

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-76-82

УДК 616.98:579.852.11

Е.И. Еременко, А.Г. Рязанова, Г.А. Печковский, С.В. Писаренко, Д.А. Ковалев, Л.Ю. Аксенова,
О.В. Семенова, А.Н. Куличенко

Особенности споруляции основных генетических линий *Bacillus anthracis*

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Цель работы – характеристика генов и белков споруляции штаммов *Bacillus anthracis* основных генетических линий. **Материалы и методы.** Анализ геномов проводили *in silico*, используя геномы: *B. anthracis* Ames Ancestor в качестве референсного, 47 штаммов *B. anthracis* из базы данных GenBank NCBI, относящихся к основным генетическим линиям А, В, С, геном штамма CI *Bacillus cereus biovar anthracis*, 7 штаммов из коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, а также ресурс NCBI Protein Database. Идентификацию полиморфизмов осуществляли в программах BLASTn, BLASTp, MEGA X, MAUVE, Tandem Repeat Finder. Последовательности генов и белков выравнивали в программе MEGA X. **Результаты и обсуждение.** Сравнение полиморфизмов белков и генов споруляции трех основных генетических линий показало, что количество всех форм у штаммов *B. anthracis* линий В, С и *B. cereus biovar anthracis* превышало таковые у штаммов линии А в 4,5–10, 6,8–92 и 160–2078 раз соответственно. Больше количество несинонимичных SNP в генах споруляции с изменением аминокислотного состава и функции белков у штаммов *B. anthracis* основных генетических линий В, С и *B. cereus biovar anthracis*, чем у штаммов линии А, предполагает их ограниченные адаптационные возможности и может быть одним из объяснений меньшей распространенности по сравнению с линией А.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, генетические линии, гены и белки прорастания спор.

Корреспондирующий автор: Еременко Евгений Иванович, e-mail: ejer@mail.ru.

Для цитирования: Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Печковский Г.А., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н. Особенности споруляции основных генетических линий *Bacillus anthracis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 2:76–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-76-82

Поступила 05.02.2024. Отправлена на доработку 05.03.2024. Принята к публ. 10.03.2024.

E.I. Eremenko, A.G. Ryazanova, G.A. Pechkovsky, S.V. Pisarenko, D.A. Kovalev, L.Yu. Aksenova,
O.V. Semenova, A.N. Kulichenko

Features of Sporulation of the Main Genetic Lines of *Bacillus anthracis*

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to characterize sporulation genes and proteins in *Bacillus anthracis* strains of major genetic lineages. **Materials and methods.** Genome analysis was carried out *in silico* using the genome of the Ames Ancestor strain as a reference one, 47 *B. anthracis* strains from the GenBank NCBI database, belonging to the main lineages A, B, C, the genome of the CI strain *Bacillus cereus biovar anthracis*, 7 strains from the collection of Stavropol Research Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor, as well as the NCBI Protein Database resource. Identification of polymorphisms was performed in BLASTn, BLASTp, MEGA X, MAUVE, and Tandem Repeat Finder software. Gene and protein sequences were aligned using MEGA X program. **Results and discussion.** A comparison of polymorphisms in sporulation proteins and genes of three major genetic lineages has showed that the number of all forms in *B. anthracis* strains of B, C lineages and *Bacillus cereus biovar anthracis* exceeds those in strains of lineage A by 4,5–10, 6,8–92 and 160–2078 times, respectively. A larger number of non-synonymous SNPs in sporulation genes with changes in the amino acid composition and function of proteins in *B. anthracis* strains of the major genetic lines B, C and *B. cereus biovar anthracis* than in strains of lineage A suggests their limited adaptive capabilities and may be one of the explanations for their lower prevalence as compared to line A.

Key words: *Bacillus anthracis*, genetic lineages, genes and proteins of spore germination.

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

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

Corresponding author: Evgeny I. Eremenko, e-mail: ejer@mail.ru.

Citation: Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pechkovsky G.A., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N. Features of Sporulation of the Main Genetic Lines of *Bacillus anthracis*. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2024; 2:76–82. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-76-82

Received 05.02.2024. Revised 05.03.2024. Accepted 10.03.2024.

