

Е.Г.Булгакова, Я.М.Краснов, А.В.Гаева, И.Ю.Сухонос, Л.В.Анисимова, Н.П.Гусева,
Л.А.Новичкова, В.В.Кутырев

ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРИЗНАКА ПИГМЕНТАЦИИ И СТРУКТУРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ГЕНОВ *hms*-ОПЕРОНА У ШТАММОВ *Y. PESTIS* И *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS* РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Проведено исследование признака пигментации у 214 штаммов чумного микроба и 68 псевдотуберкулезного микроба. Выявлено, что штаммы чумного микроба разных подвигов и псевдотуберкулезного микроба проявляют разную способность к сорбции гемина и кислых красителей. Проведен ПЦР-анализ и определение нуклеотидной последовательности генов *hms*-оперона у типовых штаммов пяти подвигов и таласской группы штаммов чумного микроба и штамма O1 серотипа псевдотуберкулезного микроба. Выявлены единичные нуклеотидные замены во всех генах оперона штаммов чумного микроба по сравнению с опероном штаммов псевдотуберкулезного микроба. Определены единичные нуклеотидные замены, перспективные для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба.

Ключевые слова: чумной микроб, псевдотуберкулезный микроб, межвидовые и внутривидовые различия, *Hms*-признак, *hms*-оперон.

E.G.Boolgakova, Ya.M.Krasnov, A.V.Gaeva, I.Yu.Sukhonosov, L.V.Anisimova, N.P.Guseva, L.A.Novichkova,
V.V.Kutyrev

Peculiarities of Pigmentation Expression and Structural Differences of *hms* Operon Genes in *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* Strains of Diverse Origin

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Pigmentation was examined in 214 plague microbe strains and 68 pseudotuberculosis agent strains. Plague microbe strains of different subspecies and pseudotuberculosis microbe strains demonstrated different ability of hemin and acidic dyes sorption. Genes of *hms* operon in typical *Y. pestis* strains of five subspecies and in *talassica* group strains, as well as in *Y. pseudotuberculosis* O1 serotype strains, were sequenced and analyzed using PCR. Single nucleotide substitutions were detected in all genes of the operon in plague microbe strains as compared with the operon of pseudotuberculosis agent strains. Determined were single nucleotide substitutions promising for intraspecific differentiation of plague microbe strains.

Key words: plague microbe, pseudotuberculosis microbe, interspecific and intraspecific differences, *Hms*-phenotype, *hms*-operon.

Свойство патогенных иерсиний сорбировать кислые красители и гемин (*Hms*-признак) является маркером одного из основных факторов вирулентности – хромосомной области пигментации. Этот признак кодируется генами *hms*-оперона (гены *hms* H, F, R, S) и регулируется двумя генами, расположенными на значительном расстоянии от оперона – *hms* P и *hms* T [3, 13, 14]. Наличие функционально активных *hms* генов необходимо для проявления способности образовывать биопленку и блок в преджелудке блохи [12], что обеспечивает эффективность трансмиссивного пути передачи чумного микроба. Признак пигментации и *hms* гены есть и у псевдотуберкулезного микроба, но этот микроорганизм не способен образовывать блок в преджелудке блохи [9]. На территории России, стран СНГ и Монголии в природных очагах выделяют штаммы, различающиеся по вирулентности для лабораторных животных и имеющие разную эпидемическую значимость.

По классификации, принятой в России (1985 г.), штаммы, циркулирующие в горных регионах, отно-

сят к неосновным подвидам (*hissarica*, *altaica*, *caucasica*, *ulegeica*), а штаммы из равнинных и предгорных очагов относят к основному подвиду *Y. pestis pestis* [1]. Кроме перечисленных подвигов чумного микроба, существует еще одна группа штаммов – *talassica* из Таласского высокогорного очага. Эти штаммы не представлены в классификационной схеме, но по ряду признаков их можно отнести к неосновным подвидам. Проявление признака пигментации, частота его утраты и реверсии различаются у штаммов чумного микроба разного происхождения и штаммов псевдотуберкулезного микроба. Однако причины различий не выяснены до сих пор.

Целью нашей работы было сравнение проявления признака пигментации и структурной организации *hms*-оперона у штаммов чумного микроба разного происхождения и псевдотуберкулезного микроба.

Материалы и методы

В работе были использованы 214 штаммов *Y. pes-*

tis основного, гиссарского, алтайского, кавказского, улэгейского подвидов и таласской группы из разных природных очагов стран СНГ и 68 штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий, где они хранились в лиофильно высушенном состоянии.

