

Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis subsp. microti* *bv. ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок

В.И.Соломенцев, Л.А.Кадникова, А.А.Кисличкина, Н.В.Майская,
Т.И.Комбарова, М.Е.Платонов, А.Г.Богун, А.П.Анисимов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболенск, Российская Федерация

Возбудитель чумы – грамтрицательная бактерия вида *Yersinia pestis* – включает два подвида: основной, *pestis* – один из наиболее опасных бактериальных патогенов, унесший сотни миллионов человеческих жизней, и неосновной, *microti* – причину крайне редких подобных чуме эндемичных заболеваний, не передающихся от человека человеку. Штаммы этой группы, условно патогенные для людей, как правило, авирулентны и для морских свинок, но описаны отдельные изоляты *subsp. microti*, обладающие вирулентностью для морских свинок на уровне единичных клеток, как и штаммы основного подвида. Сравнительный анализ таких близкородственных, но принципиально отличающихся по хозяйской специфичности штаммов может выявить новые факторы патогенности, специфичные в отношении морской свинки и/или человека, – потенциальные молекулярные мишени для профилактики и лечения чумы. В ходе предварительной анимализации были отобраны две культуры *Y. pestis subsp. microti* *bv. ulegeica* штамма И-3189, отличающиеся по величинам LD₅₀ при подкожном заражении морских свинок. LD₅₀ культуры, не пассированной на этом виде животных, превышала 10⁶ КОЕ, а величина этого показателя у анимализированной культуры составила 68 КОЕ. Предположение о том, что повышение вирулентности было вызвано селекцией в организме животных спонтанных мутантов, не подтвердилось, так как проведенное нами двукратное полногеномное секвенирование различий в геноме двух культур не выявило. Мы предположили, что различия в вирулентности связаны с различным уровнем экспрессии отдельных генов. В данной работе представлены результаты транскриптомного анализа двух культур штамма И-3189 (сборка GenBank JYJX00000000.1), принципиально отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, транскриптом, дифференциальная экспрессия, избирательная вирулентность, RNA-seq, *in vivo*

Для цитирования: Соломенцев В.И., Кадникова Л.А., Кисличкина А.А., Майская Н.В., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Богун А.Г., Анисимов А.П. Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis subsp. microti* *bv. ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Бактериология. 2017; 2(2): 30–35. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35

Comparative sequencing of transcriptomes of *Yersinia pestis subsp. microti* *bv. ulegeica*, different by virulence for guinea pigs

V.I.Solomentsev, L.A.Kadnikova, A.A.Kislichkina, N.V.Mayskaya,
T.I.Kombarova, M.E.Platonov, A.G.Bogun, A.P.Anisimov

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation

Gram-negative bacteria *Yersinia pestis* is the causative agent of the plague. The species includes two subspecies: the main *subsp. pestis* is one of the most dangerous bacterial pathogens that has killed hundreds of millions of humans, while the non-main *subsp. microti* is the cause only of extremely rare plague-like endemic disease not transmitted from one person to another. Strains of this group are conditionally pathogenic for humans and as a rule are avirulent for guinea pigs, but some isolates of *subsp. microti* are virulent for guinea pigs at the level of single cells as the strains of the main subspecies. A comparative analysis of such closely related strains that are fundamentally different in host specificity can reveal new pathogenicity factors specific for guinea pig and/or human – potential molecular targets for the prevention and treatment of plague. During the preliminary animalization, two cultures of *Y. pestis subsp. microti* *bv. ulegeica* strain I-3189, differing in subcutaneous LD₅₀ values for guinea pigs were selected. LD₅₀ for culture that did not overcome contact with the organism of this species of animals

Для корреспонденции:

Соломенцев Виктор Иванович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 31-2018
E-mail: Solomentsev@obolensk.org

Статья поступила 24.04.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Viktor I. Solomentsev, Junior Researcher of Department Collection Microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967)31-2018
E-mail: Solomentsev@obolensk.org

The article was received 24.04.2017, accepted for publication 30.06.2017

exceeded 10^6 CFU, and the value of this indicator in the animalized culture was 68 CFU. The assumption that the increase in virulence was due to the selection of spontaneous mutants in the animals was not confirmed, since no differences in the genomes of the two cultures were found. We hypothesized that dissimilarities in virulence are associated with different levels of expression of individual genes. This abstract presents the results of a transcriptome analysis of the two cultures of the strain I-3189 (GenBank assembly JYJX00000000.1), which dramatically differs in subcutaneous virulence for guinea pigs.