Eremenko E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1117-1185>
Ryazanova A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>
Pechkovsky G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7033-9972>
Pisarenko S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>
Aksenova L.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>
Semenova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0274-898X>
Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* вызывает особо опасную зоонозную инфекцию с глобальным ареалом и является агентом биологического терроризма из группы А [1].

В глобальной филогенетической структуре *B. anthracis* выделяют три основные генетические линии: А, В и С [2–6]. Распределение штаммов по трем кладам неравномерно: около 90 % составляют кладу А, примерно 10 % – В и менее 0,1 % – С. Всего четыре штамма, относящихся к кладе С, выделены в 1956 г. в Вайоминге и Луизиане (США) [5]. Еще одной генетической линией являются штаммы *Bacillus cereus biovar anthracis*, возбудителя сибирской язвы, выделяемые у диких животных Западной Африки [7, 8]. Причины такого неравномерного распределения разных линий *B. anthracis* неизвестны. Предполагается, что за этим стоит разная способность к адаптации, определяемая как степенью патогенности, так и эффективностью споруляции и прорастания спор. Доминирование генотипов линии А в глобальном масштабе свидетельствует о большом репродуктивном успехе и значительном рассеивании на большие расстояния [3]. Полагают, что штаммам линии А, но не линии В, присуща гипотетическая способность вызывать латентную инфекцию у животных, с чем связано их глобальное распространение и ограниченное распространение линии В. Сравнение изолятов линий А и В из Южной Африки показало, что штаммы А адаптированы к более разнообразным средам, чем штаммы В, которые были ограничены более узкими условиями окружающей среды [9]. Ограниченное количество и географическое распределение более редких линий может возникнуть из-за больших затрат на адаптацию, связанных с нишевой специализацией [10]. Генотипы из линии С и, в меньшей степени, из линии В, по-видимому, имеют очень низкую приспособленность по сравнению с генотипами линии А. Действительно, ветвь линии С имеет значительно более медленные эволюционные темпы, чем ветвь линии А, что наводит на мысль о меньшем количестве инфекционных циклов в природе [2].

В нашей предыдущей работе показано многократное превышение числа полиморфизмов в геномах, включая гены факторов патогенности, у штаммов линий В и С по сравнению с линией А [11]. Данных относительно существования различий в генах и ферментах споруляции у штаммов разных основных генетических линий *B. anthracis* в доступной литературе нет.

Споруляция, инициируемая истощением питательных веществ, – сложный процесс дифференцировки, протекающий в несколько стадий. Ферменты, функционирующие на этих стадиях, и кодирующие их гены обозначаются как *Spo0–VII (spo0–VII)* [12].

В бактериальных клетках двухкомпонентные системы передачи сигналов являются центральными элементами клеточных регуляторных путей и обычно используются для ощущения изменений окружающей среды и влияния на экспрессию

генов [13]. Эти системы состоят из сигнального лиганд-чувствительного сенсора гистидинкиназы и двухдоменного регулятора ответа, который обычно является транскрипционным фактором. В ответ на специфические сигналы сенсорные киназы катализируют АТФ-зависимую реакцию аутофосфорилирования консервативного остатка гистидина. Эта фосфорильная группа впоследствии переносится на консервативный аспартатный остаток в регуляторном домене специфического регулятора ответа – транскрипционного фактора, с которым связана сенсорная киназа. Фосфорилирование регуляторного домена активирует транскрипционные активационные и/или репрессивные свойства выходного домена [14].

Предполагается, что приобретение *B. anthracis* плазмиды *pXO1* и патогенности может потребовать демпфирования регуляции споруляции путем мутационной селекции дефектов сенсора споруляции гистидинкиназы [15].

Актуальность проведенной работы определяется отсутствием данных, которые значимы для развития представлений о различиях в генетическом аппарате споруляции у штаммов разных основных генетических линий, связанных с их адаптационными возможностями, потенциально определяющими неравномерность их распределения.

Целью работы являлась характеристика с оценкой полиморфизма генов и белков споруляции у штаммов *B. anthracis* основных генетических линий.