Культуры чумного и псевдотуберкулезного микробов выращивали в бульоне LB и на 1,5 % LB-агаре (LB-бульон, дополненный 1,5 г/л агара Difco Laboratories). При хранении культур в лабораторных условиях использовали 0,4 % LB-агар.

Наличие признака пигментации у штаммов чумного микроба определяли на разработанной нами цветной дифференциально-диагностической полусинтетической среде HmsD – hemin-storage phenotype differentiation – (0,75 % Casamino acids vitamin free (Difco Laboratories), 0,15 % сульфита натрия, 1,35 % агара (Difco Laboratories), 1 мкг бромида тиамин, 3 мг Конго красного, pH 7,2). Для изучения признака пигментации псевдотуберкулезного микроба, кроме известных сред, использовали модификацию среды HmsD (HmsD_{pstbc} – 0,35 % Casamino acids vitamin free (Difco Laboratories), 0,075 % сульфита натрия, 1,35 % агара (Difco Laboratories), 1 мкг бромида тиамин, 3 мг Конго красного, pH 7,2).

Препараты тотальной ДНК получали прогреванием бактериальной взвеси (концентрация – 10^7 – 10^8 м.к./мл) при 100 °C в дистиллированной воде в течение 30 мин с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин. Реакционная смесь (25 мкл) имела состав: 10 ммоль Tris-HCl (pH 8,0); 2,5 ммоль MgCl₂, по 0,2 ммоль каждого из нуклеотидов дАТФ, дСТР, дГТР, дТТР; по 0,6 мМ каждого праймера; 5 ед. Taq ДНК-полимеразы (НИИ Генетика) и 10 мкл ДНК испытуемого штамма.

Амплификацию фрагментов генов в ПЦР проводили на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва) по следующей программе: 94 °C 1 мин; (94 °C – 30 с, 62–63 °C – 30 с, 72 °C – 40 с) × 25 циклов; 72 °C – 10 мин. В качестве ДНК матрицы использовали препараты ДНК штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Синтез олигонуклеотидных праймеров осуществляли в НПФ «Литех» (Россия) на автоматическом синтезаторе ДНК «АСМ-102U». При выборе праймеров руководствовались правилами, описанными T.Lowe *et al.* [15] и компьютерной программой «Primer Express».

Продукты амплификации анализировали в 0,9 % агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромида этидия. Электрофорез проводили в буфере ТБЕ (0,089 М трис, 0,089 моль боратная кислота, 0,002 моль ЭДТА) при силе тока 90 мА в течение 90 мин. Для документирования результатов ПЦР использовали систему гель-документации Gel Doc™EQ (BIORAD, США) с применением программы Quantity One v 4.5.1 (BIORAD, США).

В качестве маркеров молекулярных масс использовали ДНК фага λ, обработанную эндонуклеазами рестрикции *AvaII*, *EcoRI*+*HindIII*.

Автоматическое секвенирование проводили по методу F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson. Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-образцов проводили на генетическом анализаторе модели «CEQ 8000» (Becman Coulter, USA). В работе использовали необходимый набор реагентов и расходных материалов согласно руководству к прибору, методикам подготовки проб и постановки ПЦР с «DTCS Quick Start Kit». Для проведения секвенирования и обработки полученных результатов использовалось программное обеспечение «CEQ 8000 Series Genetic Analysis System Software v. 9/0», «MEGA 4.0».

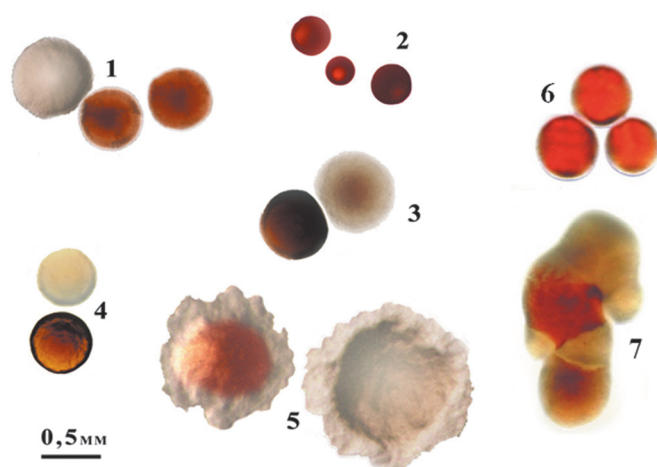
Результаты и обсуждение

Изучение признака пигментации штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов разного происхождения

На среде HmsD штаммы пяти подвидов и таласской группы формируют колонии, различающиеся по морфологии и интенсивности окраски. Наиболее плотные, с ровным краем и ярко окрашенные колонии образуются у штаммов кавказского подвида. Более рыхлые и розовые колонии характерны для штаммов алтайского, улэгейского, гиссарского подвидов и таласской группы. Штаммы основного подвида образуют зернистые колонии, более интенсивно окрашенные, чем колонии штаммов предыдущей группы, с волнистым бесцветным краем.