Keywords: *Yersinia pestis*, transcriptome, differential expression, selective virulence, RNA-seq, in vivo

For citation: Solomentsev V.I., Kadnikova L.A., Kislichkina A.A., Mayskaya N.V., Kombarova T.I., Platonov M.E., Bogun A.G., Anisimov A.P. Comparative sequencing of transcriptomes of *Yersinia pestis subsp. microti* bv. *ulegeica*, different by virulence for guinea pigs. *Bacteriology*. 2017; 2(2): 30–35. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35

Чума – острая зоонозная инфекция, возбудителем которой является грамотрицательная бактерия *Y. pestis*. Вид *Y. pestis* произошел от возбудителя псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis*, приобретя путем горизонтального переноса 32 хромосомных гена, две дополнительные плазмиды и потеряв около 200 генов [1], что привело к превращению энтеропатогенной бактерии с фекально-оральным путем передачи в возбудителя генерализованной септической инфекции – чумы, передающейся кровососущими насекомыми – блохами.

Вид *Y. pestis* включает два подвида, различающиеся по эпидемической значимости. Основной подвид *pestis* вызывает у людей острую высококонтагиозную инфекцию с высокой смертностью, быстрой генерализацией инфекционного процесса, а неосновной подвид *microti*, циркулирующий в популяциях различных видов полевок, вирулентен для своих основных хозяев и лабораторных мышей, но, за редким исключением, авирулентен для морских свинок и человека [2–4]. Большинство «полевочьих» штаммов из нашей коллекции выделено в природных очагах чумы, расположенных вне территории РФ еще до распада СССР. Как показывает практика, штаммы патогенных бактерий во время многолетнего коллекционного хранения часто утрачивают целый ряд своих признаков, описанных при выделении. В первую очередь, это касается снижения доли микробных клеток, сохранивших вирулентность и/или иммуногенность на исходном уровне [2]. Действительно, из 60 проверенных музейных штаммов лишь 13 сохранили вирулентность для мышей [2]. В ходе последующей анимализации были отобраны две культуры *Y. pestis subsp. microti* bv. *ulegeica* штамма И-3189, отличающиеся по величинам LD_{50} при подкожном заражении морских свинок. LD_{50} культуры, не пассированной на этом виде животных, превышала 10^6 КОЕ, а величина этого показателя у анимализованной культуры составила 68 КОЕ [2]. С целью поиска мутаций, определяющих повышение вирулентности, мы провели двукратное полногеномное секвенирование выделенных культур штамма И-3189. Секвенирование было проведено на платформах Ion Torrent PGM и Illumina MiSeq. Однако предположение о том, что повышение вирулентности было вызвано селекцией в организме животных спонтанных мутантов, не подтвердилось, так как оба полногеномных анализа различий в геноме двух культур не выявили. Мы предположили, что различия в вирулентности связаны с различным уровнем экспрессии отдельных генов. В данной работе представлены результаты транскриптомного анализа двух культур штамма И-3189, прин-

ципально отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

В работе использовали две культуры *Y. pestis subsp. microti* bv. *ulegeica* штамма И-3189 (сборка GenBank JYJX00000000.1) из «Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболонск)», отличающихся по вирулентности более чем на 5 порядков [2]. Штаммы выращивали в течение 48 ч при температуре 28°C на плотных и жидких питательных средах Хоттингера (производства ФБУН ГНЦ ПМБ) и ВНИ (Brain Heart Infusion производства HiMedia, Индия).

Лабораторные животные

Использовали 4 беспородных морских свинок обоего пола (225 ± 25 г (две свинки для вирулентной культуры и две свинки для авирулентной культуры чумного микроба) из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Солнечногорский район, п. Андреевка (Московская область). В полость брюшины морских свинок помещали наполненные бактериями камеры из диализных мембран. Основным достоинством такого подхода является относительная легкость выделения бактериальных РНК. Беспородных морских свинок в возрасте 5–6 мес анестезировали однократной внутривентральной инъекцией смеси (5 : 1) рометара (20 мг/мл) и Золитила-100 (100 мг/мл) по 0,75 мл/кг массы тела. Диализные камеры имплантировали в перитонеальные полости морских свинок со строгим соблюдением правил асептики и антисептики. Использовали нитроцеллюлозную диализную мембрану (Sigma-Aldrich D9652-100FT) (размер пор 10 500 НОММ, ширина 33 мм), наполненную 5 мл ВНИ бульона с 1% БСА, содержащего 10^7 КОЕ *Y. pestis* в логарифмической фазе роста. Через 48 ч после имплантации проводили эвтаназию животных ингаляцией двуокиси углерода с последующей цервикальной дислокацией, а затем извлекали диализные камеры. Извлеченные камеры тщательно промывали стерильным ВНИ бульоном, а затем извлекали содержимое шприцем.

