

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-96-105

УДК 616.98:579.842.23

М.А. Макашова, Л.М. Куклева, Н.С. Червякова, Е.А. Нарышкина, А.В. Коврижников,
Г.А. Ерошенко, И.Г. Швиденко, В.В. Кутырев

Ауксотрофность штаммов *Yersinia pestis* античного биовара и ее генетические основы

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель – изучение зависимости роста от аминокислот у штаммов *Yersinia pestis* разных филогенетических ветвей античного биовара и определение генетических основ ауксотрофности этих штаммов. **Материалы и методы.** В работе использовали 38 штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара, выделенных в различных очагах мира в период 1928–2020 гг. Питательные потребности штаммов определяли высевом на минимальный агар Difco с различным набором аминокислот. Для проведения филогенетического анализа штаммов использовали программы Wombac 2.0 и SeaView 5.0.5. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов выполняли с помощью алгоритма BLAST и программы Mega 7.0. **Результаты и обсуждение.** Определена филогенетическая принадлежность использованных штаммов *Y. pestis* античного биовара к филогенетическим ветвям 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT. Установлено, что у всех исследованных штаммов античного биовара имеется общая зависимость роста от трех аминокислот – фенилаланина, треонина и метионина. У большинства штаммов античного биовара всех филогенетических ветвей рост также зависел от присутствия в среде цистеина, за исключением части штаммов филогенетической ветви 4.ANT. В 14 генах метаболизма серы и цистеина обнаружено 19 мутаций. Для каждой филогенетической группы античного биовара характерен свой профиль мутаций в генах, участвующих в биосинтезе цистеина. Установлена потребность в лейцине штаммов филогенетической ветви 0.ANT5, причиной которой может являться сдвиг рамки считывания в гене *leuA*. Штаммы ветви 1.ANT, выделенные на территории Демократической Республики Конго, проявляли дополнительную зависимость роста от пролина. Установленные питательные потребности штаммов и генетические причины ауксотрофности дополняют фенотипические и генетические характеристики филогенетических ветвей античного биовара и могут быть использованы в качестве генетических маркеров для дифференциации этих штаммов.

Ключевые слова: возбудитель чумы, античный биовар, питательные потребности штаммов.

Корреспондирующий автор: Макашова Марина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Макашова М.А., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Нарышкина Е.А., Коврижников А.В., Ерошенко Г.А., Швиденко И.Г., Кутырев В.В. Ауксотрофность штаммов *Yersinia pestis* античного биовара и ее генетические основы. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 4:96–105. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-96-105

Поступила 22.09.2023. Принята к публ. 30.10.2023.

M.A. Makashova, L.M. Kukleva, N.S. Chervyakova, E.A. Naryshkina, A.V. Kovrizhnikov,
G.A. Eroshenko, I.G. Shvidenko, V.V. Kutyrev

Auxotrophy of *Yersinia pestis* Strains of Antiqua Biovar and Its Genetic Basis

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to study the growth dependence on amino acids in *Yersinia pestis* strains of different phylogenetic branches of the antiqua biovar and to determine the genetic basis of auxotrophy of these strains. **Materials and methods.** We used 38 strains of *Y. pestis*, the main subspecies of the antiqua biovar, isolated in various foci of the world in the period of 1928–2020. The nutritional requirements of the strains were determined by incubation on Difco minimal agar with different sets of amino acids. Phylogenetic analysis of the strains was carried out using the Wombac 2.0 and SeaView 5.0.5 programs. Comparative analysis of the nucleotide sequences of the genes was performed using the BLAST algorithm and the Mega 7.0 program. **Results and discussion.** The phylogenetic appurtenance of the investigated *Y. pestis* strains of antiqua biovar to the phylogenetic branches 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT has been determined. It is established that all studied strains have a common dependence of growth on three amino acids – phenylalanine, threonine, and methionine. In the majority of the strains of antiqua biovar of all phylogenetic branches, growth is also dependent on the presence of cysteine in the medium, except for a part of the strains of the phylogenetic branch 4.ANT. In 14 genes of sulfur and cysteine metabolism, 19 mutations have been identified. Each phylogenetic group of the antique biovar has a distinct profile of mutations in genes involved in cysteine biosynthesis. The leucine requirement of the strains belonging to phylogenetic branch 0.ANT5 has been established, possibly caused by a frame shift in the *leuA* gene. Strains of the 1.ANT branch isolated in the Democratic Republic of the Congo demonstrate an additional proline-dependent growth. The defined nutritional requirements in the strains and the genetic causes of auxotrophy complement the phenotypic and genetic characteristics of the phylogenetic branches of the antiqua biovar and can be used as genetic markers for the differentiation of these strains.

Key words: plague agent, antiqua biovar, and nutritional requirements of strains.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Marina A. Makashova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Makashova M.A., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kovrizhnikov A.V., Eroshenko G.A., Shvidenko I.G., Kutyrev V.V. Auxotrophy of *Yersinia pestis* Strains of Antiqua Biovar and Its Genetic Basis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; 4:96–105. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-96-105

Received 22.09.2023. Accepted 30.10.2023.

Makashova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7713-7959>

Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>

Chervyakova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-3820>

Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>

Kovrizhnikov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-6321>

Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>

Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Античный биовар основного подвида возбудителя чумы *Yersinia pestis* состоит из штаммов с высокой вирулентностью и эпидемической значимостью и делится на ряд филогенетических ветвей, обозначаемых 1.ANT – 4.ANT, происходящих от наиболее ранней ветви античного биовара 0.ANT. В свою очередь от двух ветвей античного биовара произошли три других биовара основного подвида: от 1.ANT – биовары 1.INT (интермедиум) и 1.ORI (восточный), от 2.ANT – 2.MED (средневековый). По данным палеогеномных исследований установлено, что этиологические агенты первых двух пандемий относились к штаммам античного биовара [1–4]. В настоящее время штаммы античного биовара распространены в очагах Центральной и Восточной Азии, Африки (Россия, Кыргызстан, Казахстан, Монголия, Китай, Демократическая Республика Конго [ДРК], Уганда, Замбия). Они вызывают на этих территориях эпизоотии, вспышки и единичные случаи заболеваний людей чумой [5].

Длительное существование штаммов *Y. pestis* античного биовара в различных ландшафтно-географических зонах, многообразие их носителей и переносчиков привело к разнообразию питательных потребностей штаммов. Ранее установлено, что все штаммы основного подвида являются ауксотрофами по фенилаланину, метионину и треонину, в то время как для ряда штаммов требуются дополнительные факторы роста [6]. Ранее анализ питательных потребностей штаммов античного биовара проводился по их географической и очаговой принадлежности либо для ограниченного количества филогенетических групп, в то время как для понимания направлений микроэволюции античного биовара и его более полной характеристики важно получение данных по различным филогенетическим ветвям. Опубликован ряд работ, связывающих утрату способности к некоторым метаболическим реакциям с вирулентностью основного подвида *Y. pestis* [7]. Кроме того, выявленные мутации в генах метаболизма аминокислот могут быть использованы в качестве генетических маркеров для дифференциации штаммов возбудителя чумы разного происхождения. **Целью** настоящей работы является изучение зависимости роста от аминокислот штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей античного биовара и определение генетических основ ауксотрофности этих штаммов.

Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis* и условия культивирования. В работе использовали 38 штаммов *Y. pestis*,

выделенных в различных географических регионах мира в период 1928–2020 гг. Штаммы выращивали на агаровой среде LB (pH 7,2) при температуре 28 °C в течение 48 ч. Биохимические свойства штаммов изучали с помощью набора API 20 E (Bio-Mérieux, Франция). Питательные потребности штаммов определяли по методу Brubaker с модификациями в нескольких биологических повторах [6, 8]. Для этого штаммы культивировали на минимальном 1,5 % агаре типа Difco (pH 7,2) с различной комбинацией аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, цистеин, треонин, серин, глицин, лейцин, валин, изолейцин, аланин, пролин, аргинин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин, гистидин, аденин) при 28 °C в течение 48 ч. В качестве контрольного использовали прототрофный штамм *Y. pseudotuberculosis* 68. Выделение ДНК осуществляли набором реагентов PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США).

Высокопроизводительное секвенирование, филогенетическое исследование, сравнительный анализ генов метаболизма *Y. pestis*. Определение полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* проводили в системе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Обработку полученных данных выполняли программами Ion Torrent Suite software package 5.12 и Newbler gsAssembler 2.6. Поиск коровых единичных нуклеотидных полиморфизмов SNPs (от англ. single nucleotide polymorphism) в геномах *Y. pestis* проводили в программе Wombac 2.0. Дендрограмму строили на основе 1756 выявленных коровых SNPs после удаления участков гомоплазии в программе SeaView 5.0.5 по алгоритму Maximum Likelihood (модель HKY85) с использованием 1000 бутстреп-реплик. Для анализа метаболических путей различных питательных субстратов использовали базу данных KEGG [9]. В качестве референсных взяты геномы *Y. pestis* CO92 (номер доступа GenBank: GCA_000009065.1) и *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 (серотип I) (номер доступа GenBank: GCA_000047365.1). Гены биосинтеза аминокислот анализировали при использовании алгоритма BLAST и программы Mega 7.0.

Результаты и обсуждение

Свойства и филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* античного биовара. При изучении биохимических свойств все штаммы проявляли характерные для античного биовара особенности, а именно ферментировали глицерин, арабинозу, но не были способны утилизировать рамнозу. У всех исследован-

ных штаммов выявлена активность β -галактозидазы (ортонитрофенил- β D-галактопиранозидаса), у штамма *Y. pestis* 236 (22) – способность к окислению амигдалина. Все штаммы обладали денитрифицирующей способностью, за исключением штамма *Y. pestis* 235 (21), что совпадало с ранее опубликованными данными [10]. При сравнении генов периплазматической нитратредуктазы *narABCDF* у штаммов античного биовара отличий в нуклеотидных последовательностях этого штамма не выявлено.

Проведенный анализ данных высокопроизводительного секвенирования ДНК всех 38 взятых в исследование штаммов *Y. pestis* античного биовара позволил установить их филогенетическую принад-

лежность к ветвям 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT на основании кластеризации со штаммами с известной филогенетической принадлежностью, опубликованными в NCBI GenBank (рис. 1). Согласно дендрограмме штаммы линии 0 отходят от древнего ствола эволюции, в то время как ветви 1, 2, 3 и 4 отделяются от ветви 0.ANT в точке политомии центрального узла, что согласуется с ранее опубликованными данными [11, 12].

Питательные потребности штаммов *Y. pestis* античного биовара. При изучении питательных потребностей установлено, что все штаммы *Y. pestis* античного биовара по своим питательным потребностям разделяются на четыре группы. Для первой

