D. Knight, A.V. Zavialov // *Biochemical.* – 2009. – Vol. 418. – No. 3. – P. 541 – 551.

- 174.Zav'yalov, V. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/ usher machinery: structure and function from a clinical standpoint / V. Zav'yalov, A. Zavialov, G. Zav'yalova, T. Korpela // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. –34. – P. – 317–378.
- 175.Zav'yalov, V.P. Modelling of steric structure of a periplasmic molecular chaperone Caf1M of *Yersinia pestis*, a prototype member of a subfamily with characteristic structural and functional features / V.P. Zav'yalov, G.A. Zav'yalova, A.I. Denesyuk, T. Korpela // FEMS Immunology and Med. Microbiol. – 1995 b. – Vol. 11. – P. 19–24.
- 176.Zav'yalov, V.P. pH6 antigen (PsaA protein) of *Yersinia pestis*, a novel bacterial Fc-receptor / V.P. Zav'yalov, V.M. Abramov, P.G. Cherepanov, G.V. Spirina, T.V. Chernovskaya, A.M. Vasiliev, G.A. Zav'yalova // FEMS Immunol. and Med. Microbiol. – 1996. – Vol. 14. – P. 53–57.
- 177.Zavialov, A.V. A novel self-capping mechanism controls aggregation of periplasmic chaperone Caf1M / A.V. Zavialov, S.D. Knight // Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 64. – P. 153–164.
- 178.Zavialov, A.V. Resolving the energy paradox of chaperone-mediated fibre assembly / A.V. Zavialov, V.M. Tischenko, L.J. Fooks, B.O. Brandsdal, J. Aquist, V.P. Zav'yalov, S. MacIntyre, S.D. Knight // Biochemical. – 2005. – Vol. 389. – P. 685–694.
- 179.Zavialov, A.V. Secretion of recombinant proteins via the chaperone/usher pathway in *Escherichia coli* / N.V. Batchikova, T. Korpela, L.E. Petrovskaya, V.G. Korobko, J. Kersley, S. MacIntyre, V.P. Zav'yalov // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. – P. 1805–1814.
- 180.Zavialov, A.V. Structure and Biogenesis of the Capsular F1 Antigen from *Yersinia pestis* / A.V. Zavialov, J. Berglund, A. F. Pudney, L. J. Fooks, T.M. Ibrahim, S.M. *et al.* // Cell. – 2003. – Vol. 13. – No.5. – P.587 – 596.
- 181.Zav'yalov, A.V. Donor strand complementation mechanism in the biogenesis of non-pilus systems / A.V. Zavialov, J. Kersley, T. Korpela, V.P.

- Zav'yalov, S. MacIntyre, S.D. Knight // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 45. – P. 983 – 995.
- 182.Zav'yalov, V.P. Molecular modeling of the steric structure of the envelope F1 antigen of *Yersinia pestis* / V.P. Zav'yalov, A.I. Denesyuk, G.A. Zav'yalova, T. Korpela // *Immunology letters.* – 1995. – Vol. 45. – P. 19 – 22.
- 183.Zav'yalov, V.P. Specific high affinity binding of human interleukin 1 β by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis* / V.P. Zav'yalov, T.V. Chernovskaya, E.V. Navolotskaya, A.V. Karlyshev, Sh. MacIntyre, A.M. Vasiliev, V.M. Abramov // *FEBS Letters.* – 1995. – Vol. 371. – P. 65 – 68.
- 184.Zhang, X. Kinetics of memory B cell and plasma cell responses in the mice immunized with plague vaccines / X. Zhang, , Q. Wang, Y. Bi, Z. Kou, J. Zhou, Y. Cui, *et al.* // *Scand J Immunol.* – 2014. – Vol. 79. – No.3. – P.157–162.
- 185.Zhou, D. Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis* / D. Zhou, Y. Han, Y. Song *et al.* // *Microbes and Infection.* – 2004. – Vol. 6. – No.13. – P. 1226–1234.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК:

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**, М.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* / А.А. Kislichkina, А.Г. Bogun, **L.A. Kadnikova**, N.V. Maiskaya, М.Е. Platonov, N.V. Anisimov, E.V. Galkina, S. V. Dentovskaya, А. Р. 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, М.Е. Platonov, V.G. Ablamunits, Т.І. Kombarova, S.A. Ivanov, **L.A. Kadnikova**, А.N. Somov, S.V. Dentovskaya, V.N. Uversky, А.Р. Anisimov // PLOS ONE. – 2016. – V.11 (9). WoS 2017 IF=2.766.
5. Кисличкина, А. А. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновного подвигов 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 // принято в печать Мо-

лекулярная 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* (O.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 // принято в печать журнал 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. Kislichkina, А.Г. Bogun, **Л.А. Kadnikova**, N.V. Maiskaya, V. I. Solomentsev, S.V. Dentovskaya, М.Е. Platonov, N.V. Anisimov, E.V. Galkina, S. V. Dentovskaya, A. P. Anisimov // Genome Announc. –2017. – V. 5. – P.1-2.