Протоколы экспериментов на животных были одобрены Комитетом по биоэтике ГНЦ ПМБ (разрешение № ВП-2016/1). Все работы проводили в соответствии с руководством и правилами Евросоюза по обращению, уходу и защите лабораторных животных (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm).

Выделение РНК

300 мкл содержимого диализной камеры использовали для выделения РНК. Для стабилизации матричной РНК в клетках *Y. pestis* использовали RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen, Нидерланды). Для экстракции РНК использовали PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для улучшения результатов секвенирования транскрипционной РНК при подготовке образцов использовали набор для удаления рибосомной РНК Ribo-Zero Kit (Bacteria) (Illumina, США), удаляющий до 99% крупных и от 85% до 95% малых рРНК.

Секвенирование

Приготовление библиотек для секвенирования проводили с помощью набора ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Illumina, США). В результате получили четыре библиотеки последовательностей, характеризующих транскриптомы выделенных из разных морских свинок авирулентной (AV1 и AV2) и вирулентной (V1 и V2) культур. Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle) в соответствии с рекомендациями производителя (Illumina, США).

Анализ данных

Полученные данные выровняли с использованием метода нормализации RPKM (reads per kilobase per million of mapped reads – число прочтений на тысячу нуклеотидов на миллион картированных прочтений) [5] в приложении SeqMan NGen программы Lasergene Genomics Suite (DNASTAR, США), в качестве референсной была использована полногеномная последовательность штамма CO92 (сборка GenBank NC_003143.1).

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены данные, полученные после проведения секвенирования на платформе Illumina MiSeq.

Для достоверного сравнения результатов транскриптомного анализа полученный массив данных секвенирования был нормализован в приложении SeqMan NGen программы Lasergene Genomics Suite (DNASTAR) с использованием метода нормализации RPKM. В качестве референсной была использована полногеномная последовательность штамма CO92.

Для анализа дифференциальной экспрессии генов сравнили полученные данные для авирулентных и вирулентных культур. Сравнение всех пар представлено в таблице 2.

На первом этапе анализа, в целях достоверного сравнения полученных результатов, из выборки генов были исключены гены с количеством картированных прочтений 3 и менее. Далее были найдены средние значения уровня экспрессии для авирулентных и вирулентных культур. По результатам сравнения средних значений уровня экспрессии были отобраны гены, кратность изменения экспрессии которых была 4 и выше. Всего отобрали 59 дифференциально экспрессируемых генов. Из них в культурах, вирулентных для морских свинок, у 51 гена уровень экспрессии увеличился, а у 8 – уменьшился.

В таблице 3 представлены гены с 4-кратным и более изменением уровня экспрессии в вирулентных и авирулентных культурах.

Вирулентность бактерий обусловлена присутствием у них факторов патогенности различной функциональной направленности [6]. Транскрипционная регуляция экспрессии генов координируется специальными регуляторными системами, позволяя приспосабливаться бактериям к изменяющимся условиям внешней среды [7].

Установлено, что *Y. pestis* способна координировать экспрессию большого количества генов для выживания в широком спектре изменяющихся условий. Так, анализ профилей экспрессии генов, связанных с вирулентностью, показал различия при изменении температуры [7]. Дифференциальная экспрессия генов при двух разных температурах позволяет бактерии эффективно адаптироваться в организмах холоднокровного насекомого-переносчика и теплокровного хозяина. В качестве примера зависимости регуляции генов от температуры и других физических характеристик окружающей среды можно привести ген *umt*, кодирующий мышинный токсин, – он репрессируется при повышении температуры [7]. Антиген рН 6 (PsaA) экспрессируется *in vitro* при рН среды 5–6 и температуре (38 ± 3)°С, т.е. в условиях, близких к таковым в фагоцитарных фаголизосомах. Оперон капсульного антигена F1 активируется при повышении температуры, окислительном стрессе и низком содержании Mg²⁺ [7]. Вышеперечисленные динамические изменения экспрессии генов осуществляются посредством факторов транскрипции и небольших регуляторных РНК на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях [7].