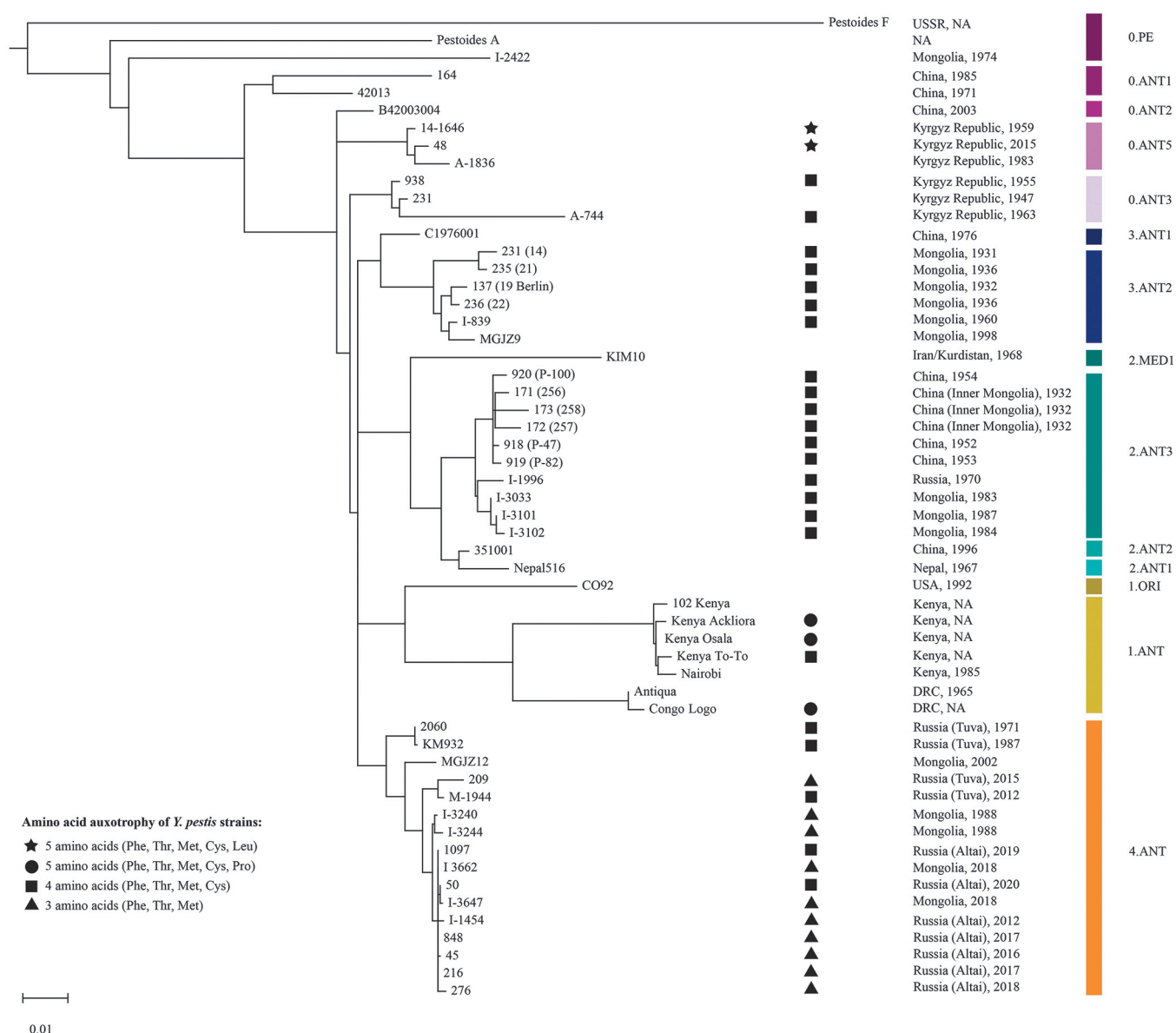


Рис. 1. Филогенетический анализ и питательные потребности штаммов *Y. pestis* античного биовара. Анализ выполнен с использованием программ Wombac 2.0, SeaView 5.0.5 (алгоритм Maximum Likelihood, модель HKY85, 1000 бутстреп-реплик). Геномы штаммов с неуказанными питательными потребностями взяты из базы данных NCBI GenBank. Для укоренения использовали штамм наиболее древнего тибетского подвида *Y. pestis* 620024 (выделен в Китае в 1962 г.) филогенетической ветви 0.PE7 (не указан на рисунке)

Fig. 1. Phylogenetic analysis and nutritional requirements of *Y. pestis* strains of the antiqua biovar. The analysis was performed using Wombac 2.0, SeaView 5.0.5 software (Maximum Likelihood algorithm, model HKY85, 1000 bootstrap replicas). Genomes of the strains with unspecified nutritional requirements were obtained from the NCBI GenBank database. For rooting, we used the strain of the most ancient Tibetan subspecies *Y. pestis* 620024 (isolated in China in 1962) of the phylogenetic branch 0.PE7 (not shown in the figure)

группы штаммов характерной особенностью является ауксотрофность по пяти аминокислотам: фенилаланину, метионину, треонину, цистеину и лейцину. К этой группе относятся штаммы древней эволюционной ветви 0.ANT5, филогенетически близкие к штаммам Юстиниановой чумы, циркулирующие в эпизоотически активных в настоящий момент очагах чумы Кыргызстана [13].

Ко второй группе можно отнести выделенные на территории ДРК и Кении штаммы филогенетической ветви 1.ANT, которые нуждаются в фенилаланине, метионине, треонине, цистеине и пролине. Следует отметить, что эти штаммы растут лучше при добавлении в среду лейцина.

Следующей группе штаммов для роста требовалось присутствие в питательной среде фенилаланина, метионина, треонина, цистеина. Выявлено, что ауксотрофность по этим четырем аминокислотам встречается у штаммов *Y. pestis* большинства филогенетических ветвей античного биовара, а именно: 0.ANT3 из очагов чумы Кыргызстана; 2.ANT3 из Китая и Монголии; уникальной для Монголии филогенетической ветви 3.ANT2; а также у пяти штаммов филогенетической ветви 4.ANT из республик Тыва (2060, KM932, M-1944) и Алтай (1097, 50) Российской Федерации. Кроме того, штамм Kenya То-То, выделенный в Кении, вместе со штаммом Nairobi образующий отдельный от других штаммов филогенетической ветви 1.ANT кластер, для полноценного роста также нуждался в четырех аминокислотах.

В четвертую группу вошли штаммы филогенетической ветви 4.ANT из Горно-Алтайского и Сайлюгемского высокогорных и Тувинского горного очагов чумы (Россия, Монголия), нуждающиеся для своего роста в трех аминокислотах: фенилаланине, метионине, треонине. Примечательно, что у популяции 4.ANT из Монголии зависимости роста от цистеина, характерной для части штаммов из Горно-Алтайского и Тувинского очагов, не наблюдается.

Генетические причины ауксотрофности штаммов *Y. pestis* античного биовара. Известно, что для всех штаммов возбудителя чумы основного подвида универсальной является зависимость роста от присутствия в среде трех аминокислот: фенилаланина, метионина и треонина [6]. В связи с этим в целях поиска общих генетических причин ауксотрофности по трем аминокислотам нами проведено сравнение последовательности генов референсного штамма *Y. pestis* CO92 с таковыми у эволюционного предка возбудителя чумы *Y. pseudotuberculosis*, референсный штамм IP 32953, в то время как для установления причин зависимости роста от дополнительных аминокислот проводили сравнение последовательностей генов между штаммами *Y. pestis* античного биовара.

Ранее установлено, что ауксотрофность возбудителя чумы по фенилаланину может быть связана с внедрением IS-элемента в ген *pheA*, кодирую-

щий бифункциональный фермент хоризматмутазу-префенатдегидратазу [14]. Нами при анализе геномов штаммов возбудителя чумы античного биовара установлено, что в филогенетических ветвях 0.ANT1 и 2.ANT1 эта мутация отсутствует (таблица). Информация о питательных потребностях этих групп штаммов могла бы прояснить роль этого генетического изменения для ауксотрофности *Y. pestis*, однако таких штаммов в нашем распоряжении не было и эти данные в литературных источниках отсутствуют.

При анализе генов *tyrA*, *tyrB*, *YPO1353*, *YPO3343*, продукты которых также участвуют в биосинтезе фенилаланина, нами выявлен ряд несинонимичных SNPs (от англ. non-synonymous SNP, nsSNP) у всех штаммов возбудителя чумы в гене *tyrB* аминотрансферазы ароматических аминокислот (1080–1081-я позиции гена, AspArg→GluSer) и в гене циклогексадиенилдегидратазы *YPO3343* (G→A, 544-я позиция гена, Asp→Asn). Влияние описанных мутаций, приводящих к смене аминокислотных остатков, на ауксотрофность штаммов античного биовара по фенилаланину предстоит выяснить в дальнейшем.

Основной причиной ауксотрофности штаммов *Y. pestis* основного подвида по метионину является мутация в гене цистатионин-γ-синтазы *metB* (в позиции 988 отсутствие гуанина), в результате которой происходит сдвиг рамки считывания [14, 15]. По проведенным нами исследованиям эта мутация присутствует у всех ветвей античного биовара, что подтверждает ее влияние на зависимость роста штаммов основного подвида (и античного биовара в частности) от метионина. Нами также проведено сравнение других генов биосинтеза метионина: *metA*, *metC*, *metH*. В гене *metH* кроме nsSNP (C→T, 620-я позиция гена, Ala→Val) присутствует гетерогенная область, содержащая повтор длиной в 74 п.н., характерный для штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 4.ANT из Горно-Алтайского высокогорного и Сайлюгемского природных очагов.

