

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-126-132

УДК 579.842.23:579.25

Д.А. Кузнецова, А.С. Водопьянов, А.Л. Трухачев, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова

Анализ генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина иерсиний

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Исследование посвящено изучению генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина (Ych), кодируемых *ysu*-кластером генов и обнаруженных только у *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. **Цель** исследования – анализ генов, кодирующих биосинтез иерсиниахелина, и оценка возможности их использования для внутривидовой дифференциации иерсиний. **Материалы и методы.** В работе использовали полные нуклеотидные последовательности 583 штаммов *Y. pestis* и 300 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI, а также 38 штаммов *Y. pestis* и 88 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из коллекции ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Геномы штаммов анализировали с помощью методов биоинформатики и ПЦР *in silico* и *in vitro*. **Результаты и обсуждение.** Сравнение генов *ysu*-кластера двух видов иерсиний выявило их высокую консервативность у чумного микроба, в то время как у псевдотуберкулезного микроба обнаружены различия в структуре терминатора транскрипции генов биосинтеза Ych. Как выяснилось, терминатор содержит тандемные повторы нуклеотидов, различающиеся по количеству у разных групп штаммов *Y. pseudotuberculosis*, что может быть использовано для внутривидовой дифференциации этих бактерий. Для оценки влияния структуры терминатора транскрипции на эффективность экспрессии Ych штаммами чумного и псевдотуберкулезного микробов сконструированы две рекомбинантные плазмиды, содержащие копии оперонов биосинтеза Ych из *Y. pestis* KIM и *Y. pseudotuberculosis* YPIII, полученные методом ПЦР. Введение рекомбинантных плазмид в штамм *Escherichia coli* H1884, лишенный собственных сидерофоров, продемонстрировало, что оперон штамма YPIII определяет значительно более высокую экспрессию Ych, чем оперон штамма KIM. Результаты проведенного исследования показывают, что структура терминатора транскрипции оперона биосинтеза Ych оказывает значительное влияние на экспрессию этого сидерофора и может быть использована для внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis* при эпидемиологическом мониторинге.

Ключевые слова: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, иерсиниахелин, сидерофор.

Корреспондирующий автор: Кузнецова Дарья Александровна, e-mail: Kuznetsova_DA@antiplague.ru.

Для цитирования: Кузнецова Д.А., Водопьянов А.С., Трухачев А.Л., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Анализ генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина иерсиний. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 3:126–132. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-126-132

Поступила 10.01.2024. Отправлена на доработку 15.01.2024. Принята к публ. 23.01.2024.

D.A. Kuznetsova, A.S. Vodop'yanov, A.L. Trukhachev, V.A. Rykova, O.N. Podladchikova**Analysis of the Genetic Determinants of Yersiniachelin Siderophore of *Yersinia***

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The study is focused on the genetic determinants of the yersiniachelin (Ych) siderophore encoded by the *ysu* gene cluster and found only in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. **The aim** of the investigation was to analyze the genes encoding the biosynthesis of Ych and to assess the possibility of their use for intraspecies differentiation of *Yersinia*. **Materials and methods.** The study used complete nucleotide sequences of 583 *Y. pestis* strains and 300 *Y. pseudotuberculosis* strains from the NCBI database, as well as 38 *Y. pestis* and 88 *Y. pseudotuberculosis* strains from culture collection at the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor. The genomes were analyzed using bioinformatics methods and PCR *in silico* and *in vitro*. **Results and discussion.** A comparison of the *ysu* cluster genes in two *Yersinia* species has revealed their high conservatism in the plague microbe, while differences in the structure of the transcription terminator of the Ych biosynthesis genes have been found in the pseudotuberculosis microbe. It turned out that the terminator contains nucleotide tandem repeats that differ in the number in different groups of *Y. pseudotuberculosis* strains, thus indicating their potential use for intraspecies differentiation of these bacteria. To assess the effect of the transcription terminator structure on the Ych expression by plague and pseudotuberculosis microbes, two recombinant plasmids containing PCR copies of Ych biosynthesis operons from *Y. pestis* KIM and *Y. pseudotuberculosis* YPIII have been constructed. The introduction of both plasmids into the *Escherichia coli* H1884 strain, devoid of its own siderophores, has demonstrated that the operon of the YPIII strain determines a significantly higher expression of Ych than that of the KIM strain. The results of the study show that the structure of the transcription terminator of the Ych biosynthesis operon has a considerable impact on the expression of this siderophore and can be used for intraspecies differentiation of *Y. pseudotuberculosis* strains during epidemiological monitoring.

Key words: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, yersiniachelin, siderophore.

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

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

Corresponding author: Dariya A. Kuznetsova, e-mail: Kuznetsova_DA@antiplague.ru.

Citation: Kuznetsova D.A., Vodop'yanov A.S., Trukhachev A.L., Rykova V.A., Podladchikova O.N. Analysis of the Genetic Determinants of Yersiniachelin Siderophore of *Yersinia*. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2024; 3:126–132. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-126-132

Received 10.01.2024. Revised 15.01.2024. Accepted 23.01.2024.