В ходе работ по тестикулярной анимализации полевочьих штаммов *Y. pestis* мы отобрали уникальную пару культур штамма И-3189, в которой исходные культуры были авирулентны для морских свинок (LD₅₀ >10⁶ КОЕ), а их пассированное *in vivo* «потомство» вызывало гибель животных этого вида при заражении несколькими десятками КОЕ [2]. Проведенное нами двукратное полногеномное секвенирование на платформах Illumina MiSeq и Ion Torrent PGM не выявило различий в нуклеотидных последовательностях исходных и пассированных культур. Исходя из этого, мы предположили, что изменение вирулентности вызвано различным уровнем экспрессии генов.

Для определения различия уровней экспрессии генов высоковирулентной и авирулентной культур штамма И-3189

Таблица 1. Результаты секвенирования библиотек AV1, AV2, V1, V2

Библиотека	Объем, Мб	Прочтений всего	Содержание ГЦ, %
AV1	610	3 070 202	47
AV2	817	4 111 377	47
V1	762	3 830 891	46
V2	1003	5 307 849	47

Таблица 2. Кратность изменения уровня экспрессии генов в сравниваемых парах культур

Пары культур	Количество генов с 2-кратным уровнем изменения экспрессии	Количество генов с 4-кратным уровнем изменения экспрессии	Количество генов с 8-кратным уровнем изменения экспрессии
AV1-V1	978	215	67
AV1-V2	781	158	51
AV2-V1	1307	311	110
AV2-V2	739	162	51

Таблица 3. Гены с 4-кратным и более изменением уровня экспрессии в вирулентных и авирулентных культурах