В синтезе метионина у *Y. pseudotuberculosis* участвуют ферменты оперона *mtnKADCB*, использующие S-метил-5-тиоаденозин в качестве субстрата в пути утилизации метионина. Ранее установлено, что у штамма *Y. pestis* CO92 отсутствует этот путь, сохранившийся только у штаммов Pestoides F и Angola [16]. При сравнении последовательностей генов у штаммов, депонированных в базе данных NCBI GenBank, нами установлено, что эта область сохранилась только у штаммов кавказского, улегейского и ангольского подвигов. Вероятно, утрата этого региона произошла в результате деятельности фагов или мобильных генетических элементов. Бесконечное накопление S-метил-5-тиоаденозина без утилизации является термодинамически невозможным, в связи с чем предполагается присутствие в геноме *Y. pestis* других генов, продукты которых участвуют в утилизации этого субстрата [16].

Мутации в генах биосинтеза аминокислот у штаммов *Y. pestis* античного биовара разных филогенетических ветвей
Mutations in the genes involved in the biosynthesis of amino acids in *Y. pestis* strains of antiqua biovar of different phylogenetic branches

Ген Gene	Кодируемый продукт Encoded product	Мутация (позиция от начала гена)* Mutation (position from the beginning of the gene)*	Филогенетическая ветвь, штаммы Phylogenetic branch, strains
Phenylalanine			
<i>pheA</i> YPO3281	chorismate mutase and prephenate dehydratase	IS100	All <i>Y. pestis</i> strains (except for 0.ANT1, 2.ANT1)
Treonine			
<i>ltaA</i> YPO1357	threonine aldolase	C→A (680) Gly→Asp	2.ANT2 (China)
Methionine			
<i>metH</i> YPO3722	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	Insertion of 74 bp (2937–3010)	4.ANT (Mongolia, Russia [Altai])
<i>metC</i> YPO0278	cysteine-S-conjugate β-lyase	C→T (467) Pro→Leu	1.ANT (Kenya)
<i>metC</i> YPO3006	cysteine-S-conjugate β-lyase	G→C (1139) Ser→Thr	2.ANT
<i>mtn</i> YPO3384	adenosylhomocysteine nucleosidase	G→A (475) Ala→Thr	1.ANT (DRC)
Cysteine and sulfur metabolism			
<i>cysM</i> YPO3011	S-sulfo-L-cysteine synthase (O-acetyl-L-serine-dependent)	Deletion of 52 bp (734–785)	4.ANT (Mongolia, Russia [Altai and <i>Y. pestis</i> M-1944, 209 from Tuva])
<i>ssiA</i> YPO0182	taurine transport system substrate-binding protein	Deletion of 3 bp (547–549)	0.ANT3, 1.ANT
		Deletion of 91 bp (616–705)	1.ANT (Kenya)
		Deletion of 18 bp (1042–1059)	1.ANT (DRC)
<i>ssuA</i> YPO3624	sulfonate transport system substrate-binding protein	Insertion of 30 bp	0.ANT1 – 2.ANT2 3.ANT1, 3.ANT2, 4.ANT (<i>Y. pestis</i> 2060, KM932 from Tuva)
		Insertion of 15 bp	2.ANT3, 4.ANT (Mongolia, Russia [Altai and <i>Y. pestis</i> M-1944, 209 from Tuva])
<i>cysJ</i> YPO3372	sulfite reductase (NADPH) flavoprotein α-component	Deletion of 36 bp (655–690)	Branch 1 (1.ANT, 1.ORI, 1.INT)
		Deletion of 18 bp (673–690)	0.ANT1 – 0.ANT5 2.ANT1 – 4.ANT
		G→T (369) Glu→Asp	3.ANT2
<i>YPO4110</i>	ABC transporter permease polar amino acid transport system permease protein ABC	A→T (638) Gln→Leu	2.ANT3 (Inner Mongolia)
<i>YPO1319</i>	putative ABC transport integral membrane subunit D-methionine transport system permease protein	T→C (35) Val→Ala	4.ANT (<i>Y. pestis</i> 2060, KM932 from Tuva)
<i>YPO4111</i>	putative periplasmic solute-binding protein polar amino acid transport system substrate-binding protein	Deletion of 93 bp (1–93)	1.ANT
<i>ssuD</i> YPO3625	alkanesulfonate monooxygenase	Deletion of 5 bp (901–905)	0.ANT2
<i>dmsA</i> YPO2965	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase subunit A	G→T (1172) Arg→Leu	2.ANT
<i>sbp1</i> YPO0079	sulfate/thiosulfate transport system substrate-binding protein	G→A (88) Asp→Asn	3.ANT2 (<i>Y. pestis</i> 137 [19] Berlin, 236 [22])
Leucine			
<i>leuA</i> YPO0533	2-isopropylmalate synthase	Deletion of 11 bp (1409–1419)	0.ANT5
<i>leuB</i> YPO0532	3-isopropylmalate dehydrogenase	G→A (98) Arg→His	4.ANT (Mongolia, Russia [Altai and <i>Y. pestis</i> M-1944, 209 from Tuva])
<i>leuD</i> YPO0530	3-isopropylmalate dehydratase small subunit 3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase small subunit	G→A (157) Gly→Ser	1.ANT
Proline			
<i>poaA</i> YPO1851	RHH-type transcriptional regulator, proline utilization regulon repressor/proline dehydrogenase/δ-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	G→A (8) Ser→Asn	1.ANT
<i>proB</i> YPO3222	glutamate 5-kinase	C→T (149) Ser→Phe	1.ANT (DRC)
		IS100	1.ANT (<i>Y. pestis</i> Nairobi)
<i>pip</i> YPO1781	proline iminopeptidase	IS100	1.ANT (<i>Y. pestis</i> Antiqua)

Примечание: * Сравнение проводилось с последовательностью *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 (серотип I) (номер доступа GenBank: GCA_000047365.1).

Note: * The comparison was performed against the sequence of *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 (serotype I) (GenBank access No. GCA_000047365.1).

В генах биосинтеза треонина *ltaA*, *metL*, *asd*, *thrABC* нами не найдено мутаций, однозначно приводящих к нарушению признака, однако зависимость роста от присутствия в среде треонина универсальна для всех штаммов основного подвида. Предполагается, что это явление связано с недостаточным поступлением азота, в результате чего этот элемент поглощается клеткой через менее эффективные многоступенчатые пути преобразования других аминокислот, что приводит к снижению скорости роста [16]. При сравнении геномов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* в гене *apk* лизин-чувствительной аспартокиназы III нами выявлен один nsSNP (A→T, 234-я позиция гена, Glu→Asp).