Kuznetsova D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4198-0629>
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
Trukhachev A.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>Rykova V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3484-5100>
Podladchikova O.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7178-2255>

Среди всех микроэлементов, способных влиять на исход взаимодействия патогенных бактерий с организмом хозяина, железо является одним из наиболее важных, поскольку оно необходимо для роста, деления и функционирования клеток [1]. Большинство бактерий для ассимиляции железа используют сидерофоры – разнообразные по структуре низкомолекулярные органические соединения, которые представляют собой высокоаффинные хелаторы железа, извлекающие металл из его комплексов с белками и доставляющие его клеткам с помощью специфичных для каждого сидерофора белковых рецепторов [2]. За последние годы получено много данных о структуре, путях метаболизма и роли сидерофоров в физиологии микроорганизмов. Исследование этих молекул у разных патогенных бактерий показало, что они являются важными факторами вирулентности, которые выполняют множество функций в организме хозяина, помимо обеспечения микробов железом и другими биологическими металлами [3–5].

Многие бактерии продуцируют несколько разных сидерофоров [6], способность к продукции которых коррелирует с патогенным потенциалом бактерий [7]. Однако у высокопатогенного возбудителя чумы (*Yersinia pestis*) до наших исследований был выявлен только один сидерофор – иерсиниабактин (Ybt), важный фактор вирулентности бактерий [8], широко распространенный среди энтеробактерий. На протяжении многих лет Ybt считался единственным сидерофором *Y. pestis* [9], но в полногеномных последовательностях *Y. pestis* выявлены гены биосинтеза и других сидерофоров, экспрессия которых *in vitro* и *in vivo* подтверждается результатами транскриптомных исследований [10]. Наши исследования свидетельствуют о том, что, помимо Ybt, *Y. pestis* действительно синтезирует еще один сидерофор – иерсиниахелин (Ych), который кодируется хромосомным *usi*-кластером генов [11]. Анализ этого кластера показал, что по структурной организации и нуклеотидной последовательности отдельных генов он сходен с кластером генов, кодирующих синтез и транспорт гидроксаматного сидерофора алкалигина, который является важным фактором вирулентности бордетелл [12].

В нашей предыдущей работе [11] для доказательства функциональности генов *usi*-кластера и изучения возможных функций Ych гены его биосинтеза из штамма *Y. pestis* EV76 клонированы в клетках *Escherichia coli*, не продуцирующих собственный сидерофор энтеробактин. Эти исследования показали, что Ych не только может экспрессироваться в клетках кишечной палочки, но и способствует защите бактерий от реактивных соединений кислорода. Анализ роли Ych на модели трех вариантов вакцинного штамма *Y. pestis* EV76, различающихся по продукции Ych, позволил установить, что Ych играет

важную роль в физиологии *Y. pestis*, участвуя в ассимиляции бактериями железа и защищая их от реактивных соединений кислорода [13]. Полученные в наших исследованиях результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения Ych как в фундаментальных исследованиях патогенеза чумы и псевдотуберкулеза, так и в прикладных исследованиях для разработки новых методов диагностики, профилактики и лечения вызываемых патогенными иерсиниями заболеваний.

Целью исследования является анализ генов, кодирующих биосинтез иерсиниахелина, и оценка возможности их использования для внутривидовой дифференциации иерсиний.

Материалы и методы

Использованные в работе штаммы иерсиний получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы культивировали на плотных и жидких средах: LB (DIFCO, США), NB (DIFCO, США) и среде Хоттингера (pH 7,2). Соответствие штаммов паспортным данным проверяли по различным дифференциально-диагностическим тестам [14], лежащим в основе идентификации и внутривидовой дифференциации иерсиний. Подтверждение видовой принадлежности штаммов иерсиний проводили также с помощью ПЦР, используя коммерческие диагностические наборы «АмплиСенс® *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*-FL» (Москва, Россия).

Отбор рекомбинантных плазмид, содержащих гены биосинтеза Ych в составе вектора pSCA-amp/kan, проводили в штамме *E. coli* Strata (Stratagene, США). Для экспрессии рекомбинантного Ych использован штамм *E. coli* H1884, не синтезирующий собственный сидерофор энтеробактин (штамм получен от доктора А. Ракина, Германия). При выращивании штаммов *E. coli*, содержащих векторную и рекомбинантные плазмиды, в среды добавляли антибиотики: ампициллин (50 мкг/мл) и канамицин (25 мкг/мл).