Материалы и методы

Исследовали полные геномы штаммов *B. anthracis* из базы данных GenBank NCBI, относящихся ко всем 14 *canSNP*-группам основных генетических линий А (31 штамм), В (11 штаммов), С (5 штаммов), и геном штамма *CI Bacillus cereus biovar anthracis*, ресурс NCBI Protein Database.

Идентификаторы Genbank RefSeq для геномов: GCF_000008445.1, GCF_009831565.1, GCF_000167335.1, GCF_003063965.1, GCF_003064045.1, GCF_003860145.1, GCF_000793525.1, GCF_000832965.1, GCF_000310045.1, GCF_000167235.1, GCF_000534935.2, GCF_000258885.1, GCF_000278385.1, GCF_000832465.1, GCF_001273005.1, GCF_001273085.1, GCF_000167295.1, GCF_002896575.1, GCF_014249775.1, GCF_003227955.1, GCF_000831505.1, GCF_000832745.1, GCF_003064005.1, GCF_000008165.1, GCF_000583105.1, GCF_000833275.1, GCF_022221345.1, GCF_000743805.1, GCF_900014355.1, GCF_002356575.1, GCF_000143605.1, GCF_000181675.2, GCF_001277955.1, GCF_000167315.1, GCF_000832785.1, GCF_002980615.3, GCF_000833125.1, GCF_022221285.1, GCF_006088855.1, GCF_000725325.1, GCF_001936375.1, GCF_022221085.1, GCF_021390035.1, GCF_000742655.1, GCF_000782995.1, GCF_000167255.1, GCF_022221185.1, GCF_000143605.1 (URL: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/833/275/>).

Анализировали также 7 полных геномов штаммов из коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, отобранных по признаку принадлежности к 5 canSNP-группам, встречающимся на территории России, Грузии и Азербайджана (табл. 1).

Анализ геномов проводили *in silico*, используя геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor canSNP-группы A.Br.Ames (GenBank: NC_007530.2; NC_007322.2; NC_007323.3) в качестве референсного. Последовательности генов и белков выравнивали в программе MEGA 10 с геномом референс-штамма. Идентификацию полиморфизмов осуществляли в программах BLASTn, BLASTp, MEGA X, MAUVE, Tandem Repeat Finder

Результаты и обсуждение

Гены и белки споруляции *B. anthracis*. Анализ *in silico* генома референс-штамма *B. anthracis* Ames Ancestor показал наличие 66 генов, кодирующих белки, относящиеся к споруляции. В выборке штаммов трех генетических линий *B. anthracis*, относящихся к 14 canSNP-группам, и штамма *B. cereus* *bv anthracis* *str CI*, варибельными были 35 генов, варибельность определялась SNP, INDELs, у кодируемых белков – заменами аминокислот (а.к.) и размерами (табл. 2).

Основная генетическая линия А. Из 35 белков варибельны 8, остальные – как у референс-штамма. Spo0J – один вариант, но ген штамма Tsiankovskii-1 с синонимичным SNP 705T→C. Spo0M – два варианта размером 252 и 251 а.к., последний отличается делецией T67, ген имеет делецию 198-200. SpoIID – два варианта, референсный и отличающийся у штамма 351/520 (canSNP-группа A.Br.Aust94) с синонимичным SNP 927C→T. SpoVAD – два негомолгичных варианта размером 338 а.к. у всех штаммов линии А. KinB – три варианта размером 424 а.к., два из которых отличались от белка референс-штамма заменами M297I (штаммы canSNP-группы A.Br.005/006) и R409Q (штаммы canSNP-группы A.Br.Vollum), вызываемыми несинонимичными SNP 891G→A и 1225A→C соответственно в гене. YtaF – три варианта, референсный размером 203 а.к. и два размером

210 а.к. Один отличается заменой К (лизин) на неизвестную аминокислоту или одним SNP с неоднозначной заменой A271R в гене *ytaF*, имеется только у штамма Tangail-1 (canSNP-группа A.Br.001/002). YtvI – три варианта, один встречается только у штаммов canSNP-группы A.Br.005/006 (Ancient A) и отличается от референсного варианта, присущего остальным девяти canSNP-группам линии А, несинонимичным SNP 715A→G (V239I), третий – у штамма 1390/13 с несинонимичным SNP 927G→C (E309D). YuaC – два варианта, 198 и 199 а.к., последний отличается делецией A576, дополнительным изолейцином в положении 200 из-за вставки ATAA598-601 в гене и принадлежит штамму Shikan-NIID (canSNP-группа A.Br.Ames).