Оптимальная дифференциация пигментированных и непигментированных, а также смешанных колоний всех изученных штаммов *Y. pseudotuberculosis* наблюдается на среде HmsD_{pstbc} при температуре 15 °C. Гладкие пигментированные колонии штаммов псевдотуберкулезного микроба менее интенсивно окрашены, чем колонии штаммов чумного микроба. Среди выросших колоний преобладают колонии смешанного типа, имеющие как пигментированные, так и непигментированные сегменты (рис. 1).

Проверка признака пигментсорбции у штаммов, полученных из ГКПБ института «Микроб», показала, что 34 из 168 штаммов (≈ 20 %) основного подвида утратили способность к образованию пигментированных колоний. Самая высокая стабильность сохранения Hms признака характерна для штаммов основного подвида, выделенных в Таукумском пустынном (99 % Hms⁺ клонов у 2 штаммов; 1965–1966 гг. – годы выделения штаммов), Центрально-Кавказском высокогорном (6 штаммов – 60–90 % Hms⁺ клонов; 1998 г.), Терско-Сунженском низкогорном (5 штаммов – 60–96 % Hms⁺ клонов; 1970 г.), Кобыстанском равнинно-предгорном (6 штаммов – 98–99 % Hms⁺ клонов; 1953 г.), Мильско-Карабахском равнинно-предгорном (1 штамм – 98 % Hms⁺ клонов; 1967 г.), Джейранчельском равнинно-предгорном (2 штамма – 65–98 % Hms⁺ клонов; 1966–1967 гг.), Приараксинском низкогорном (4 штамма – 50–96 %; 1968 г.), Тувинском горном (50–90 % Hms⁺ клонов у 4 штаммов; 1971–1989 гг.). В ряде природных очагов



Дифференциация клеток чумного и псевдотуберкулезного микробов разных подвидов на среде HmsD:

1 – алтайский и улэгейский подвиды, 2 – кавказский подвид, 3 – таласская группа штаммов, 4 – гиссарский подвид, 5 – основной подвид, 6 – *Y. pseudotuberculosis* 338Д (O1 серотип), 7 – *Y. pseudotuberculosis* A17 (O1 серотип)

(Прикаспийский Северо-Западный степной; Волго-Уральский песчаный; Зауральский, Забайкальский степные; Сарыджазский и Верхненарынский высокогорные; Устюртский, Муюнкумский, Копетдагский, Приаральско-Каракумский, Каракумский пустынные; Прикаспийский и Волго-Уральский песчаные) встречались штаммы как полностью утратившие признак Hms, так и образующие разные процентные соотношения Hms⁺ и Hms⁻ клонов. Самая низкая стабильность Hms-признака наблюдалась у штаммов из Дагестанского равнинно-предгорного в 1999 г. (0 % Hms⁺ клонов у 3 штаммов), Копетдагского пустынного в 1966–1968 гг. (3 штамма – 0 % Hms⁺ клонов; 1 штамм – 20 % Hms⁺ клонов), Волго-Уральского песчаного в 1912–2001 гг. (9 штаммов – 0 % Hms⁺ клонов; 8 штаммов – 10–40 % Hms⁺ клонов), Зауральского степного в 1989 г. (3 штамма – 0 % Hms⁺ клонов, 1 штамм – 1 % Hms⁺ клонов, 1 штамм – 70 % Hms⁺ клонов). Можно было предположить, что стабильность сохранения признака пигментации связана только с длительностью хранения штаммов. Однако как для стабильно сохраняющих Hms-признак, так и для штаммов с высокой частотой его утраты, были выявлены одинаковые сроки выделения штаммов. При исследовании штаммов из Волго-Уральского природного очага среди штаммов, выделенных в 1912–1926 гг., не обнаружено ни одного пигментированного клона. В то же время штаммы, выделенные в 1928–2001 гг., при высеве образовывали только от 10 до 40 % Hms⁺ клонов. Причем повторный рассев Hms⁺ клонов приводил к появлению не более 40 % Hms⁺ клонов. Возможно, существуют неизвестные в настоящее время механизмы, приводящие к повышенной способности штаммов элиминировать эту детерминанту. Для штаммов алтайского, улэгейского, гиссарского и кавказского подвидов и таласской группы определено наличие признака пигментсорбции у 100 % клонов.