в) тезисы научных конференций

8. 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.

9. **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 «Совре-

менные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-Петербург 08-10 декабря, 2015 г.). – 2015. – С.132-133.

10. **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.

11. 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.

12. **Кадникова, Л.А.** Изучение иммуногенной активности изоформ Caf1 *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.

Приложение А

Характеристика штаммов, использованных в работе

Номер штамма (особое название)	Характеристика	Источник получения и (или) ссылка на литературу
1	2	3
<i>Yersinia pestis</i> subsp. <i>pestis</i>		
231(708) bv. <i>antiqua</i>	“дикий тип”, выделен в 1947 г. от сурка Аксайском горном природном очаге № 33 Вирулентный (при подкожном заражении для мышей LD ₅₀ = 10 КОЕ, для морских свинок LD ₅₀ = 10 КОЕ); NT1 аллель <i>cafI</i>	РКПБ "Микроб"
EV линия НИИЭГ bv. <i>orientalis</i>	<i>Δpgm</i> , вакцинный; линия EV, поддерживаемая в России для производства живой чумной вакцины; (GenBank: JVOL000000000.1); NT1 аллель <i>cafI</i>	ГИСК им. Л.А. Тарасевича
<i>Yersinia pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>altaica</i>		
2131	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от <i>Microti gregalis</i> , <i>Alicola strelzovi</i> , <i>Ochotona pallasii pricei</i> в 2000 г.	ГКПМ-Оболенск
A-513	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох пищух в 1961 г.	РостНИПЧИ
I-2359	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох <i>Neopsylla mana</i> из гнезда монгольской пищухи в 1973 г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-2377	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох <i>Stenophyllus hirticrus</i> , собранных с монгольских пищух в 1973 г.	РКПБ "Микроб"
I-3442	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох <i>A. runatus</i> , с очеса монгольской пищухи в 2001 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3443	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от монгольской пищухи в 2001 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3446	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох <i>P. scorodumovi</i> , из входов нор пищух монгольских в 2001 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3447	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох <i>P. scorodumovi</i> , из входов нор пищух монгольских в 2001 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3455	Выделен в Алтайском горном очаге № 36	ГКПМ-Оболенск
I-3467	Выделен в Алтайском горном очаге № 36	ГКПМ-Оболенск

Продолжение приложения А

1	2	3
I-3515	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блох <i>Amphalius runatus</i> с пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 2007 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3516	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от полевки плоскочерепной в 2007 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3517	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блохи <i>Paradoxopsyllus scorodumovi</i> с пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 2007 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3518	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блохи <i>Paradoxopsyllus scorodumovi</i> с пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 2007 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3519	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от блохи <i>Paradoxopsyllus scorodumovi</i> с пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 2007 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3547	Выделен в Алтайском горном очаге № 36 от пищухи монгольской в 2010 г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-2629	Выделен в Монголии, в Сайлюгемском очаге M01 в 1977 г.	ГКПМ-Оболенск
I-3214	Выделен в Сайлюгемском очаге M01 от блохи <i>Amphipsylla primaris</i> в 1987 г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-3252	Выделен в Сайлюгемском очаге M01 от блохи <i>Amphalius runatus</i> с пищух монгольских в 1990 г.	ГКПМ-Оболенск
162	Выделен в M20 очаге на территории Баян-Хонгорского аймака от органов павшей полевки Брандта	МЖК СтавНИПЧИ
2420	Выделен в M20 очаге на территории Баян-Хонгорского аймака от полевки Брандта в и1956 г.	МЖК СтавНИПЧИ
I-3132	Выделен в M20 очаге на территории Баян-Хонгорского аймака от полевки Брандта (<i>Lasiodromys brandti</i>) в 1984 г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-3134	Выделен в M20 очаге на территории Баян-Хонгорского аймака от полевки Брандта (<i>Lasiodromys brandti</i>) в 1984 г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-3088	Выделен в M27 очаге от полевки Брандта в Монголии в 1983 г.	МЖК ИркНИПЧИ
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>caucasica</i>		
AmvM 999	Выделен в Армении, Колтахчи, в 1958 г. от общественной полевки	ГКПМ-Оболенск
564 Ширак	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 в Армении от обыкновенной полевки в 1958 г.	РостНИПЧИ
852 Гризель	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 в Армении от блох <i>Stenophtalmus teres</i> в 1960 г.	РостНИПЧИ
C-111	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 в Армении от <i>Ceratophyllus consimilis</i> в 1965 г.	МЖК СтавНИПЧИ