При сравнении гена *cysH* фосфоаденилсульфат-редуктазы, участвующей в пути синтеза цистеина, у штамма *Y. pestis* CO92 выявлена делеция восьми пар нуклеотидов (463–470-я позиции гена) [14], присутствующая у всех штаммов *Y. pestis*. Однако штаммы *Y. pestis* части филогенетических ветвей не зависят от цистеина, в том числе и ряд штаммов филогенетической ветви 4.ANT, что ставит под сомнение влияние этой мутации на аукоотрофность *Y. pestis*. Известно, что синтез цистеина также связан с обменом серы и метионина, в связи с чем для установления причин зависимости роста от присутствия в среде цистеина нами проведен анализ 59 генов синтеза цистеина и метаболизма серы (таблица, рис. 2).

В результате сравнения генов штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей античного биовара в 14 генах, участвующих в биосинтезе цистеина, нами выявлено 19 мутаций различного типа (таблица). Для каждой филогенетической ветви характерен уникальный набор мутаций: 0.ANT2 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, nsSNP *ssuD*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 0.ANT3 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, делеция 3 п.н. *ssiA*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 0.ANT5 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 1.ANT штаммы из Кении (инсерция 30 п.н. *ssuA*, делеции 3 п.н. и 91 п.н. *ssiA*, делеция 36 п.н. *cysJ*, nsSNP *YPO4111*, nsSNP *YPO0278*), 1.ANT штаммы из ДПК (инсерция 30 п.н. *ssuA*, делеции 3 п.н. и 18 п.н. *ssiA*, делеция 36 п.н. *cysJ*, nsSNP *mtn*, nsSNP *YPO4111*), 2.ANT1 и 2.ANT2 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, nsSNP *YPO3006*, nsSNP *dmsA*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 2.ANT3 (инсерция 15 п.н. *ssuA*, nsSNP *YPO3006*, nsSNP *dmsA*, nsSNP *YPO4110*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 3.ANT2 (инсерция 30 п.н. *ssuA*, nsSNP *spb1*, делеция 18 п.н. *cysJ*), 4.ANT (инсерция 30 п.н./15 п.н. *ssuA*, делеция *cysM*, nsSNP *YPO1319*, инсерция *metH*, делеция 18 п.н. *cysJ*). Таким образом, для всех штаммов *Y. pestis* античного биовара, помимо нарушения гена *cysH* (делеция 8 п.н.), общими генами с нарушенной структурой являются *ssuA* (инсерция 30 п.н./15 п.н.) и *cysJ* (делеция 36 п.н./18 п.н.). Возможно, нарушение этих генов привело к отсутствию селективного давления на сохранение целостности других генов метаболических путей цистеина,

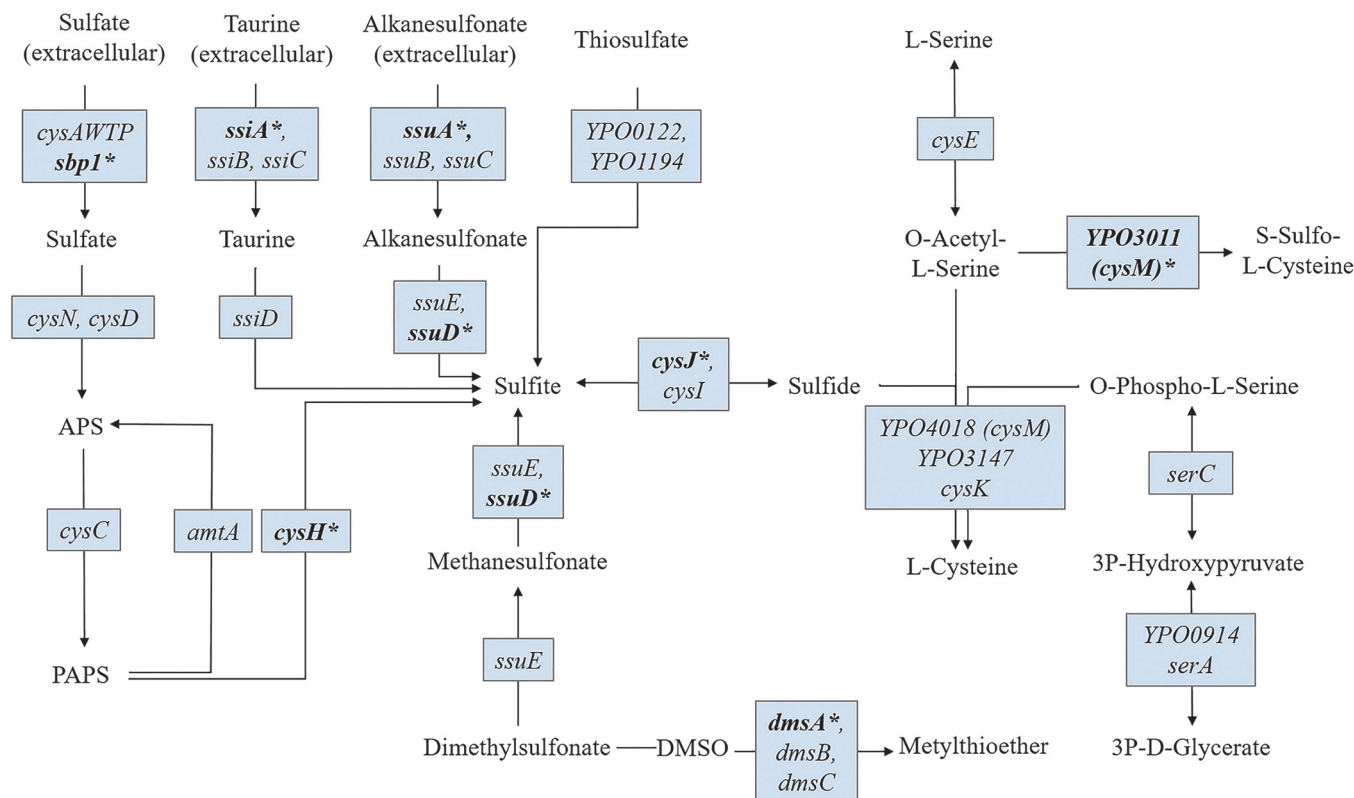


Рис. 2. Метаболический путь биосинтеза цистеина и обмена серы у штаммов *Y. pestis* античного биовара. Полужирным шрифтом выделены гены, содержащие мутации

Fig. 2. Metabolic pathway of cysteine biosynthesis and sulfur metabolism in *Y. pestis* strains of antiqua biovar. Genes containing mutations are highlighted in bold