Название гена	Средний уровень экспрессии авирулентных культур, в скобках показано расхождение между повторностями	Средний уровень экспрессии вирулентных культур, в скобках показано расхождение между повторностями	Изменение экспрессии генов в вирулентных культурах, среднее	Продукт
<i>YPO3518</i>	1301,25 (± 117,79)	12631,19 (± 3747,54)	9,71 ↑	hypothetical protein
<i>YPO2027a</i>	12,21 (± 2,56)	99,89 (± 31,59)	8,18 ↑	hypothetical protein
<i>cysM</i>	1,13 (± 0,42)	7,31 (± 0,32)	6,47 ↑	cysteine synthase B
<i>lepA</i>	24,78 (± 12,35)	158,69 (± 66,15)	6,41 ↑	membrane protein
<i>YPO0816</i>	4,64 (± 2,10)	28,20 (± 17,41)	6,08 ↑	general secretion pathway protein D
<i>YPO3137</i>	656,27 (± 224,95)	3928,40 (± 1085,28)	5,99 ↑	conserved hypothetical protein
<i>aroF</i>	145,10 (± 63,55)	858,46 (± 92,32)	5,92 ↑	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, tyr-sensitive
<i>YPO2169</i>	1,63 (± 0,07)	9,60 (± 4,36)	5,88 ↑	putative LysR-family transcriptional regulatory protein
<i>YPO0968a</i>	13,58 (± 5,61)	79,64 (± 37,04)	5,87 ↑	hypothetical protein
<i>YPO3612</i>	98,28 (± 42,49)	575,94 (± 185,32)	5,86 ↑	putative transcriptional regulatory protein
<i>YPO1107</i>	1245,53 (± 32,43)	7293,39 (± 1441,00)	5,86 ↑	heat shock protein GrpE
<i>YPO4032</i>	21,24 (± 6,54)	123,43 (± 61,21)	5,81 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0788</i>	28,98 (± 6,14)	167,02 (± 122,41)	5,76 ↑	hypothetical protein
<i>b4390</i>	73,55 (± 4,92)	422,11 (± 60,58)	5,74 ↑	transcriptional regulator NadR
<i>YPO2220</i>	6,06 (± 0,75)	34,40 (± 12,86)	5,68 ↑	hypothetical protein
<i>YPO1484a</i>	5,59 (± 4,16)	31,73 (± 15,46)	5,67 ↑	hypothetical protein
<i>YPM1.67c</i>	366,95 (± 183,09)	2060,30 (± 991,41)	5,61 ↑	partitioning protein B
<i>ygiW</i>	481,78 (± 118,52)	2610,00 (± 53,13)	5,42 ↑	putative exported protein
<i>YPO0750</i>	6,61 (± 2,55)	35,58 (± 23,71)	5,38 ↑	putative membrane protein
<i>YPO1656</i>	12,90 (± 2,03)	69,25 (± 17,63)	5,37 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPM1.34A</i>	481,48 (± 129,49)	2539,67 (± 552,41)	5,27 ↑	hypothetical protein
<i>YPO2217a</i>	82,66 (± 19,26)	434,94 (± 157,82)	5,26 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0285</i>	23,75 (± 0,03)	124,92 (± 10,97)	5,26 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO0695</i>	14,86 (± 4,89)	76,80 (± 19,78)	5,17 ↑	putative membrane protein
<i>YPO0499</i>	1,92 (± 0,76)	9,81 (± 4,70)	5,11 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0884</i>	90,96 (± 25,07)	456,70 (± 185,50)	5,02 ↑	hypothetical protein
<i>YPO1174</i>	3,40 (± 0,86)	17,00 (± 6,58)	5,00 ↑	hypothetical protein
<i>YPO3682</i>	3,21 (± 1,85)	15,94 (± 8,66)	4,97 ↑	putative LysR-family transcriptional regulatory protein
<i>fldA</i>	56,87 (± 11,78)	280,50 (± 61,47)	4,93 ↑	flavodoxin 1
<i>YPO0809</i>	2,36 (± 1,13)	11,15 (± 1,72)	4,72 ↑	general secretion pathway protein K
<i>YPO0626</i>	43,92 (± 21,10)	206,64 (± 92,21)	4,70 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO1382</i>	51,72 (± 19,75)	240,91 (± 82,61)	4,66 ↑	hypothetical protein
<i>nadA</i>	76,23 (± 3,47)	354,19 (± 6,72)	4,65 ↑	quinolinate synthetase A
<i>YPM1.68c</i>	881,40 (± 534,98)	4076,15 (± 1827,36)	4,62 ↑	partitioning protein A
<i>cyoA</i>	87,70 (± 3,31)	403,99 (± 52,08)	4,61 ↑	cytochrome O ubiquinol oxidase subunit II
<i>nrdH</i>	24,21 (± 9,27)	111,40 (± 26,75)	4,60 ↑	putative glutaredoxin
<i>hsIV</i>	282,60 (± 88,95)	1288,29 (± 43,11)	4,56 ↑	heat shock protein
<i>YPO0286</i>	21,49 (± 0,83)	95,38 (± 21,44)	4,44 ↑	putative coproporphyrinogen III oxidase
<i>YPO3258</i>	42,50 (± 9,71)	187,94 (± 105,49)	4,42 ↑	putative membrane protein
<i>YPO1891</i>	3,17 (± 0,30)	13,81 (± 2,46)	4,35 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0127</i>	165,67 (± 27,22)	716,06 (± 86,61)	4,32 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO3023</i>	25,69 (± 2,87)	109,86 (± 47,81)	4,28 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO1234</i>	289,83 (± 210,10)	1238,23 (± 642,28)	4,27 ↑	probable phage antitermination protein Q
<i>ffs</i>	333,41 (± 81,06)	1412,04 (± 585,49)	4,24 ↑	putative 6-O-methylguanine DNA methyltransferase family protein
<i>YPO2483</i>	40,54 (± 4,32)	170,62 (± 59,30)	4,21 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0864</i>	80,78 (± 8,10)	337,63 (± 56,26)	4,18 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO0871</i>	5,00 (± 0,86)	20,55 (± 14,23)	4,11 ↑	putative colicin immunity protein
<i>YPO1387</i>	6,04 (± 3,12)	24,69 (± 9,87)	4,09 ↑	putative exported protein
<i>YPO0538</i>	16,61 (± 5,97)	67,67 (± 27,05)	4,08 ↑	hypothetical protein
<i>gpm</i>	294,16 (± 43,71)	1190,01 (± 15,90)	4,05 ↑	putative phosphoglycerate mutase
<i>glnA</i>	181,89 (± 14,96)	730,07 (± 235,40)	4,01 ↑	glutamine synthetase
<i>ansB</i>	306,39 (± 113,92)	75,87 (± 39,60)	4,00 ↓	putative L-asparaginase II precursor
<i>YPO3620</i>	12,65 (± 0,61)	3,06 (± 1,86)	4,17 ↓	putative carbohydrate transport protein
<i>YPO3636</i>	14,02 (± 3,30)	2,95 (± 2,01)	4,76 ↓	putative ABC transporter, permease protein
<i>YPO0412</i>	23,03 (± 3,87)	4,51 (± 1,47)	5,00 ↓	putative ABC transporter ATP-binding protein
<i>fucR</i>	67,87 (± 42,48)	12,05 (± 9,83)	5,56 ↓	putative deoR-family regulatory protein
<i>gntP</i>	35,36 (± 1,62)	5,37 (± 2,01)	6,67 ↓	putative gluconate transporter
<i>psaA</i>	590,08 (± 111,53)	85,59 (± 1,94)	6,67 ↓	pH 6 antigen precursor (antigen 4) (adhesin)
<i>pst</i>	15179,03 (± 14565,54)	1167,41 (± 12,59)	12,50 ↓	pesticin