Продолжение приложения А

1	2	3
С-273	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от обыкновенной полёвки в 1969 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-287	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от блохи <i>Ctenophthalmus teres</i> в 1970 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-290	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от блохи <i>Ctenophthalmus teres</i> в 1971 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-345	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от трупа обыкновенной полёвки в 1976 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-346	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от <i>Ctenophthalmus teres</i> из гнёзд в 1976 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-376	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от полевки общественной <i>Microti socialis</i> в 1958 г. Вирулентен для полевок и мышей (при подкожном заражении для мышей $LD_{50} = 5.0 \times 10^2$ КОЕ, для морских свинок $> 10^6$ КОЕ); NT2 аллель <i>caf1</i>	МЖК ИркНИПЧИ
С-376pCad⁻	Производный штамма С-376, лишенный плазмиды кальцийзависимости pCad; авирулентен	НИ
С-512	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от блох <i>Callopsylla caspia</i> в 1982 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-564	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 в Армении от блохи <i>Ctenophthalmus teres</i>	МЖК СтавНИПЧИ
С-586	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 в Армении от крастнохвостной песчанки в 1980 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-588	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 в Армении от блохи <i>Ct. teres</i> из гнезда обыкновенной полевки в 1981 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-590	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от блохи <i>Ct. teres</i> в 1983 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-591	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от блохи <i>C. caspia</i> (6 шт.) гнездо обыкновенной полевки в 1983 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-593	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от блохи <i>F. elata</i> (1 экз.) из гнезда обыкновенной полевки в 1982 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-594	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от блохи <i>Ct. teres</i> из гнезда обыкновенной полевки в 1982 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-98	Выделен в Ленинаканском горном очаге № 04 от обыкновенной полевки в 1964 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-265	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от <i>Ctenophthalmus wladimiri</i> в 1969 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-269	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от обыкновенной полевки в 1969 г.	МЖК СтавНИПЧИ

Продолжение приложения А

1	2	3
С-288	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от обыкновенной полевки в 1969 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-359	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от <i>C. caspia</i> в 1978 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-514	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от обыкновенной полевки в 1982 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-582	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от обыкновенной полевки в 1984 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-663	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от гамазовых клещей в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-664	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от обыкновенной полевки в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-666	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от <i>Frontopsylla elatae</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-77	Выделен в Присеванском горном очаге № 05 от 240 экз. <i>Stenophthalmus wladimiri</i> из гнезда обыкновенной полевки в 1962 г.	МЖК СтавНИПЧИ
1146	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от обыкновенной полевки в 1968 г.	РКПБ "Микроб"
С-102	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от <i>Stenophthalmus wladimiri</i> в 1964 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-103	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от от трупа обыкновенной полевки	МЖК СтавНИПЧИ
С-114	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от <i>Frontopsylla elata caucasica</i> в 1965 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-125	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от от краснохвостой песчанки в 1965 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-197	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от блохи из гнезд обыкновенной полевки в 1967 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-267	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от блохи из гнезд обыкновенной полевки в 1967 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-661	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от блохи <i>C. caspia</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-662	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от блохи <i>Ct. teres</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-67	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от <i>Frontopsylla elata caucasica</i> в 1962 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-68	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от блох <i>Amphipsylla rossica</i> в 1962 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-69	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от обыкновенной полевки в 1962 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-78	Выделен в Зангезуро-Карабахском горном очаге №6 от блох <i>C. caspia</i> из гнезда обыкновенной полевки в 1962 г.	МЖК СтавНИПЧИ