В целом 35 белков споруляции выборки из 35 штаммов главной линии А имели 43 варианта. Для 29 белков имелся только 1 вариант, для 4 белков – 2 варианта, для 2 белков – 3 варианта. Частота встречаемости полиморфизмов составляла для SNP 0,205, инделов – 0,05 и замен а.к. – 0,114 в пересчете на 1 штамм.

Основная генетическая линия В. Spo0M – два варианта, 251 а.к., у обоих делеция T70, в гене делеция 198-200AAC, у штамма Kruger В неоднозначные замены T67X и SNP 202A→M. Spo0J – один вариант, несинонимичный SNP 433T→C (C145R).

SpoIIM – два варианта, референсный 215 а.к., с синонимичным SNP 513A→G в гене у штаммов NYU01, 1386/1, 228 и 1284, второй – 205 а.к. с делецией 1-10 MWRKWTQDRV и 1-30 в гене у большинства штаммов линии В. SpoIID – один вариант, с несинонимичным SNP 364G→A (D122N). SpoIIP – два варианта, один референсный, 384 а.к., присущий всем canSNP группам линии В, второй – 386 а.к. у штамма Kruger В, с двумя инсерциями и одной неопределенной заменой а.к. E374? (в гене SNP A→R). SpoVAD – два негомолгичных варианта размером 338 а.к. у всех штаммов линии В. SpoVT – два варианта, референсный у штаммов группы B.Br.CNEVA, второй – у остальных штаммов линии В с несинонимичным SNP 439G→A (A147T). KinB – два варианта разного размера и разного аминокислотного состава, имеющиеся у всех canSNP групп линии В. У одного – несинонимичный SNP 91A→G (T31A). YtaF – два вари-

Таблица 1 / Table 1

Штаммы из коллекции Ставропольского противочумного института
Strains from the collection of the Stavropol Anti-Plague Institute

№ п/п No	Штамм Strain	Год выделения Year of isolation	Место выделения / Site of isolation	Источник выделения / Source of isolation	canSNP-группа canSNP-group
1	И-45(I-45)	1966	РФ, Республика Тыва / RF, Republic of Tuva	Почва / Soil	A.Br.001/002
2	351/520	1976	Азербайджан / Azerbaijan	Почва / Soil	A.Br.Aust94
3	И-319(I-319)	1983	РФ, Омск / RF, Omsk	Человек / Patient	A.Br.Ames
4	1390/13	2022	РФ, Дагестан / RF, Dagestan	Язва больного / Patient's ulcer	A.Br.008/011
5	228	1946	Грузия / Georgia	Труп овцы / Sheep corpse	B.Br.001/002
6	1284	2010	РФ, Омск / RF, Omsk	Пельмени / Meat dumplings	B.Br.001/002
7	1386/1	2021	РФ, Республика Тыва / RF, Republic of Tuva	Струп больного / Patient's scab	B.Br.001/002

Таблица 2 / Table 2

Структурные и функциональные особенности белков и генов споруляции у штаммов *B. anthracis* разных генетических линий
Structural and functional features of sporulation proteins and genes of *B. anthracis* strains of different genetic lineages