Анализ сидерофорной активности штаммов проводили на индикаторной среде, разработанной для выявления сидерофоров у разных видов бактерий и содержащей хромогенный хелатор железа хромазурол S (CAS), который при 30%-м насыщении железом имеет сине-зеленую окраску [15]. Среда изменяет цвет на желтый после удаления из CAS-реагента железа сидерофорами, выделяемыми бактериями. Для индукции сидерофорной активности перед посевом на индикаторную среду штаммы *E. coli* выращивали при 26 °C на железodefицитной среде NB, содержащей 50 мкМ 2-2'-дипиридила. Бактериальные взвеси для экспериментов готовили

Таблица 1 / Table 1

Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров

Nucleotide sequences of primers used in the study

Праймер Primer	Нуклеотидные последовательности Nucleotide sequence	Происхождение Origin
<i>pM13rev</i>	5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'	StrataClone
<i>ysuF</i>	5' CGTTGCCGGATCATTACTGACCCTGAAT 3'	Настоящее исследование Current study
<i>ysuR</i>	5' CGTTGCCGGATCATTACTGACCCTGAAT 3''	Настоящее исследование Current study
<i>ysuinterF</i>	5' AGCACATGCTGGATTAGCTGAC 3''	Настоящее исследование Current study
<i>ysu-interR</i>	5' AAGCCTTTGGTGATACCCCG 3''	Настоящее исследование Current study

на забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР), количество содержащихся в них бактерий определяли, используя оптический отраслевой стандарт мутности Тарасевича, также проводили измерение оптической плотности и высеив культур на плотную питательную среду LB для подсчета выросших колоний. На CAS-агар пятном наносили по 10 мкл суспензии ($5 \cdot 10^9$ м.к./мл) каждого штамма и посевы инкубировали 24–48 ч при 26 или 37 °C.

Биоинформатический анализ геномов бактерий из базы данных NCBI проводили с помощью компьютерной программы BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также авторского скрипта. Анализ *ysu*-кластера иерсиний проводили при использовании полных нуклеотидных последовательностей 583 штаммов *Y. pestis* и 300 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI.

Конструирование олигонуклеотидных праймеров, структура которых приведена в табл. 1, проводили на основе нуклеотидной последовательности *ysu*-кластера штамма *Y. pestis* CO92 с помощью компьютерных программ Vector NTI11 (Invitrogen) и BLAST. Сконструированные праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия) и ЗАО «Евроген» (Москва, Россия), и использованы для ПЦР *in vitro* с ДНК различных штаммов иерсиний. Режимы постановки ПЦР с праймерами определены в соответствии с характеристиками олигонуклеотидов и длиной предполагаемого ампликона.

Выделение ДНК для проведения ПЦР осуществляли с помощью наборов реактивов «РИБО-преп» («АмплиСенс®», Москва, Россия) и «ДНК-сорб АМ» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва, Россия). ПЦР-

анализ исследуемых штаммов иерсиний с помощью сконструированных в работе праймеров проводили в стандартной комплектации реакционной смеси, используя температурный режим, который определен в соответствии со структурой синтезированных праймеров. Для получения копий оперонов биосинтеза Ych в качестве матриц использовали хромосомную ДНК, выделенную из *Y. pestis* KIM и *Y. pseudotuberculosis* YPIII, и ДНК-полимеразу Pfu (Promega Corporation, США). Постановку ПЦР с праймерами *ysuF/R* проводили по следующей программе: 98 °C – 4 мин (1 цикл); 98 °C – 20 с / 55 °C – 30 с / 72 °C – 4 мин (30 циклов); 72 °C – 10 мин.

Результаты и их обсуждение

Анализ генетических детерминантов сидерофора иерсиниахелина. Биоинформатический анализ генома *Y. pestis* CO92 (*upo1528-1538*) показал, что в нем содержатся два оперона, один из которых кодирует белки, отвечающие за синтез Ych, а другой оперон содержит гены, отвечающие за транспорт Ych (рис. 1). В опероне, содержащем гены транспортных белков, присутствует ген *upo1538*, который гомологичен генам, кодирующим сидерофор-синтетазы у других видов бактерий. Анализ нуклеотидной последовательности этого гена у штамма *Y. pestis* KIM [9] выявил в нем мутацию со сдвигом рамки считывания. Этот факт, а также отсутствие на индикаторной среде сидерофорной активности у разных штаммов чумного микроба, не продуцирующих Ybt, привели исследователей к заключению о неспособности *ysu*-кластера кодировать синтез сидерофора. Однако про-

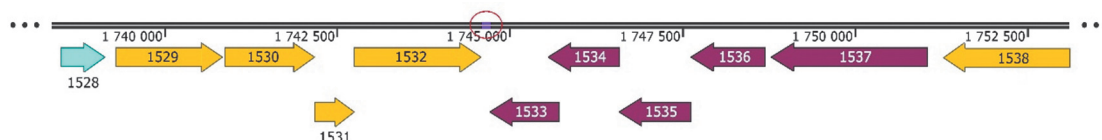


Рис. 1. Структура *ysu*-кластера генов, кодирующих синтез и транспорт Ych в штамме *Y. pestis* CO92:

желтым цветом обозначены гены биосинтеза Ych; красным – гены, кодирующие транспорт Ych; голубым – ген ферредоксиназы

Fig. 1. The structure of the *ysu* gene cluster encoding the synthesis and transport of Ych in the *Y. pestis* CO92 strain:

Ych biosynthesis genes are indicated in yellow; Ych transport genes – in red; and the ferredoxinase gene – in blue

веденный нами анализ показал, что *уро1538* является копией гена *уро1532*, который у разных штаммов может обеспечить биосинтез Ych, что подтверждается экспериментально в наших исследованиях [11, 13].