Продолжение приложения А

1	2	3
1680 P-	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7, авирулентный	РКПБ "Микроб"
1695	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от обыкновенной полёвки в 1962 г.	МЖК СтавНИПЧИ
377	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от мышь лесная в 1962 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-233	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от блох <i>C. consimilis</i> в 1968 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-234	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от блох <i>C. consimilis</i> в 1968 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-235	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от гамазовых клещей в 1968 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-291	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от блох <i>Cer. caspius</i> из гнезда обыкновенной полевки в 1971 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-519	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от блох <i>Cer. caspius</i> в 1982 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-585	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от блохи <i>Stenophtalmus wladimiri</i> из гнезда обыкновенной полевки в 1984 г.	МЖК ИркНИПЧИ
С-647	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от <i>N.iranus</i> (из гнезд песчанки Виноградова) в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-648	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от гамазовых клещей, из гнезд песчанок Виноградова в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-688	Выделен в Приараксинском низкогорном очаге №7 от блох <i>F. elata</i> в 1990 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-370	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от <i>C. caspia</i> (6 шт.) гнездо обыкновенной полевки в 1978г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-535	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от суспензииорганов обыкновенных полёвок в 1984г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-537	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от <i>St. golovi</i> 1 экз. из гнезда обыкновенных полевки в 1984	МЖК СтавНИПЧИ
С-538	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 30 экз. <i>C. turbidus</i> из гнезда обыкновенной полевки в 1984	МЖК СтавНИПЧИ
С-539	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 2 блох <i>C. caspius</i> с лесных мышей в 1984	МЖК СтавНИПЧИ
С-540	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 14 экз. <i>St. golovi</i> из гнезда обыкновенны полевки в 1984	МЖК СтавНИПЧИ

Продолжение приложения А

1	2	3
С-669	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блох <i>Ct. intermedius</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-671	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блох <i>Ct. golovi</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-675	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блох <i>Ct. intermedius</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-676	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блох <i>C. caspius</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-678	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блох <i>F. elata</i> в 1988 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-700	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 50 экз. норových блох <i>C. caspius</i> из гнезд обыкновенной полевки в 1995 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-707	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 14 экз. <i>C. intermedius</i> из гнезд обыкновенной полевки в 1996 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-709	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блох <i>F. elata</i> (17 экз.) собранных от гнезд обыкновенной полевки в 1996 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-712	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блох <i>Ct. intermedius</i> (57 экз.) собранных от гнезд обыкновенной полевки (14 шт.) в 1996 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-715	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 20 экз. <i>C. caspius</i> , собранных из гнезд обыкновенной полевки в 1996 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-716	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блох <i>F. elata</i> (20 экз.) собранных из гнезд обыкновенной полевки (37 шт.) в 1996 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-739	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 12 экз. <i>C. turbidus</i> из гнезд обыкновенной полевки в 1998 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-741	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от <i>M. turbidus</i> (3 шт.) из гнезд обыкновенной полевки в 1998 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-744	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от <i>F. elata</i> (12 экз.) из гнезд обыкновенной полевки в 1997 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-746	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от блохи из гнезд обьк. полевки в 1997 г.	МЖК СтавНИПЧИ
С-823	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 6 экз. <i>C. turbidus</i> из гнезд обыкновенных полевков в 2010 г.	МЖК СтавНИПЧИ