Штаммы псевдотуберкулезного микроба показали очень низкую стабильность по признаку пигментации. Только 38 % штаммов при высеве из ампул лиофилизированных культур на среду HmsD_{psb} образовывали 1–5 % пигментированных колоний. Признак пигментации практически у всех этих штаммов был выражен значительно хуже, чем у штаммов чумного микроба и проявлялся не одновременно с появлением на агаре колоний.

Различия в стабильности сохранения и интенсивности окраски пигментированных клонов у штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов могут быть связаны с разным уровнем продукции протеинов, кодируемых генами *hms*-оперона. Причиной этого могут быть особенности структурной организации этих генов. Поэтому нами были рассчитаны 12 пар праймеров (табл. 1), с помощью которых был проведен ПЦР-анализ штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов.

ПЦР анализ штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов с праймерами на гены *hms*-оперона

Праймеры были подобраны так, чтобы ампликон, образованный с каждой парой праймеров, перекрывал от 200 до 300 нуклеотидов ампликона, образованного с последующей парой праймеров. Такое перекрывание областей ДНК позволяет уловить возможные протяженные вставки (делеции) и, при необходимости, определить нуклеотидные последовательности выбранных регионов. Размеры ампликонов варьируют от 760 до 900 п.н., что удобно для анализа как методом ПЦР скрининга, так и методом секвенирования.

В ПЦР с ДНК всех штаммов чумного микроба основного подвида, неосновных подвидов, таласской группы и псевдотуберкулезного микроба образовывались ампликоны со всеми парами праймеров. Размер ампликонов для каждой пары праймеров был идентичным у всех исследованных штаммов. Это обстоятельство послужило основанием для поиска структурных особенностей генов *hms*-оперона патогенных иерсиний методом определения нуклеотидных последовательностей.

Определение и сравнение нуклеотидных последовательностей *hms*-оперонов штаммов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенных в разных географических регионах

Нуклеотидную последовательность *hms*-оперона (7651 п.н.) определили у штаммов чумного микроба основного подвида – *Y. pestis* 231 (708), *Y. pestis* KM803 (A-1822), кавказского подвида – *Y. pestis* 1146, алтайского подвида – *Y. pestis* KM683 (И-2359), улэгейского подвида – *Y. pestis* И-3069, гиссарского подвида – *Y. pestis* A-1249, штамма из Таласского высокогорного очага – *Y. pestis* A-1802 (21/10) и штамма псевдотуберкулезного микроба – *Y. pseudotuberculosis* 338Д O1 серотипа. При сравнении нуклеотидных последовательностей выявлен высокий консерватизм оперона у штаммов пяти подвидов и

Последовательности олигонуклеотидных праймеров на гены региона *hms*-оперона

Пара праймеров, №	Название	Нуклеотидная последовательность (5' – 3')	Размер ампликона, п.н.
1	HMS 1, HMS 2	CGAATAGCGCGTCTGCTTATG, CGCCTTATCCGGCAATGTAG	829
2	HMS 3, HMS 4	GTTGGGATGATGATCGTGTCC, GGTAACCGTGAGGGCAAAGTC	881
3	HMS 5, HMS 6	TCAGCGTATTGTCCAGGCAA, CTTGGCGTATCGTGGTAATCG	793
4	HMS 7, HMS 8	TGGTATGGCAATTGGCTTCAC, GCACAGGGCGGACATCTTT	833
5	HMS 9, HMS 10	GAAAGCGAAGCATGGTTTGC, CAGATATTCCTGCGGGCG	846
6	HMS 11, HMS 12	TTCTGGCTACGCCGAGAGA, AATGCCCAAGTGATCGACAAC	847
7	HMS 13, HMS 14	GCGAGTCTACGCCCAAGTGTT, CGTCGTCAAACCGCTGAGA	854
8	HMS 15, HMS 16	TTTCATCGTGTGCTCTGTCA, ACTTCTTGATCGCGCCCTG	868
9	HMS 17, HMS 18	TTACAACACTACTGCGCCCG, CAGCCTGTGCCTCTGGATCT	854
10	HMS 19, HMS 20	GAGTTAGCCGAGCGTGATCC, AGCGTTTGGCCTTCAATCC	781
11	HMS 21, HMS 22	CGTTATTGGTCCGTCATC, ATCTTTATTGCCGCTCAC	761
12	HMS 23, HMS 24	AGCAAGAATTGAAGGCCGTG, TCTCCAGTACCCTCCACA	896