решили использовать культивирование бактерий в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок, – модель, наиболее приближенную к условиям существования бактерий в организме хозяина.

В настоящей публикации описано проведение сравнительного транскриптомного анализа двух культур одного штамма *Y. pestis*, отличающихся по вирулентности более чем на пять порядков. В ходе проведенной работы мы обнаружили ряд генов со схожими уровнями изменения экспрессии в двух повторностях. Большая часть отобранных генов кодирует гипотетические белки, тем не менее, мы обнаружили понижение уровня экспрессии у гена *psaA*, который входит в состав оперона, кодирующего рН 6 антиген, обладающий антифагоцитарной и адгезивной активностями [8]. Возможно, снижение адгезивности бактериальных клеток способствует диссеминации бактерий в организме морской свинки, следствием чего являются генерализация инфекционного процесса и гибель животного.

У расположенного на плазмиде pPst гена *pst*, кодирующего синтез пестицина, уровень экспрессии в вирулентных культурах снизился в среднем в 12,5 раз. Показано, что рецептор пестицина Psn является одновременно рецептором комплекса железо-иерсиниабактин [9]. Вероятно, снижение продукции пестицина снижает конкуренцию за посадку на общие рецепторы и, соответственно, увеличивает количество доступного для бактерии железа. Также экспрессия снизилась у генов *YPO3636* и *YPO0412*, кодирующих различные белки суперсемейства транспортных белков ABC; гена *ansB*, кодирующего L-аспарагиназу II, фермент, способный ингибировать ответ Т-клеток и опосредующий вирулентность [10].

Чтобы достоверно определить, отвечают ли эти гены за избирательную вирулентность чумного микроба, необходимо провести анализ транскриптома культур других штаммов, также изменяющих свойства после пассажей, и/или посредством нокаутного мутагенеза и последующей комплементации проанализировать все гены – потенциальные молекулярные мишени для профилактики и лечения чумы.

Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-15-00599 «Поиск факторов избирательной вирулентности полевочных штаммов *Yersinia pestis*».

Литература

1. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudo-tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):14043-8.
2. Анисимов НВ, Комбарова ТИ, Платонов МЕ, Иванов СА, Сухова МА, Дентовская СВ, Анисимов АП. Способ отбора филогенетически близких штаммов *Yersinia pestis*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Инфекция и иммунитет. 2015;5(4):373-376. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376.
3. Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Rev. 2004 Apr;17(2):434-64.
4. Cui Y., Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 8;110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110

5. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNAseq. Nat Methods. 2008 Jul;5(7):621-8. DOI: 10.1038/nmeth.1226
6. Анисимов АП. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*. Автореферат, 2000.
7. Yanping R, Du Z, Han Y, Zhou L, Song Y, Zhou D, Cui Y. Omics strategies for revealing *Yersinia pestis* virulence. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Dec 13;2:157. doi: 10.3389/fcimb.2012.00157
8. Ценева ГЯ, Солодовникова НЮ, Воскресенская ЕА. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002;4(3).
9. Анисимов АП. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2002;3:3-23.
10. Kullas AL, McClelland M, Yang HJ, Tam JW, Torres A, Porwollik S, et al. L-asparaginase II produced by *Salmonella typhimurium* inhibits T cell responses and mediates virulence. Cell Host Microbe. 2012 Dec 13;12(6):791-8. DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.018