Продолжение Приложения А

1	2	3
С-824	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге №39 от 2 экз. <i>Fr.elata</i> , счесанных с трех обыкновенных полевков в 2010 г; Вирулентен для полевков и мышей (при подкожном заражении для мышей $LD_{50} < 2,0 \times 10^3$ КОЕ, для морских свинок $> 10^6$ КОЕ); NT3 аллель <i>cafI</i>	МЖК СтавНИПЧИ
С-824pCad ⁻	Производный штамма С-824, лишенный плазмиды кальцийзависимости pCad; авирулентен	НИ
С-825	Выделен в Восточно-Кавказском высокогорный очаге № 39 от 2 экз. <i>C. turbidus</i> , счесанных с 3 обыкновенных полевков в 2010 г.	МЖК СтавНИПЧИ
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>hissarica</i>		
5307-Gis	Выделен в Гиссарском высокогорном очаге чумы № 34 от <i>F. tlata vara</i> (из шерсти арчов. полевки) в 1979 г.	МЖК СтавНИПЧИ
А-1249	Выделен в Гиссарском высокогорном очаге чумы № 34 от полевки арчевой <i>Microti juldaschi</i> (группа зверьков) в 1970 г.	МЖК ИркНИПЧИ
А-1725	Выделен в Гиссарском высокогорном очаге чумы № 34 от сурка красного <i>Marmota caudata</i> (2 экз.) в 1972 г.	МЖК ИркНИПЧИ
А-1728	Выделен в Гиссарском высокогорном очаге чумы № 34 от в 1972 г.	МЖК ИркНИПЧИ
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>talassica</i>		
А-1802	Выделен в Таласском высокогорном очаге чумы № 40 от 11 экз. <i>C.caspia</i> из очеса красного сурка в 1980 г.	РКПБ "Микроб"
А-1804	Выделен в Таласском высокогорном очаге чумы № 40 от блохи <i>Pes. hemorosus</i> лесной мыши в 1980 г.	РостНИПЧИ
А-1807	Выделен в Таласском высокогорном очаге чумы № 40 от блохи <i>Neopsylla fereture</i> в 1980 г.	РостНИПЧИ
А-1820	Выделен в Таласском высокогорном очаге чумы № 40	РКПБ "Микроб"
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>ulegeica</i>		
I-2226	Выделен в Сайлюгемском очаге чумы M01 от блохи с <i>O. pricei Thom</i> в 1972 г.	ГКПМ-Оболенск
I-2231	Выделен в Сайлюгемском очаге чумы M01 из суспензии блох <i>Amphalius</i> , 33 экземпляра в 1972 г.	ГКПМ-Оболенск
I-2236	Выделен в Сайлюгемском очаге чумы M01 от пищухи даурской (<i>Ochotona dahurica</i>) в 1972 г.	ГКПМ-Оболенск

Продолжение приложения А

1	2	3
I-2238	Выделен в Сайлюгемском очаге чумы М01 от пищухи монгольской <i>Ochotona pricei</i> в 1972 г.	ГКПМ-Оболенск
I-2239	Выделен в Сайлюгемском очаге чумы М01 от пищухи монгольской <i>Ochotona pricei</i> в 1972 г.	ГКПМ-Оболенск
I-2422	Выделен в М02 – Бухен-Ульском природном очаге чумы от <i>Amphalius runatus</i> с <i>O. pricei</i> Thom. в 1974 г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-2836	Выделен в М02 – Бухен-Ульском природном очаге чумы от пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 1979 г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-2457	Выделен в Гурван-Сайханском М13 очаге чумы от пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 1973г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-2487	Выделен в Гурван-Сайханском М13 очаге чумы от пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 1974г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-3189	Выделен в Гурван-Сайханском М13 очаге чумы от пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 1986г.	МЖК ИркНИПЧИ
I-3190	Выделен в Гурван-Сайханском М13 очаге чумы от пищухи монгольской (<i>Ochotona pricei</i>) в 1986г.	МЖК ИркНИПЧИ

Приложение Б

Сравнение аминокислотных последовательностей белков CafI с помощью Vector NTI 10.0.1.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	18																																																																																																																																												
Y_pestis_1146caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_1680 P-caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_1695caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_A-1802talassica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-671caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-675caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-700caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-709caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-716caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-717caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-744caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-824caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T	T	A	T	A	T	L	V	E	P	A	R	I	L	T	Y	K	E	G	P	I	T	I	M	D	N	G	N	I	D	T	E	L	L	V	G	T	L	L	G	G	Y	K	T	G	T	T	S	V	N	F	D	A	A	G	D	P	M	Y	L	F	T	S	D	Q	G	N	N	H	Q	F	T	T	K	V	I	G	K	D	S	R	D	F	I	S	P	K	V	N	G	E	N	L	V	G	D	D	V	L	A	T	G	S	Q	D	F	F	V	R	S	I	G	S	K	G	G	K	L	A	A	G	R	Y	T	D	A	V	T	V	T	S	N	Q
Y_pestis_C-825caucasica	1	M	K	K	I	S	S	V	I	A	I	A	L	F	G	T	I	A	N	A	A	D	L	T	A	S	T																																																																																																																																				

Продолжение Приложения Б

Y_pestis_C-345caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-359caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-376caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-512caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-514caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-519caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-564caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-582caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-585caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-586caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-588caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-591caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-594caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-647caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-648caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-661caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-663caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-664caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-666caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-67caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-68caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-69caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-78caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_C-98caucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Y_pestis_M 999 Amvcaucasica	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGSPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ
Consensus	1	MKKISSVIAIALFGTIATANAADLTASTTATATLVEPARITLTYKEGAPITIMDNGNIDTELLVGLTLGGYKTGTTSTSVNFDAAAGDPHYLFTSQDGNHQTTRVIGKDSRDFDISPKVNGENLVGDDVVLATGSQDFFVRSIGSKGGKLAAGKYTDAVTVTVSNQ