таласской группы (табл. 2). Структура *hms*-оперона всех штаммов оказалась идентичной за исключением последовательности штамма кавказского подвида. У этого штамма обнаружены две нуклеотидные замены. В промоторной области *hmsH* гена штамма кавказского подвида выявлена единичная нуклеотидная замена –110-й н. А на G. Нуклеотидная замена в гене *hmsF* 779 Т/А уникальна и может служить генетической меткой штаммов *Y. pestis caucasica*. Секвенирование переменных областей этого гена у штаммов кавказского подвида из разных природных очагов (Терско-Сунженского и Приараксинского низкогорных, Ленинанканского, Зангезуро-Карабахского, Присеванского горных, Восточно-Кавказского высокогорного) выявило их идентичность. Нуклеотидная последовательность *hms*-оперона штамма *Y. pseudotuberculosis* 338Д отличалась от таковой у штаммов чумного микроба множеством нуклеотидных замен. При сравнении нуклеотидных последовательностей *hms*-оперона у штаммов чумного микроба всех подвидов, кроме кавказского, выявлено пять замен в гене *hmsH* (две из них – в промоторной области), три – в гене *hmsF*, две – в *hmsR* и одна – в гене *hmsS* по сравнению с нуклеотидной последовательностью штамма *Y. pseudotuberculosis* 338Д. У штамма кавказского подвида в промоторной области –110-й нуклеотид *hmsH* совпадает с нуклеотидом в этой позиции у штамма *Y. pseudotuberculosis* 338Д, а 779 А гена *hmsF* отличается от нуклеотида (Т) в этой позиции, характерного для штаммов остальных подвидов чумного микроба и штамма псевдотуберкулезного микроба.

Для сравнения полученных последовательностей с генетическим банком данных использовали алгоритм Blast (<http://blast.ncbi>). Нуклеотидные последовательности *hms*-оперона (табл. 2) у штаммов чумного микроба всех подвидов, кроме *Y. pestis subsp. caucasica*, идентичны последовательности штамма KIM биовара *medievalis* [6]. Штаммы CO92 биовара *orientalis* и Antiqua биовара *antiqua* [5, 16] отличаются от штамма KIM биовара *medievalis* заменой в гене *hmsR* 149 Т/Г. Штамм 91001 биовара *microtus*

[17] несет нуклеотидную замену в гене *hmsH* 1975 G/А и в гене *hmsR* 523 C/Т. Нуклеотидная последовательность оперона штамма *Pestoides F* идентична последовательности штаммов кавказского подвида [11]. Особенности нуклеотидной последовательности *hms*-оперона штамма *Angola* биовара *antiqua* [8] выявлены в двух генах: в промоторной области гена *hmsH* –131-й нуклеотид А, характерный для остальных штаммов чумного микроба, заменен на нуклеотид Т, –110-й G идентичен нуклеотиду в этой позиции у штамма кавказского подвида; в гене *hmsF* 1077-й G заменен на Т.

Проведенный анализ показывает, что внутривидовые различия *hms*-оперона чумного микроба невелики. При этом нуклеотидная варибельность в гене *hmsS* отсутствует, в гене *hmsR* варибельной оказалась одна нуклеотидная позиция, а в двух других генах варибельны две нуклеотидные позиции. Интересно, что штаммы *Y. pestis*, циркулирующие в природных очагах России и стран СНГ, независимо от подвиговой принадлежности (исключая штаммы кавказского подвида) и штамм биовара *medievalis* имеют одинаковую последовательность *hms*-оперона, у штаммов биоваров *orientalis* и *antiqua* обнаружена лишь единичная нуклеотидная замена. Несколько большая варибельность выявлена у зарубежных штаммов, близких по многим свойствам штаммам неосновных подвидов (91001, *Angola*, *Pestoides F*), и штаммов кавказского подвида.