метионина и обмена серы. Нарушения генов *ssuA* и *cysJ* у штаммов *Y. pestis* KIM10+ и *Y. pestis* CO92 выявлены ранее в результате сравнения с последовательностями *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 [17]. Анализ последовательностей штаммов в нашем исследовании показал, что у различных филогенетических групп античного биовара присутствуют разные варианты мутаций в этих генах. В геноме *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 в гене α -компонента сульфитредуктазы *cysJ* присутствует область с тремя повторами последовательности длиной 18 п.н. У всех штаммов *Y. pestis* античного биовара делетирован один из этих повторов (делеция 18 п.н.), в то время как у штаммов филогенетической ветви 1.ANT делетированы два повтора (делеция 36 п.н.). Обратная ситуация наблюдается в гене *ssuA* субстрат-связывающего белка сульфонатной транспортной системы, в котором у штаммов *Y. pestis* произошло увеличение количества повторов последовательности длиной 15 п.н., характерной для *Y. pseudotuberculosis* IP 32953. При том что у всех штаммов античного биовара нами выявлено три повтора (инсерция 30 п.н.), у штаммов филогенетической ветви 2.ANT3 из Китая, России и Монголии и 4.ANT из Монголии и России (все штаммы из Республики Алтай и два штамма из Республики Тыва [*Y. pestis* М-1944 и 209]) присутствуют только два повтора (инсерция 15 п.н.).

Значительный интерес представляло изучение филогенетической группы 4.ANT, внутри которой наблюдается вариабельность зависимости роста от этой аминокислоты. На основании результатов анализа питательных потребностей, состояния генов и филогенетических связей внутри этой группы можно выделить четыре популяции: два штамма *Y. pestis* из Тывы 1971 и 1987 гг. выделения (ауксотрофы по цистеину); два штамма *Y. pestis* из Тывы 2012 и

2015 гг. выделения (вариабельны по зависимости от цистеина); семь штаммов *Y. pestis* из Алтая (вариабельны по зависимости от цистеина); четыре штамма *Y. pestis* из Монголии (не зависят от цистеина).

В основании кластера филогенетической ветви 4.ANT лежат ауксотрофные по цистеину штаммы *Y. pestis* 2060 и KM932 из Тувинского очага чумы (1971 и 1987 гг. выделения соответственно) (рис. 1). Эти штаммы имеют уникальную мутацию (Т→С, 35-я позиция гена, Val→Ala) в гене *YPO1319*, кодирующем предполагаемую пермеазу АВС-транспортера D-метионина. У этих штаммов, как и у штаммов других филогенетических ветвей античного биовара, в гене *ssuA* содержится инсерция 30 п.н.

Инсерция 15 п.н. в гене *ssuA* присутствует как у двух штаммов *Y. pestis* М-1944 и 209 из Тывы 2012 и 2015 гг. выделения, так и у популяций штаммов из Алтая и Монголии. У всех этих штаммов также выявлена делеция в 52 п.н. в гене *cysM* (*YPO3011*) S-сульфо-L-цистеинсинтазы. Большинство штаммов этой группы не являются ауксотрофами по цистеину, и, значит, выявленные мутации не влияют на проявление этого признака. Исключение составляют штаммы *Y. pestis* М-1944 из Тувинского, 1097 и 50 из Горно-Алтайского очагов, однако специфичных замен у этих штаммов, связанных с ауксотрофностью по цистеину, не обнаружено.

Для установления генетических причин потребности в лейцине у штаммов *Y. pestis* античного биовара нами проанализированы последовательности генов *leuABCD* и *ilvE*, участвующих в биосинтезе этой аминокислоты (рис. 3). При анализе геномов штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 0.ANT5 выявлена делеция в размере 11 п.н. в гене *leuA* (1409–1419-я позиции гена), кодирующем синтез 2-изопропилмалатсинтазы. Эта мутация приводит

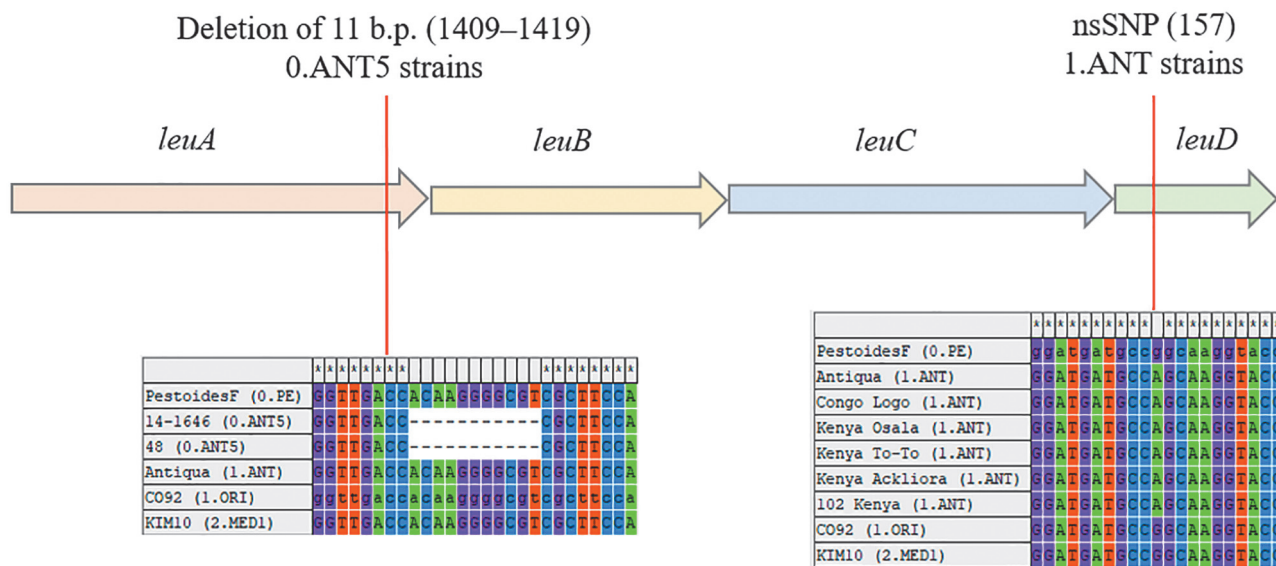


Рис. 3. Специфические мутации, характерные для штаммов *Y. pestis* филогенетических ветвей 0.ANT5 и 1.ANT античного биовара в генах оперона *leuABCD* (визуализированы в программе Mega 7.0). В скобках показаны координаты мутации от начала гена

Fig. 3. Specific mutations characteristic of *Y. pestis* strains of phylogenetic branches 0.ANT5 and 1.ANT of antiqua biovar in the genes of the *leuABCD* operon (visualized in the Mega 7.0 program). The position of the mutation from the beginning of the gene are shown in parentheses

к сдвигу рамки считывания и потере функциональности продукта и, вероятно, является причиной зависимости роста штаммов ветви 0.ANT5 от этой аминокислоты. У штаммов ветви 1.ANT в гене *leuD* малой субъединицы 3-изопропилмалатдегидратазы выявлен nsSNP (G→A, 157-я позиция гена, Gly→Ser). Возможно, менее интенсивный рост этой группы штаммов на среде в отсутствие лейцина связан с изменением конформации фермента из-за смены аминокислотного остатка.