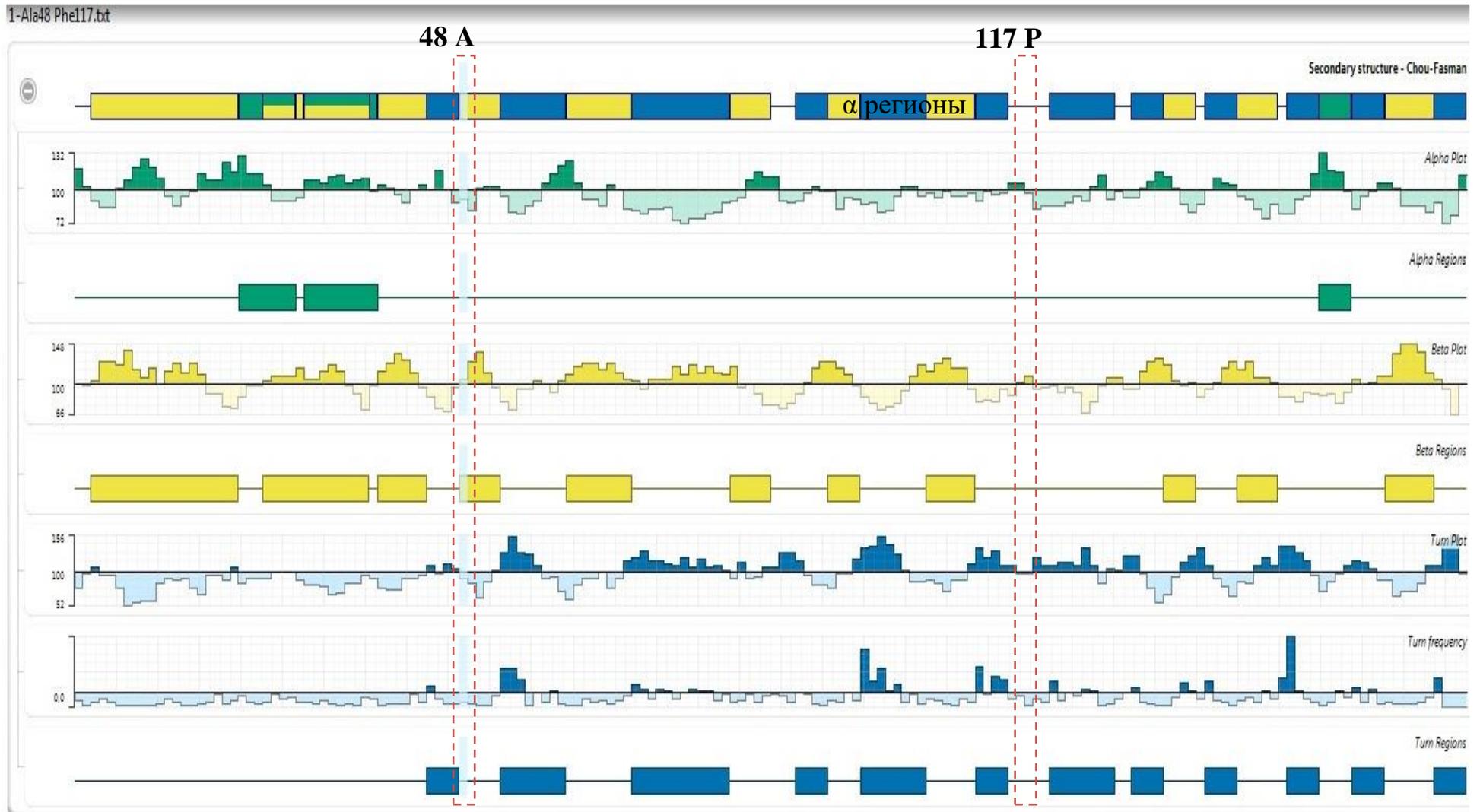
consensus positions: 99.4% identity positions: 98.2% aln: 171