Поиск с помощью методов биоинформатики генов, кодирующих синтез и транспорт Ych, в геномах различных видов иерсиний, полногеномные последовательности которых доступны в базе данных NCBI, позволил установить, что они присутствуют у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, но отсутствуют у других видов иерсиний. Наличие генетических детерминантов Ych в геномах двух видов иерсиний подтверждалось и при использовании компьютерной программы SiderophoreAnalyzer [16], которая позволяет проводить быстрый анализ результатов полногеномного секвенирования энтеробактерий и выявлять в них гены биосинтеза различных сидерофоров. Программа способна выявлять гены биосинтеза (аналоги *upo1530*) и рецептора (аналоги *upo1537*) Ych, а также гены биосинтеза (*irp2*) и рецептора (*fmuA*) Ybt. В результате применения этой программы для анализа полногеномных последовательностей различных штаммов иерсиний из базы данных NCBI нам не удалось обнаружить ни одного штамма чумного или псевдотуберкулезного микроба, в которых бы отсутствовали гены, кодирующие Ych. Они выявлялись абсолютно во всех проанализированных штаммах независимо от присутствия генов, кодирующих Ybt. Полученные данные позволили заключить, что такие высокопатогенные бактерии, как *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, способны синтезировать и специфичный для этих видов сидерофор Ych. Гены *usu*-кластера в геномах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* имеют высококонсервативную структуру у обоих видов бактерий, что свидетельствует об эволюционной стабильности генов, обеспечивающих синтез и работу Ych, и важности этого сидерофора для двух видов высокопатогенных иерсиний.

Тем не менее между двумя видами иерсиний обнаружены и различия в структуре *usi*-кластера. Хотя структурные гены обоих оперонов высококонсервативны у обоих видов иерсиний, некодирующая межгенная область, разделяющая опероны биосинтеза и транспорта Ych и очевидно содержащая терминатор транскрипции обоих оперонов, различается по структуре между *Y. pestis* и разными штаммами *Y. pseudotuberculosis*. Поиск в этой области последовательностей нуклеотидов, выявленных у различных терминаторов транскрипции [17], не позволил обнаружить в ней ни шпилечных структур, характерных для

Rho-независимых терминаторов транскрипции, ни поли-С-кластеров, являющихся участком узнавания Rho-фактора. Анализ этой области показал, что она имеет идентичную структуру у всех исследованных штаммов *Y. pestis*, но у разных штаммов *Y. pseudotuberculosis* содержит небольшие делеции и инсерции нуклеотидов, которые представляют собой тандемные повторы нуклеотидов, различающиеся по количеству у разных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Эти данные свидетельствуют о наличии в терминаторной области *usu*-оперонов, различающихся по количеству тандемных повторов (VNTR – variable number tandem repeats). Сравнение структуры терминаторной области *usu*-локуса штамма *Y. pestis* CO92 с аналогичной структурой других секвенированных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* показало, что содержащиеся в ней VNTR отличаются по количеству у разных групп штаммов *Y. pseudotuberculosis* (рис. 2).

Для оценки возможности использования этих VNTR в качестве маркеров для генотипирования псевдотуберкулезного микроба мы провели анализ полногеномных последовательностей иерсиний из базы данных NCBI.

Генотипирование иерсиний с помощью VNTR-маркеров, расположенных в генах *ysu*-локуса. С целью выявления VNTR-маркеров у разных штаммов иерсиний сконструированы праймеры (*ysu-interF/R*), которые комплементарны константным областям, обрамляющим переменные участки межгенной области *ysu*-кластеров. Эти праймеры, структура которых приведена в табл. 1, позволяли различать штаммы по величине образующегося при проведении ПЦР ампликона. Для анализа геномов иерсиний с помощью ПЦР *in silico* применяли авторский скрипт, определяющий величину виртуального ампликона, полученного на ДНК иерсиний при использовании праймеров *ysu-interF/R*. Исследование геномов 583 штаммов *Y. pestis*, доступных в настоящее время в базе данных NCBI, показало, что все штаммы, выделенные в разные годы в разных регионах мира, несмотря на принадлежность к разным подвидам и биоварам, давали одинаковую длину ампликона (239 п.н.). Более того, полученные со штаммами чумного микроба ампликоны не отличались и по нуклеотидной последовательности, что подтверждает приведенные выше данные о стабильности структуры *ysu*-локуса, даже в области, содержащей VNTR. Эти результаты позволяют предположить, что стабильность межгенной области этого локуса у чумного микроба имеет какую-то функциональную нагрузку.