Основные генетические линии / Major lineages																				
		A				B				C				Bacillus cereus biovar anthracis						
		Полиморфизмы / Polymorphisms																		
№ п/п No	Белок Protein	SNP	INDEL	Замены аминокислот Amino acid substitutions	Варианты белков Protein variants	SNP	INDEL	Замены аминокислот Amino acid substitutions	Варианты белков Protein variants	SNP	INDEL	Замены аминокислот Amino acid substitutions	Варианты белков Protein variants	SNP	INDEL	Замены аминокислот Amino acid substitutions	Варианты белков Protein variants	Beero Total		
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
1	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	5	0	0	1	9		
2	Sporulation transcription factor Spo0A	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	11		
3	Stage 0 sporulation protein Spo0J	1	1	0	2	1	2	0	2	1	0	0	1	7	1	2	1	22		
4	Sporulation-control protein spo0M	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	32	0	9	1	47		
5	Stage II sporulation protein D SpoIID	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4		
6	Stage II sporulation protein E SpoIIE	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0	2	15	1	0	3	26		
7	Stage II sporulation protein M SpoIIM	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	15	0	6	1	24		
8	Stage II sporulation protein P	0	0	0	1	1	2	0	2	0	0	0	2	9	0	2	1	43		
9	Stage II sporulation protein SpoIIP	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3	2	1	1	10		
10	Stage II sporulation protein R SpoIIR	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	11	0	2	1	17		
11	Stage III sporulation protein AA SpoIIIAA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	8	0	1	1	13		
12	Stage III sporulation protein AB SpoIIAB	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4		
13	Sporulation transcriptional regulator SpoIIID	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	24		
14	Stage III sporulation protein AE SpoIIIAE	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	19	0	1	1	6		
15	Stage III sporulation protein AF SpoIIIAF	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	12		
16	Stage III sporulation protein AG spoIIAG	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	6	0	2	1	12		
17	Stage IV sporulation protein A spoIVA	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	6	0	0	1	12		
18	Stage IV sporulation protein SpoIVFA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	6	0	2	1	12		
19	Stage IV sporulation intramembrane metalloprotease SpoIVF _B	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	8	0	2	1	14		
20	Stage V sporulation protein SpoVAD	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	20	0	2	2	30		
21	Stage V sporulation protein SpoVAA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2	1	1	8		
22	Stage V sporulation protein SpoVAE	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4		

Окончание табл. 2 / Ending of table 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
22	Stage V sporulation protein B SpoVB	1	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	1	48	0	5	1	60
23	Stage_V_sporulation_protein_K SpoVK	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	10	0	1	1	18
24	Stage V sporulation protein R SpoVR	0	0	0	1	1	0	1	2	0	0	0	1	32	0	1	1	40
25	Stage_V_sporulation_protein_T SpoVT	0	0	0	1	1	0	1	2	0	0	0	1	1	0	1	1	9
26	Stage VI sporulation protein D SpoVID	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4	0	1	1	9
27	Sporulation specific diadenylate cyclase CdaS	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	9	0	2	1	15
28	Sporulation kinase KinA	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	58	2	11	1	73
29	Sporulation sensor histidine kinase KinB	2	0	2	3	1	0	1	2	0	0	0	1	10	2	3	2	30
30	KinB signaling pathway activation protein KbaA	0	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	1	2	0	0	1	8
31	Sporulation integral membrane protein YlbJ	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	10	0	2	1	16
32	Sporulation protein YqfD	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	42	0	5	1	53
33	Sporulation_membrane_protein YtaF	1	0	1	3	0	0	0	2	0	0	0	2	2	0	1	2	11
34	Sporulation integral membrane protein YtvI	1	0	1	2	2	0	2	2	1	0	1	1	25	0	5	1	47
35	Spore protease YyaC	0	1	0	2	1	0	1	1	0	0	0	1	1	2	1	2	14
	Всего / Total	7	2	4	43	13	7	8	44	7	1	6	39	426	8	73	41	
	На 1 штамм / Per 1 strain	0,205	0,05	0,114		0,92	0,50	0,57		1,4	0,2	1,2		426	8	73		

анта разных размеров у всех штаммов линии B. YtvI – два варианта, один – для штаммов всех *can*SNP-групп с несинонимичным SNP 571A→T (N191Y), второй, с несинонимичным SNP 787G→T (V263I), – для штаммов групп B.Br.001/002 и B.Br.Kruger B.

В целом 35 белков споруляции выборки из 14 штаммов главной линии B имели 44 варианта. Для 26 белков имелся только 1 вариант, для 9 – 2 варианта. Частота встречаемости полиморфизмов составляла для SNP 0,92, инделов – 0,50 и замен а.к. – 0,57 в пересчете на 1 штамм.