* В левой части располагаются названия штаммов и биоваров *Y. pestis*; в левой части соответствующая каждому штамму аминокислотная последовательность; вверху находится линейка, в которой каждое деление соответствует позиции аминокислоты в последовательности; жёлтым цветом маркера выделены идентичные аминокислотные остатки; синим, зелёным и белом цветом выделены аминокислотные остатки, в которых обнаружен полиморфизм

Приложение В

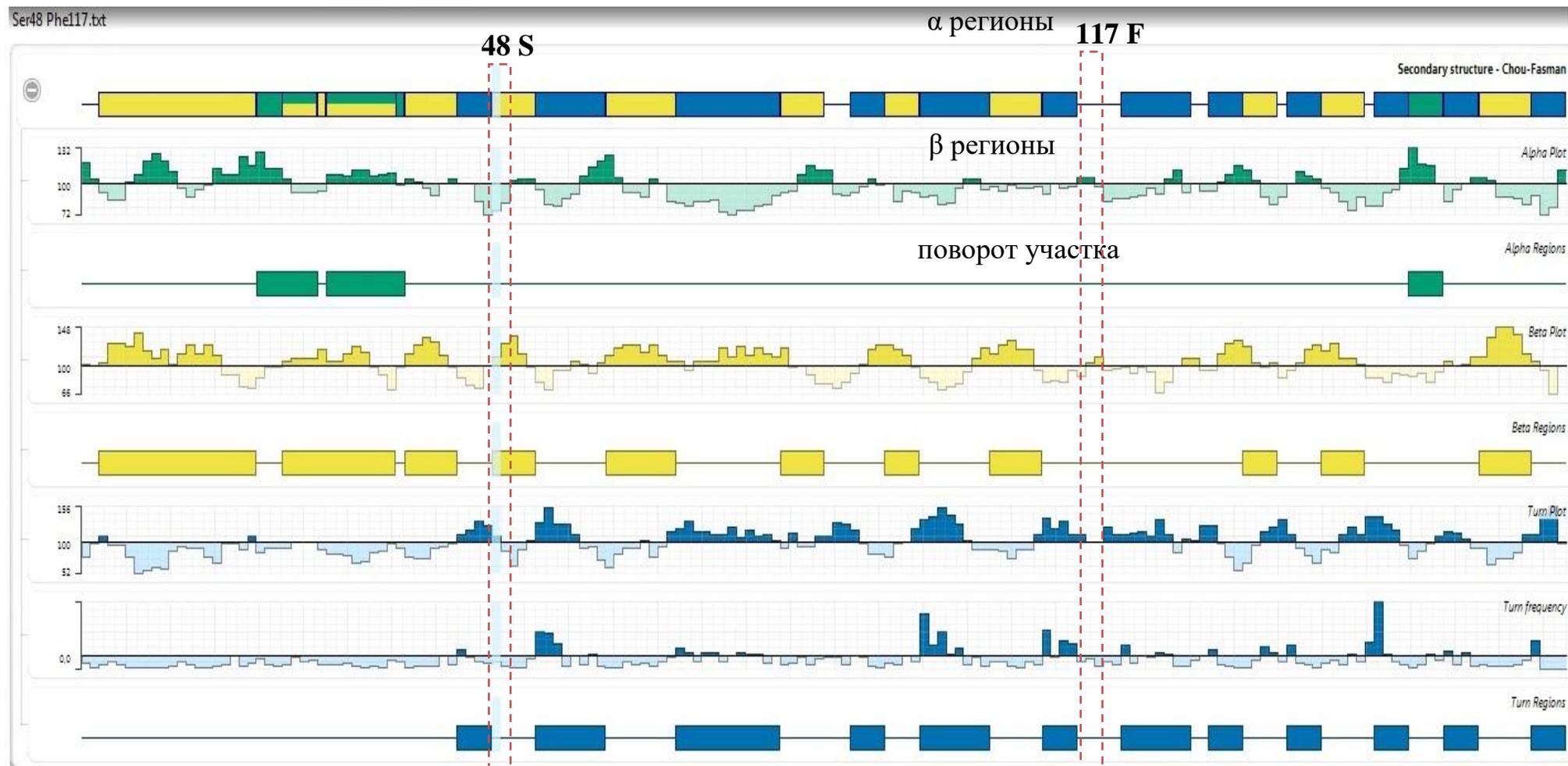
Вторичная структура Caf1_{NT1}, Caf1_{NT2}, Caf1_{NT3} (a,b,c)

a) I-Ala48 Phe117.tbt



Продолжение приложения В

b)



Продолжение приложения В