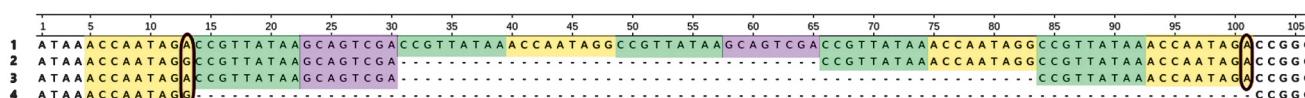


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагмента терминатора оперона биосинтеза Ych, которая различается по структуре у *Y. pestis* и различных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Одинаковым цветом выделены тандемные повторы, по набору которых исследуемые штаммы *Y. pseudotuberculosis* разделены на 4 группы. Все штаммы *Y. pestis* имеют структуру этой области, сходную со структурой группы 3

Fig. 2. The nucleotide sequence of the terminator fragment of the Ych biosynthesis operon, which differs in structure in *Y. pestis* and various *Y. pseudotuberculosis* strains. A set of tandem repeats are highlighted in the same color and used to divide the investigated *Y. pseudotuberculosis* strains into 4 groups. All *Y. pestis* strains have a structure of this region similar to that of group 3

В то же время анализ в ПЦР *in silico* с помощью сконструированных праймеров 300 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из базы данных NCBI показал, что они имели различную длину ампликона (292–257–239–204 п.н.), хотя большинство штаммов (221 из 300) давали фрагмент 257 п.н. Для того чтобы определить, связаны ли различия в величине ампликонов, полученных с разными штаммами *Y. pseudotuberculosis*, с их серопринадлежностью, проведен анализ серотипов 300 исследованных штаммов. Поскольку сведения о серотипах большинства этих штаммов в базе данных отсутствуют, серотип штаммов определен на основе их геномов в ПЦР *in silico* с помощью метода гено-серотипирования [18]. При таком анализе 300 геномов серотип удалось определить только у 146 штаммов, большинство из которых принадлежат к серотипам O:1a и O:1b, но в небольшом количестве в базе данных представлены и штаммы серотипов O:2 – O:5.

Сравнение ампликонов, полученных в ПЦР *in silico* с праймерами *ysu-interF/R*, у исследованных штаммов *Y. pseudotuberculosis* показало, что большинство штаммов (221 из 300) имели одинаковый размер (257 п.н.) ампликона. Отличающуюся длину межгенной области *ysu*-локуса имели три группы штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Первая группа давала фрагмент 292 п.н. и представлена 22 штаммами, у шести из которых с помощью гено-серотипирования

определена принадлежность к серотипу O:1a. Вторую группу (ампликон 239 п.н.) составляли семь штаммов серотипа O:2b. Интересно, что аналогичный ампликон давали все исследованные штаммы чумного микроба (583 штамма), принадлежащие к разным подвидам и биоварам. Третий вариант (204 п.н.) выявлен у 34 штаммов серотипа O:1b.

С целью оценки возможности использования праймеров *ysu-interF/R* для генотипирования штаммов двух видов иерсиний методом ПЦР *in vitro* проведено исследование имеющихся в нашем распоряжении штаммов: 38 *Y. pestis* и 88 *Y. pseudotuberculosis* (табл. 2).

При этом выяснилось, что все штаммы чумного микроба давали одинаковый ампликон в 239 п.н., а штаммы псевдотуберкулезного микроба, как и при анализе геномов в ПЦР *in silico*, можно разделить на 4 группы по длине ампликона: 292–257–239–204 п.н. (рис. 3).

ПЦР-фрагмент, соответствующий 292 п.н., наблюдали у шести штаммов серотипа O:1a, которые были выделены от людей в Западной Европе или на европейской территории России. Наименьший по величине фрагмент, соответствующий 204 п.н., давали штаммы *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b, выделенные от людей в Иркутской области и Приморском крае (штаммы «дальневосточной группы»). Такие штаммы по ряду генотипических и фенотипических признаков отличаются от остальных штаммов псевдотуберкулезного микроба, вызывают дальневосточную scarlatinoподобную лихорадку и из всех штаммов псевдотуберкулезного микроба характеризуются наибольшей эпидемической опасностью [19]. Интересно, что такой же фрагмент наблюдался и у 56 штаммов, выделенных во время семи вспышек псевдотуберкулеза в разных регионах нашей страны на протяжении 40 лет (с 1981 по 2021 г.), в том числе и при вспышках 2021 г. в Томске и Красноярске.