References

1. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudo-tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):14043-8.
2. Anisimov AP, Kombarova TI, Platonov ME, Ivanov SA, Sukhova MA, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Selection of phylogenetically closely-related *Yersinia pestis* strains differing in their virulence for guinea pigs. Russian Journal of Infection and Immunity. 2015;5(4):373-376. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376. (In Russian).
3. Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Rev. 2004 Apr;17(2):434-64.
4. Cui Y., Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 8;110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110
5. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNAseq. Nat Methods. 2008 Jul;5(7):621-8. DOI: 10.1038/nmeth.1226
6. Anisimov AP. Molecular-genetic mechanisms of formation and functional significance of the capsule of *Yersinia pestis*. Abstract, 2000. (In Russian).
7. Yanping R, Du Z, Han Y, Zhou L, Song Y, Zhou D, Cui Y. Omics strategies for revealing *Yersinia pestis* virulence. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Dec 13;2:157. doi: 10.3389/fcimb.2012.00157
8. Tseneva GYa, Solodovnikova NYu, Voskresenskaya EA. Molekulyarnye aspekty virulentnosti iersinii. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2002;4(3). (In Russian).
9. Anisimov AP. *Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2002;3:3-23. (In Russian).
10. Kullas AL, McClelland M, Yang HJ, Tam JW, Torres A, Porwollik S, et al. L-asparaginase II produced by *Salmonella typhimurium* inhibits T cell responses and mediates virulence. Cell Host Microbe. 2012 Dec 13;12(6):791-8. DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.018

Информация об авторах:

Кадникова Лидия Александровна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
 Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
 Телефон: (4967)31-2018
 E-mail: Kadnikova@obolensk.org

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 31-2018
E-mail: Kislichkina@obolensk.org

Майская Надежда Васильевна, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 31-2018
E-mail: Mayskaya@obolensk.org

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 36-0003

Платонов Михаил Евгеньевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279 Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 36-0003

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, начальник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 31-2018
E-mail: bogun62@mail.ru

Анисимов Андрей Павлович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Lidiya A. Kadnikova, Junior Researcher of Department Collection Microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2018
E-mail: Kadnikova@obolensk.org

Angelina A. Kislichkina PhD (biol.), Senior researcher of Department Collection Microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2018
E-mail: Kislichkina@obolensk.org

Nadezhda V. Mayskaya, Researcher of Department Collection Microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2018
E-mail: Mayskaya@obolensk.org

Tat'yana I. Kombarova, PhD (biol.), Senior Researcher, Laboratory for Biological Testing, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Mikhail E. Platonov, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Plague Microbiology, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Aleksandr G. Bogun, PhD (biol.), Head of Department collection microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2018
E-mail: bogun62@mail.ru

Andrey P. Anisimov, M.D., PhD (Medicine), ScD (Medicine), Prof., deputy director for science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003



Уважаемые коллеги! ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

приглашает Вас пройти обучение на курсах повышения квалификации

Обучение предусматривает:

- повышение квалификации по микробиологии, биологической безопасности и лабораторной диагностике от 72 до 344 часов;
- профессиональная переподготовка по бактериологии более 500 часов;

Образовательный цикл по программам дополнительного образования включает: лекции, семинары, практические занятия, собеседования, индивидуальные задания, изучение специальной литературы.

Учебно-методическое оснащение учебного процесса обеспечивается наличием методических пособий и рекомендаций по всем разделам подготовки, а также наглядными пособиями, аудио- и видеоматериалами.

Для обеспечения практической и теоретической подготовки предусматривается необходимое количество помещений, оборудованных в соответствии с требованиями биологической безопасности.

Читают лекции и ведут практические занятия ведущие специалисты института, имеющие многолетний опыт научно-практической работы.

По окончании курсов слушателям выдаются соответствующие документы установленного образца (на основании лицензии на осуществление образовательной деятельности в области ДПО №1912 от 4 октября 2011г.).

Контактная информация:

Потапов Василий Дмитриевич - заведующий отделом подготовки и усовершенствования специалистов, д.б.н. тел.: +7 (916) 521-66-53

Кузин Виктор Владимирович – инженер отдела подготовки и усовершенствования специалистов тел.: 7 (4967) 31-21-82

E-mail: kuzin@obolensk.org

Подробная информация

www.obolensk.org Дополнительное профессиональное образование