Для поиска генетической детерминированности зависимости роста от пролина в штаммах *Y. pestis* филогенетической ветви 1.ANT мы провели анализ генов *proABC*, *poaA*, *pip*, продукты которых участвуют в синтезе этой аминокислоты. В гене *poaA* у всей группы штаммов выявлен nsSNP (G→A, 8-я позиция гена, Ser→Asn). Также в гене глутамин-5-киназы *proB* у штаммов, выделенных на территории ДПК, выявлен nsSNP (C→T, 149-я позиция гена, Ser→Phe). Однако обе выявленные мутации не могут однозначно объяснить ауксотрофность по этой аминокислоте. Следует сказать, что в геномах штаммов *Y. pestis* Nairobi и Antiqua выявлены мобильные элементы (IS100) в генах *proB* и *pip* соответственно, однако при анализе всех геномов *Y. pestis* античного биовара, использованных в настоящем исследовании, IS-элементы в этих генах не обнаружены.

Таким образом, впервые охарактеризованы питательные потребности штаммов филогенетических ветвей 1.ANT и 3.ANT2, а для ветвей 0.ANT3, 0.ANT5, 2.ANT3, 4.ANT данные по ауксотрофности уточнены в соответствии с расширением филогеографии штаммов, взятых в исследование. В настоящей работе изучение питательных потребностей проводили с учетом филогенетической принадлежности штаммов античного биовара. Применение этого подхода впервые привело к выявлению ауксотрофии по лейцину у штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 0.ANT5, а также к установлению генетической причины зависимости роста от этой аминокислоты. Ранее зависимость роста штаммов *Y. pestis* с территории Кыргызстана от присутствия в среде цистеина и лейцина связывали с географической принадлежностью к определенному очагу [6], тогда как в настоящем исследовании доказана четкая связь этого признака с филогенетической принадлежностью к ветви 0.ANT5. Установлена уникальная для штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 1.ANT зависимость роста от пролина, ранее описанная только для штаммов *Y. pestis* средневекового биовара ветви 2.MED0 из Центрально-Кавказского высокогорного очага [6, 18]. Однако при сравнении генов синтеза пролина этих групп штаммов генетической причины ауксотрофности по пролину выявить не удалось. Также следует отметить, что ранее при анализе роста штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Кении и ДПК, отмечали дополнительные питательные потребности отдельных штаммов, для части штаммов питательные потребности не установлены [19]. В на-

шем исследовании потребности штамма *Y. pestis* 102 Kenya также установить не удалось, однако сравнить данные И.Л. Мартиневского [19] с результатами нашего исследования не представляется возможным ввиду отсутствия полногеномных последовательностей и, как следствие, данных о филогенетической принадлежности исследованных им штаммов. Для штаммов филогенетической ветви 2.ANT3 из Забайкальского степного очага чумы были описаны дополнительные питательные потребности в цистеине и для части штаммов в лейцине [6]. В нашем исследовании изучены штаммы 2.ANT3, выделенные в Китае и Монголии, что дополняет наши знания об этой филогенетической группе. Установленный факт варибельности зависимости роста штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 4.ANT от присутствия в среде цистеина обращает на себя внимание в связи с его важностью для метаболизма патогенных бактерий. Так, выявлены связи между отсутствием синтеза цистеина и снижением устойчивости к окислительному стрессу *Salmonella typhimurium* [20] и *Mycobacterium tuberculosis* [21]. Первые сообщения о варибельности зависимости от цистеина внутри популяции штаммов из Тувинского горного очага чумы опубликованы С.В. Балахоновым и соавт. [22], тогда как результаты нашего исследования доказывают, что это явление характерно также для популяции штаммов филогенетической ветви 4.ANT из Горно-Алтайского высокогорного очага. Выявленная варибельность зависимости роста штаммов от присутствия в среде цистеина может быть следствием приспособления бактерий к локальным биоценозам. Закрепленные генетически изменения могут отражать микроэволюцию внутри отдельных филогеографических групп античного биовара в ходе приспособления к новым условиям окружающей среды. Результаты проведенного анализа питательных потребностей штаммов *Y. pestis* различных филогенетических ветвей античного биовара и их генетической детерминированности расширяют наши представления о фенотипических и генетических особенностях штаммов античного биовара *Y. pestis*, могут способствовать выяснению молекулярных механизмов микроэволюции этой обширной филогенетической группы высоковирулентных штаммов, а также могут быть использованы для дифференциации и типирования штаммов *Y. pestis* античного биовара из разных природных очагов мира.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Bos K.I., Schuenemann V.J., Golding G.B., Burbano H.A., Waglechner N., Coombes B.K., McPhee J.B., DeWitte S.N., Meyer M., Schmedes S., Wood J., Earn D.J., Herring D.A., Bauer P., Poinar H.N., Krause J. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of

the Black Death. *Nature*. 2011; 478(7370):506–10. DOI: 10.1038/nature10549.

2. Harbeck M., Seifert L., Hänsch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zöller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.C. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *PLoS Pathog*. 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.

3. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Wagglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet. Infect. Dis*. 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.

4. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sitdikov A.G., Castex D., Wahl J., Gazimzyanov I.R., Nurgaliev D.K., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Historical *Y. pestis* genomes reveal the European Black Death as the source of ancient and modern plague pandemics. *Cell Host Microbe*. 2016; 19(6):874–81. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.012.

5. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств. Калининград: РА Полиграфичъ; 2022. 348 с.

6. Куклева Л.М., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Сравнительный анализ питательных потребностей штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов и генетические причины их аутоотрофности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2:33–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-33-36.

7. Bearden S.W., Sexton C., Pare J., Fowler J.M., Arvidson C.G., Yerman L., Viola R.E., Brubaker R.R. Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase. *Microbiology (Reading)*. 2009; 155(Pt. 1):198–209. DOI: 10.1099/mic.0.021170-0.

8. Brubaker R.R. Interconversion of purine mononucleotides in *Pasteurella pestis*. *Infect. Immun*. 1970; 1(5):446–54. DOI: 10.1128/iai.1.5.446-454.1970.

9. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(1):27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.

10. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Генетические основы вариативности признака редукции нитратов у штаммов *Yersinia pestis*. *Генетика*. 2014; 50(5):522–30. DOI: 10.7868/S001667581405004X.

11. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet*. 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.

12. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

13. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kuleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharapova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.

14. Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebahia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdeño-Tarraga A.G., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. 2001; 413(6855):523–7. DOI: 10.1038/35097083.

15. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Павлова А.И., Кутырев В.В. Генетические основы метионинзависимости штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов. *Генетика*. 2011; 47(3):332–8.

16. Charusanti P., Chauhan S., McAteer K., Lerman J.A., Hyduke D.R., Motin V.L., Ansong C., Adkins J.N., Palsson B.O. An experimentally-supported genome-scale metabolic network reconstruction for *Yersinia pestis* CO92. *BMC Syst. Biol*. 2011; 5:163. DOI: 10.1186/1752-0509-5-163.

17. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M., Georgescu A.M., Vergez L.M., Land M.L., Motin V.L., Brubaker R.R., Fowler J., Hinnebusch J., Marceau M.,

Medigue C., Simonet M., Chenal-Francisque V., Souza B., Dacheux D., Elliott J.M., Derbise A., Hauser L.J., Garcia E. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(38):13826–31. DOI: 10.1073/pnas.0404012101.

18. Сучков Ю.Г., Розанова Г.Н., Елкин Ю.М., Грамотина Л.И. Естественная генетическая маркировка штаммов чумного микроба из природных очагов Кавказа. *Проблемы природной очаговости чумы*. 1980; 2:35–7.

19. Мартиневский И.И. К изучению особенностей штаммов чумного микроба, выделенных в некоторых районах Африки. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1975; 42(2):10–3.

20. Turnbull A.L., Surette M.G. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol*. 2010; 161(8):643–50. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.06.004.

21. Brunner K., Maric S., Reshma R.S., Almqvist H., Seashore-Ludlow B., Gustavsson A.L., Poyraz O., Yogeewari P., Lundbäck T., Vallin M., Sriram D., Schnell R., Schneider G. Inhibitors of the cysteine synthase CysM with antibacterial potency against dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem*. 2016; 59(14):6848–59. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00674.

22. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.

References

1. Bos K.I., Schuenemann V.J., Golding G.B., Burbano H.A., Wagglechner N., Coombes B.K., McPhee J.B., DeWitte S.N., Meyer M., Schmedes S., Wood J., Earn D.J., Herring D.A., Bauer P., Poinar H.N., Krause J. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature*. 2011; 478(7370):506–10. DOI: 10.1038/nature10549.

2. Harbeck M., Seifert L., Hänsch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zöller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.C. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *PLoS Pathog*. 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.

3. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Wagglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet. Infect. Dis*. 2014; 14(4):319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.

4. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sitdikov A.G., Castex D., Wahl J., Gazimzyanov I.R., Nurgaliev D.K., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Historical *Y. pestis* genomes reveal the European Black Death as the source of ancient and modern plague pandemics. *Cell Host Microbe*. 2016; 19(6):874–81. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.012.

5. Popova A.Yu., Kutyrev V.V., editors. [Atlas of Natural Plague Foci in Russia and Foreign Countries]. Kaliningrad; 2022. 348 p.

6. Kuleva L.M., Odiнокоев G.N., Shavina N.Yu., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Comparative analysis of the nutrient requirements among *Yersinia pestis* strains of the main and non-main sub-species as well as genetic causes of their auxotrophy]. *Problemy Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (2):33–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-33-36.

7. Bearden S.W., Sexton C., Pare J., Fowler J.M., Arvidson C.G., Yerman L., Viola R.E., Brubaker R.R. Attenuated enzootic (pestoides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase. *Microbiology (Reading)*. 2009; 155(Pt. 1):198–209. DOI: 10.1099/mic.0.021170-0.

8. Brubaker R.R. Interconversion of purine mononucleotides in *Pasteurella pestis*. *Infect. Immun*. 1970; 1(5):446–54. DOI: 10.1128/iai.1.5.446-454.1970.

9. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(1):27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.

10. Eroshenko G.A., Odiнокоев G.N., Kuleva L.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Kutyrev V.V. [Genetic basis of variability of the nitrate reduction feature in *Yersinia pestis* strains]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2014; 50(5):522–30. DOI: 10.7868/S001667581405004X.

11. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet*. 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.

12. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M.,

- Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
13. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzhaparova A.K., Kuttyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch O.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
14. Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebaihia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdeño-Tarraga A.M., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. 2001; 413(6855):523–7. DOI: 10.1038/35097083.
15. Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Pavlova A.I., Kuttyrev V.V. [Genetic basis of methionine dependence of *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2011; 47(3):332–8.
16. Charusanti P., Chauhan S., McAteer K., Lerman J.A., Hyduke D.R., Motin V.L., Ansong C., Adkins J.N., Palsson B.O. An experimentally-supported genome-scale metabolic network reconstruction for *Yersinia pestis* CO92. *BMC Syst. Biol.* 2011; 5:163. DOI: 10.1186/1752-0509-5-163.
17. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M., Georgescu A.M., Vergez L.M., Land M.L., Motin V.L., Brubaker R.R., Fowler J., Hinnebusch J., Marceau M., Medigue C., Simonet M., Chenal-Francisque V., Souza B., Dacheux D., Elliott J.M., Derbise A., Hauser L.J., Garcia E. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(38):13826–31. DOI: 10.1073/pnas.0404012101.
18. Suchkov Yu.G., Rozanova G.N., Elkin Yu.M., Gramotina L.I. [Natural genetic marking of plague microbe strains from natural foci of the Caucasus]. *Problemy Prirodnoy Ochagovosti Chumy [Problems of Natural Focality of Plague]*. 1980; (2):35–7.
19. Martinevsky I.L. [Regarding the study of features of plague microbe strains isolated in some regions of Africa]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 1975; 42(2):10–3.
20. Turnbull A.L., Surette M.G. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* 2010; 161(8):643–50. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.06.004.
21. Brunner K., Maric S., Reshma R.S., Almqvist H., Seashore-Ludlow B., Gustavsson A.L., Poyraz Ö., Yogeewari P., Lundbäck T., Vallin M., Sriram D., Schnell R., Schneider G. Inhibitors of the cysteine synthase CysM with antibacterial potency against dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* 2016; 59(14):6848–59. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00674.
22. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: “Medicine”; 2004. 192 p.

Authors:

Makashova M.A., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Naryshkina E.A., Kovrizhnikov A.V., Eroshenko G.A., Shvidenko I.G., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Макашова М.А., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Нарышкина Е.А., Коврижников А.В., Ерошенко Г.А., Швиденко И.Г., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.