Таблица 2 / Table 2

Результаты анализа штаммов иерсиний методом ПЦР *in vitro* с праймерами *ysu-interF/R*, комплементарными фланкирующим последовательностям терминаторной области *ysu*-локуса

The results of analysis of *Yersinia* strains using PCR *in vitro* with *ysu-interF/R* primers complementary to the flanking sequences of the terminator region of the *ysu* locus

Распределение штаммов по группам Distribution of strains by groups	Количество штаммов Number of strains	Длина ампликона (п.н.) Amplicon length (bp)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		
Серотип O:1a (группа 1) Serotype O:1a (group 1)	6	292
Серотип O:1a (группа 2) Serotype O:1a (group 2)	3	257
Серотип O:1b (группа 1) Serotype O:1b (group 1)	3	257
Серотип O:1b (группа 2) Serotype O:1b (group 2)	5	257
Серотип O:1b (группа 3) Serotype O:1b (group 3)	65	204
Серотип O:2b Serotype O:2b	3	239
Серотип O:3 Serotype O:3	3	257
<i>Yersinia pestis</i>		
Основной подвиd Main subspecies	20	239
Неосновные подвиdы Non-main subspecies	18	239

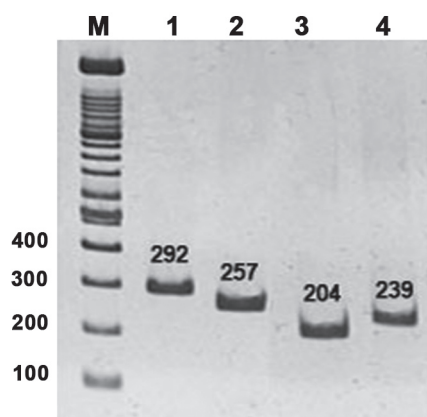


Рис. 3. Электрофореграмма в 5 % акриламидном геле ампликонов, полученных методом ПЦР *in vitro* при использовании ДНК разных штаммов *Y. pseudotuberculosis* в качестве матриц и праймеров *ysu-interF/R*. Маркеры ДНК 100 п.н. № 323-1 (BioLabs, США)

Fig. 3. Electrophoregram of amplicons obtained through PCR *in vitro* using DNA of different *Y. pseudotuberculosis* strains as matrices and *ysu-interF/R* primers in 5 % acrylamide gel. DNA markers of 100 bp № 323-1 (BioLabs, USA)

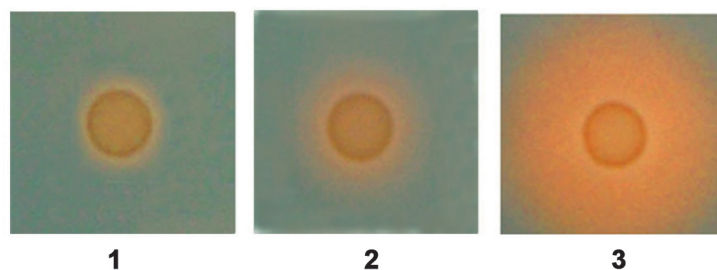


Рис. 4. Сидерофорная активность штаммов *E. coli* H1884, содержащих векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (1) и рекомбинантные плазмиды pSC-A-KIM (2) и pSC-A-YPIII (3)

Fig. 4. Siderophore activity of *E. coli* H1884 strains containing vector plasmid pSC-A-amp/kan (1) and recombinant plasmids, pSC-A-KIM (2) and pSC-A-YPIII (3)

Клонирование генов биосинтеза Ych из штаммов *Y. pestis* KIM и *Y. pseudotuberculosis* YPIII в клетках кишечной палочки. Различия в структуре области терминатора транскрипции предполагали, что они могут отражаться на эффективности экспрессии генов *usu*-кластера и уровне продукции Ych у штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов. Для оценки влияния различий в структуре межгенной области *usu*-кластера на экспрессию Ych сконструированы две рекомбинантные плазмиды, содержащие полученные с помощью ПЦР копии оперонов биосинтеза Ych двух штаммов, *Y. pestis* KIM и *Y. pseudotuberculosis* YPIII. Праймеры для получения ПЦР-копий генов биосинтеза Ych (*usuF* и *usuR*) разработаны с помощью программы Vector NTI 11 на основе последовательности нуклеотидов обоих штаммов из базы данных NCBI. ПЦР-копии оперонов биосинтеза Ych двух штаммов включали структурные гены (аналоги *upo1528-1532* в штамме *Y. pestis* CO92), а также промоторные и терминаторные последовательности оперонов. Копии оперонов штамма KIM и YPIII имели длину 6757 и 6775 п.н. соответственно и отличались только длиной терминаторной области (239 и 257 п.н.).

В качестве вектора для клонирования генов биосинтеза Ych использовали плазмиду pSC-A-amp/kan (Stratagene, США), которая содержит участки для клонирования фрагментов ДНК, полученных с помощью ПЦР. Подтверждение конструкции рекомбинантных плазмид проведено с помощью ПЦР с праймером *pM13rev*, который комплементарен векторной плазмиде, и праймерами, использованными для клонирования ПЦР-копий *usu*-локуса (табл. 1). Введение рекомбинантных плазмид pSC-A-KIM и pSC-A-YPIII в штамм *E. coli* H1884, лишенный собственных сидерофоров, продемонстрировало, что оперон штамма YPIII определяет значительно более высокую экспрессию Ych, чем оперон штамма KIM (рис. 4).