Основная генетическая линия C. SpoIIM – два варианта, отличающиеся размерами, наличием индела и одним SNP. Один характерен в основном штаммам *B. anthracis*, второй, большего размера, – для многих видов. SpoIIP – два варианта у всех штаммов линии C, отличающиеся размерами и аминокислотным составом. Вариант большего размера (384 а.к.) встречается у разных видов бацилл, меньший (368 а.к.) – ограничен группой *B. cereus*. SpoVAD – два варианта одного размера, с разным а.к. составом, один имеется у всех штаммов линии C, второй – только у штамма 2002013094. YtaF – два варианта, разных размеров и а.к. состава, имеются у всех штаммов главной линии C.

Всего у 5 штаммов линии C для 35 белков идентифицировано 39 вариантов. У 31 белка был только 1 вариант, у 4 белков – 2 варианта. Частота встречаемости полиморфизмов составляла для SNP 1,4, инделов – 0,2 и замен а.к. – 1,2 в пересчете на 1 геном.

Bacillus cereus biovar anthracis. SpoIIM – три варианта. Один отличается делецией а.к. 1-10 (нуклеотидов 1-30) и 8-ю SNP в гене. Второй вариант есть только у *B. cereus biovar anthracis str CI*, отличается размерами, аминокислотным и нуклеотидным составом. Третий соответствует референсному. SpoVAD – два варианта одного размера. Один отличается одной заменой а.к. и 15 SNP в гене, второй – одной заменой а.к. и 5 SNP.

YtaF – два варианта разных размеров и аминокислотного состава. Меньший из них отличается от референсного одной заменой а.к. и 2 SNP в гене. YyaC – два варианта одного размера. Один отличается одной заменой а.к. и 1 SNP в гене, двумя инделами, второй – двумя инделами. KinB – два варианта разного размера. Один отличается одной заменой а.к. и 5 SNP в гене. Второй – двумя заменами а.к. и 5 SNP в гене. В целом для 35 белков штамма CI *B. cereus biovar anthracis* выявлен 41 вариант. Для 30 белков имелся только 1 вариант, для 4 белков – по 2 варианта, для одного – 3 варианта. Гены имеют 426 SNP. Частота встречаемости полиморфизмов составляла для SNP 426, инделов – 8 и замен а.к. – 73 в пересчете на 1 геном.

Споруляция и прорастание спор у *Bacillus* являются сложными процессами, требующими согласованного действия многих генов.

Транскрипционный фактор споруляции Spo0A, с которым связана сенсорная гистидинкиназа, является главным регулятором начала споруляции. Он на-

прямую контролирует экспрессию более 120 генов, а его активность влияет на экспрессию примерно 12 % всего генома. Активированный Spo0A связывается с 12-п.н. консенсусной последовательностью, расположенной в промоторных последовательностях, тем самым активируя или подавляя нижележащие гены. Из-за своей ключевой роли мутации в Spo0A, приводящие к инактивации, способствуют полной утрате спорообразования [16].

Показано, что одной из функций белка Spo0A является негативная регуляция другого регуляторного локуса, *abrB*, который контролирует экспрессию многих генов, связанных с началом споруляции [17]. Spo0A – консервативный белок, состоящий из 264 аминокислот, по нашим данным, у всех изученных штаммов *B. anthracis* трех основных линий есть только один вариант, который присущ также *B. cereus biovar anthracis* и как минимум 382 представителям рода *Bacillus*, охарактеризованным в базе данных NCBA Protein. Консерватизм определяется его ключевой функцией в регуляции начала споруляции и контроле экспрессии многих генов.

В пределах линий *B. anthracis* консерватизм свойственен также белкам SpoIIE, stage II sporulation protein P, SpoIIR, SpoIIAA, SpoIIAB, SpoIIAE, SpoIIAG, SpoIIID, SpoIVFA, SpoIVFB, SpoVAA, SpoVAE, SpoVID, CdaS, YlbJ, KinA. Напротив, вторая основная сенсорная гистидинкиназа KinB встречается в трех вариантах у штаммов *B. anthracis* линии А и в двух – у штаммов линии В и *B. cereus biovar anthracis*.