Результаты проведенного исследования показывают, что структура терминатора транскрипции оперона биосинтеза Ych оказывает значительное влияние на экспрессию этого сидерофора, которая более активна у бактерий, содержащих оперон *usu* из *Y. pseudotuberculosis*, по сравнению с опероном *Y. pestis*. В научной литературе мы не нашли сведений о влиянии структуры терминаторов транскрипции на экспрессию генов чумного микроба. Многочисленные исследования процессов регуляции экспрессии генов *Y. pestis* сосредоточены

главным образом на инициации транскрипции и пост-транскрипционном уровне с помощью малых РНК [20]. Осознание того, что терминация транскрипции является важнейшим этапом экспрессии генов, который способствует освобождению РНК-полимеразы и вновь синтезированного транскрипта от ДНК-матрицы, в последние годы побудило исследователей уделить пристальное внимание этому механизму реализации генетической информации. С помощью методов биоинформатики и анализа терминаторов транскрипции различных генов *E. coli* был разработан алгоритм [21] для различения слабых и сильных терминаторов. Анализ активности ряда Rho-зависимых терминаторов *in vitro* и *in vivo* показал, что на их эффективность оказывает значительное влияние наличие в клетке таких факторов, как белок NusG, определенные sRNA, а также сама синтезирующаяся mRNA [22, 23].

Выявленные в настоящем исследовании различия в экспрессии оперонов биосинтеза Ych, полученных из *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, в рекомбинантных штаммах кишечной палочки позволяют предположить, что штаммы псевдотуберкулезного микроба, у большинства которых отсутствуют гены биосинтеза Ybt [10], компенсируют этот недостаток более активной экспрессией Ych.

Полученные данные о вариабельности нуклеотидных последовательностей терминатора оперона биосинтеза Ych у разных штаммов псевдотуберкулезного микроба позволяют использовать эту область как мишень для разработки тест-систем для внутривидовой дифференциации *Y. pseudotuberculosis*.

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. Begg S.L. The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. *Biochem. Soc. Trans.* 2019; 47(1):77–87. DOI: 10.1042/BST20180275.
2. Khan A., Singh P., Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – siderophore: a review. *Microbiol. Res.* 2018; 212–213:103–11. DOI: 10.1016/j.micres.2017.10.012.
3. Prabhakar P.K. Bacterial siderophores and their potential applications: a review. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2020; 13(4):295–305. DOI: 10.2174/1874467213666200518094445.
4. Khasheii B., Mahmoodi P., Mohammadzadeh A. Siderophores: importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol. Res.* 2021; 250:126790. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126790.

5. Holden V.I., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*. 2015; 7(6):986–95. DOI: 10.1039/c4mt00333k.
6. McRose D.L., Seyedsayamdost M.R., Morel F.M.M. Multiple siderophores: bug or feature? *J. Biol. Inorg. Chem.* 2018; 23(7):983–93. DOI: 10.1007/s00775-018-1617-x.
7. Zhu J., Wang T., Chen L., Du H. Virulence factors in hyper-virulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 642484. DOI: 10.3389/fmicb.2021.642484.
8. Perry R.D., Fetherston J.D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2011; 13(10):808–17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008.
9. Forman S., Paulley J.T., Fetherston J.D. Cheng Y.-Q., Perry R.D. *Yersinia* ironomics: comparison of iron transporters among *Yersinia pestis* biotypes and its nearest neighbor, *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biometals*. 2010; 23(2):275–94. DOI: 10.1007/s10534-009-9286-4.
10. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Inf. Microbiol.* 2012; 2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151.
11. Кузнецова Д.А., Подладчикова О.Н. Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*. *Бактериология*. 2018; 3(1):36–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44.
12. Brickman T.J., Armstrong S.K. Temporal signaling and differential expression of *Bordetella* iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators. *Biometals*. 2009; 22(1):33–41. DOI: 10.1007/s10534-008-9189-9.
13. Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:75–81. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-75-81.
14. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
15. Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 1987; 160(1):47–56. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.
16. Кузнецова Д.А., Водопьянов А.С., Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Трухачев А.Л. SiderophoreAnalyzer – программа для выявления генов, отвечающих за синтез сидерофоров, в полногеномных нуклеотидных последовательностях энтеробактерий. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022680676 от 03.11.2022.
17. Ray-Soni A., Bellecourt M.J., Landick R. Mechanisms of bacterial transcription termination: all good things must end. *Annu. Rev. Biochem.* 2016; 85:319–47. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014844.
18. Bogdanovich T., Carniel E., Fukushima H., Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(11):5103–12. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003.
19. Somova L.M., Antonenko F.F., Timchenko N.F., Lyapun I.N. Far eastern scarlet-like fever is a special clinical and epidemic manifestation of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in Russia. *Pathogens*. 2020; 9(6):436. DOI: 10.3390/pathogens9060436.
20. Han Y., Fang H., Liu L., Zhou D. Genetic regulation of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 918:223–56. DOI: 10.1007/978-94-024-0890-4_8.
21. Nadiras C., Eveno E., Schwartz A., Figueroa-Bossi N., Boudvillain M. A multivariate prediction model for Rho-dependent termination of transcription. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(16):8245–60. DOI: 10.1093/nar/gky563.
22. Chen J., Morita T., Gottesman S. Regulation of transcription termination of small RNAs and by small RNAs: molecular mechanisms and biological functions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:201. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00201.
23. Chhakchhuak P.I.R., Sen R. *In vivo* regulation of bacterial Rho-dependent transcription termination by the nascent RNA. *J. Biol. Chem.* 2022; 298(6):102001. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102001.
5. Holden V.I., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*. 2015; 7(6):986–95. DOI: 10.1039/c4mt00333k.
6. McRose D.L., Seyedsayamdost M.R., Morel F.M.M. Multiple siderophores: bug or feature? *J. Biol. Inorg. Chem.* 2018; 23(7):983–93. DOI: 10.1007/s00775-018-1617-x.
7. Zhu J., Wang T., Chen L., Du H. Virulence factors in hyper-virulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 642484. DOI: 10.3389/fmicb.2021.642484.
8. Perry R.D., Fetherston J.D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2011; 13(10):808–17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008.
9. Forman S., Paulley J.T., Fetherston J.D. Cheng Y.-Q., Perry R.D. *Yersinia* ironomics: comparison of iron transporters among *Yersinia pestis* biotypes and its nearest neighbor, *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biometals*. 2010; 23(2):275–94. DOI: 10.1007/s10534-009-9286-4.
10. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Inf. Microbiol.* 2012; 2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151.
11. Kuznetsova D.A., Podladchikova O.N. [Cloning and expression of *Yersinia pestis* yersiniachelin siderophore biosynthesis genes in *Escherichia coli*]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(1):36–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44.
12. Brickman T.J., Armstrong S.K. Temporal signaling and differential expression of *Bordetella* iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators. *Biometals*. 2009; 22(1):33–41. DOI: 10.1007/s10534-008-9189-9.
13. Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N. [The role of the yersiniachelin siderophore in the physiology of *Yersinia pestis*]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (4):75–81. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-75-81.
14. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC “Shiko”; 2013. 560 p.
15. Schwyn B., Neilands J.B. [Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores]. *Anal. Biochem.* 1987; 160(1):47–56. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.
16. Kuznetsova D.A., Vodop'yanov A.S., Podladchikova O.N., Rykova V.A., Trukhachev A.L. [“SiderophoreAnalyzer” – a program for identifying genes responsible for the synthesis of siderophores in full-genome nucleotide sequences of enterobacteria]. Certificate of state registration of a computer program No. 2022664662 dated 03 Nov 2022.
17. Ray-Soni A., Bellecourt M.J., Landick R. Mechanisms of bacterial transcription termination: all good things must end. *Annu. Rev. Biochem.* 2016; 85:319–47. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014844.
18. Bogdanovich T., Carniel E., Fukushima H., Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(11):5103–12. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5103-5112.2003.
19. Somova L.M., Antonenko F.F., Timchenko N.F., Lyapun I.N. Far eastern scarlet-like fever is a special clinical and epidemic manifestation of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in Russia. *Pathogens*. 2020; 9(6):436. DOI: 10.3390/pathogens9060436.
20. Han Y., Fang H., Liu L., Zhou D. Genetic regulation of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 918:223–56. DOI: 10.1007/978-94-024-0890-4_8.
21. Nadiras C., Eveno E., Schwartz A., Figueroa-Bossi N., Boudvillain M. A multivariate prediction model for Rho-dependent termination of transcription. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(16):8245–60. DOI: 10.1093/nar/gky563.
22. Chen J., Morita T., Gottesman S. Regulation of transcription termination of small RNAs and by small RNAs: molecular mechanisms and biological functions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:201. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00201.
23. Chhakchhuak P.I.R., Sen R. *In vivo* regulation of bacterial Rho-dependent transcription termination by the nascent RNA. *J. Biol. Chem.* 2022; 298(6):102001. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102001.

References

1. Begg S.L. The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. *Biochem. Soc. Trans.* 2019; 47(1):77–87. DOI: 10.1042/BST20180275.
2. Khan A., Singh P., Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – siderophore: a review. *Microbiol. Res.* 2018; 212-213:103–11. DOI: 10.1016/j.micres.2017.10.012.
3. Prabhakar P.K. Bacterial siderophores and their potential applications: a review. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2020; 13(4):295–305. DOI: 10.2174/1874467213666200518094445.
4. Khasheii B., Mahmoodi P., Mohammadzadeh A. Siderophores: importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol. Res.* 2021; 250:126790. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126790.

Authors:

Kuznetsova D.A., Vodop'yanov A.S., Trukhachev A.L., Rykova V.A., Podladchikova O.N. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Кузнецова Д.А., Водопьянов А.С., Трухачев А.Л., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.