Сравнение полиморфизмов белков и генов споруляции трех основных генетических линий показало, что количество всех форм у штаммов *B. anthracis* линий В, С и *B. cereus biovar anthracis* превышало таковые у штаммов линии А в 4,5–10, 6,8–92 и 160–2078 раз соответственно. Сходные данные получены нами при анализе полиморфизма генов и белков факторов патогенности основных линий. Штаммы наименее распространенной линии С имели в 4,5 раза больше, а штаммы линии В с ограниченным распространением в 3 раза больше видов полиморфизмов, чем штаммы многочисленной линии А. Преимущественная локализация нуклеотидных замен, в том числе значимых, внутри изученных генов могла изменять функции соответствующих белков. Экспансия линии А может объясняться преимуществами в сравнении с линиями В и С, закрепленными в ходе эволюции. Линия С, эволюционно более древняя, базовая по отношению к линиям В и А и наименее приспособленная, ограничена в распространении отрицательным отбором [11]. Это предполагает ограниченные адаптационные возможности штаммов генетических линий В и С, *B. cereus biovar anthracis* и может быть одним из объяснений меньшей их распространенности по сравнению с линией А.

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. Rotz L.D., Khan A.S., Lillibridge S.R., Ostroff S.M., Hughes J.M. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(2):225–30. DOI: 10.3201/eid0802.010164.
2. Pearson T., Busch J.D., Ravel J., Read T.D., Rhoton S.D., U'Ren J.M., Simonson T.S., Kachur S.M., Leadem R.R., Cardon M.L., Van Ert M.N., Huynh L.Y., Fraser C.M., Keim P. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101(37):13536–41. DOI: 10.1073/pnas.0403844101.
3. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.
4. Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., Schupp J.M., Gillece J.D., Heaton H., Birdsall D., Hepp C., Fofanov V., Nosedá R., Fasanella A., Hoffmaster A., Wagner D.M., Keim P. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio.* 2016; 7(5):e01501–16. DOI: 10.1128/mBio.01501-16.
5. Bruce S.A., Schiraldi N.J., Kamath P.L., Easterday W.R., Turner W.C. A classification framework for *Bacillus anthracis* defined by global genomic structure. *Evol. Appl.* 2020; 13(5):935–44. DOI: 10.1111/eva.12911.
6. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.
7. Leendertz F.H., Ellerbrok H., Boesch C., Couacy-Hymann E., Mätz-Rensing K., Hakenbeck R., Bergmann C., Abaza P., Junglen S., Moebius Y., Vigilant L., Formenty P., Pauli G. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature.* 2004; 430(6998):451–2. DOI: 10.1038/nature02722.
8. Klee S.R., Brzuszkiewicz E.B., Nattermann H., Brüggemann H., Dupke S., Wollherr A., Franz T., Pauli G., Appel B., Liebl W., Couacy-Hymann E., Boesch C., Meyer F.D., Leendertz F.H., Ellerbrok H., Gottschalk G., Grunow R., Liesegang H. The genome of a bacillus isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One.* 2010; 5(7):e10986. DOI: 10.1371/journal.pone.0010986.
9. Smith K.L., DeVos V., Bryden H., Price L.B., Hugh-Jones M.E., Keim P. *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. *J. Clin. Microb.* 2000; 38(10):3780–4. DOI: 10.1128/JCM.38.10.3780-3784.2000.
10. Kassen R., Llewellyn M., Rainey P.B. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. *Nature.* 2004; 431(7011):984–8. DOI: 10.1038/nature02923.
11. Еременко Е.И., Печковский Г.А., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н. Анализ *in silico* геномов штаммов *Bacillus anthracis* главных генетических линий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2023; 100(3):155–65. DOI: 10.36233/0372-9311-385.
12. Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 1993; 57(1):1–33. DOI: 10.1128/mr.57.1.1-33.1993.
13. Hoch J.A., Silhavy T.J., editors. Two-Component Signal Transduction. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1995.
14. Stephenson K., Hoch J.A. Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Mol. Microbiol.* 2002; 46(2):297–304. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03186.x.
15. Bruning R.L., La Clair C., Tang S., Chiang C., Hancock L.E., Perego M., Hoch J.A. Characterization of sporulation histidine kinases of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(20):6972–81. DOI: 10.1128/JB.187.20.6972-6981.2005.
16. Sastalla I., Rosovitz M.J., Leppla S.H. Accidental selection and intentional restoration of sporulation-deficient *Bacillus anthracis* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(18):6318–21. DOI: 10.1128/AEM.00950-10.
17. Strauch M., Webb V., Spiegelman G., Hoch J.A. The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990; 87(5):1801–5. DOI: 10.1073/pnas.87.5.1801.

References

1. Rotz L.D., Khan A.S., Lillibridge S.R., Ostroff S.M., Hughes J.M. Public health assessment of potential biological terro-

rism agents. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(2):225–30. DOI: 10.3201/eid0802.010164.

2. Pearson T., Busch J.D., Ravel J., Read T.D., Rhoton S.D., U'Ren J.M., Simonson T.S., Kachur S.M., Leadem R.R., Cardon M.L., Van Ert M.N., Huynh L.Y., Fraser C.M., Keim P. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101(37):13536–41. DOI: 10.1073/pnas.0403844101.

3. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.

4. Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., Schupp J.M., Gillece J.D., Heaton H., Birdsall D., Hepp C., Fofanov V., Noseda R., Fasanella A., Hoffmaster A., Wagner D.M., Keim P. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio.* 2016; 7(5):e01501-16. DOI: 10.1128/mBio.01501-16.

5. Bruce S.A., Schiraldi N.J., Kamath P.L., Easterday W.R., Turner W.C. A classification framework for *Bacillus anthracis* defined by global genomic structure. *Evol. Appl.* 2020; 13(5):935–44. DOI: 10.1111/eva.12911.

6. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.

7. Leendertz F.H., Ellerbrok H., Boesch C., Couacy-Hymann E., Mätz-Rensing K., Hakenbeck R., Bergmann C., Abaza P., Junglen S., Moebius Y., Vigilant L., Formenty P., Pauli G. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature.* 2004; 430(6998):451–2. DOI: 10.1038/nature02722.

8. Klee S.R., Brzuszkiewicz E.B., Nattermann H., Brüggemann H., Dupke S., Wöhlherr A., Franz T., Pauli G., Appel B., Liebl W., Couacy-Hymann E., Boesch C., Meyer F.D., Leendertz F.H., Ellerbrok H., Gottschalk G., Grunow R., Liesegang H. The genome of a bacillus isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One.* 2010; 5(7):e10986. DOI: 10.1371/journal.pone.0010986.

9. Smith K.L., DeVos V., Bryden H., Price L.B., Hugh-Jones M.E., Keim P. *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. *J. Clin. Microb.* 2000; 38(10):3780–4. DOI: 10.1128/JCM.38.10.3780-3784.2000.

10. Kassen R., Llewellyn M., Rainey P.B. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. *Nature.* 2004; 431(7011):984–8. DOI: 10.1038/nature02923.

11. Eremenko E.I., Pechkovsky G.A., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N. [In silico analysis of genomes of *Bacillus anthracis* strains belonging to major genetic lineages]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2023; 100(3):155–65. DOI: 10.36233/0372-9311-385.

12. Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 1993; 57(1):1–33. DOI: 10.1128/mr.57.1.1-33.1993.

13. Hoch J.A., Silhavy T.J., editors. Two-Component Signal Transduction. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1995.

14. Stephenson K., Hoch J.A. Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Mol. Microbiol.* 2002; 46(2):297–304. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03186.x.

15. Brunsing R.L., La Clair C., Tang S., Chiang C., Hancock L.E., Perego M., Hoch J.A. Characterization of sporulation histidine kinases of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(20):6972–81. DOI: 10.1128/JB.187.20.6972-6981.2005.

16. Sastalla I., Rosovitz M.J., Leppla S.H. Accidental selection and intentional restoration of sporulation-deficient *Bacillus anthracis* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(18):6318–21. DOI: 10.1128/AEM.00950-10.

17. Strauch M., Webb V., Spiegelman G., Hoch J.A. The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the abrB gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990; 87(5):1801–5. DOI: 10.1073/pnas.87.5.1801.

Authors:

Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pechkovsky G.A., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Печковский Г.А., Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.