Нуклеотидные последовательности штаммов *Y. pseudotuberculosis* O1 серотипа 338Д и IP 32953, представленной в GenBank [4], полностью совпали. Нуклеотидная последовательность *hms*-оперона высоковирулентного штамма *Y. pseudotuberculosis* IP 31758 [7] (более дальнего «родственника» *Y. pestis*), вызывающего Дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку, отличается от таковой у штаммов 338Д и IP 32953. Причем нуклеотиды в позициях 1511, 1777, 1974 гена *hmsH*; 438, 461 гена *hmsF*; 408, 453, 459 гена *hmsS* отличаются как от аналогичных нуклеотидов в оперонах всех изученных штаммов

Вариабельность генов *hms*-оперона патогенных иерсиний

Штамм	Источник нуклеотидной последовательности	<i>hmsH</i>											<i>hmsF</i>						<i>hmsR</i>				<i>hmsS</i>			
		Область промотора			603 н.	612 н.	636 н.	1511 н.	1774 н.	1975 н.	1977 н.	438 н.	461 н.	498 н.	779 н.	948 н.	1077 н.	1305 н.	91 н.	149 н.	393 н.	486 н.	88 н.	408 н.	453 н.	459 н.
		-15 н.	-13 н.	-110 н.																						
<i>Y. pestis</i> biovar <i>orientalis</i> CO92	NCBI GenBank	T	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	G	C	C	G	T	A	C
<i>Y. pestis</i> biovar <i>antiqua</i> Antiqua	NCBI GenBank	T	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	G	C	C	G	T	A	C
<i>Y. pestis</i> biovar <i>medievalis</i> KIM	NCBI GenBank	T	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C
<i>Y. pestis pestis</i> 231, A-1822	Данная работа	T ¹	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C
<i>Y. pestis hissarica</i> (A-1249), <i>altaica</i> (И-2359), <i>ulegeica</i> (И-3069), <i>talassica</i> (A-1802)	Данная работа	T	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C
<i>Y. pestis caucasica</i> 1146	Данная работа	T	A	G ²	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	A	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C
<i>Y. pestis</i> Pestoides F	NCBI GenBank	T	A	G	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	A	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C
<i>Y. pestis</i> biovar <i>microtus</i> str. 91001	NCBI GenBank	T	A	A	A	A	A	A	C	A	C	T	T	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	T	A	C
<i>Y. pestis</i> biovar <i>antiqua</i> Angola	NCBI GenBank	T	T	G	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	T	A	T	T	C	C	G	T	A	C
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 338Д	Данная работа	C ³	A	G	G	C	C	A	C	G	C	T	T	C	T	T	G	G	C	T	T	C	A	T	A	C
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP 32953	NCBI GenBank	C	A	G	G	C	C	A	C	G	C	T	T	C	T	T	G	G	C	T	T	C	A	T	A	C
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP 31758	NCBI GenBank	C	A	G	A	A	A	C ⁴	A	G	T	C	C	C	T	G	G	G	T	T	C	C	G	C	G	T

¹Обычным шрифтом обозначены нуклеотиды, характерные для всех штаммов чумного микроба.

²В заштрихованных ячейках обозначены нуклеотиды с внутривидовой вариабельностью у чумного микроба.

³Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, характерные для штаммов псевдотуберкулезного микроба O1 серотипа.

⁴Подчеркиванием выделены нуклеотиды, характерные для штамма псевдотуберкулезного микроба IP 31758.

Y. pestis, так и *Y. pseudotuberculosis* (табл. 2). В других позициях проявляется сходство этого штамма либо со штаммами чумного микроба, либо со штаммами псевдотуберкулезного микроба O1 серотипа.

Сравнение нуклеотидных последовательностей *hms*-оперона возбудителей чумы и псевдотуберкулеза O1 серотипа показало, что эволюционный процесс патогенных иерсиний сопровождался единичными нуклеотидными заменами во всех генах оперона у штаммов чумного микроба, но практически все замены образуют кодоны-синонимы. Две замены внутри рамки считывания гена *hmsH* чумного микроба (ACG₆₀₃/ACA₆₀₃ (*Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*) – Thr; ATC₆₃₆/ATA₆₃₆ – Ile); три – в гене *hmsF* (ACC₄₉₈/ACA₄₉₈ – Thr; GTT₉₄₈/GTG₉₄₈ – Val; TTG₁₃₀₅/TTA₁₃₀₅ – Leu); две – в гене *hmsR* (C₉₁TG/T₉₁TG – Leu; CGT₃₉₃/CGC₃₉₃ – Arg;) привели к образованию кодонов-синонимов. Замена GAC₆₁₂/GAA₆₁₂ в гене *hmsH* выразилась в замене одной отрицательно заряженной аминокислоты на другую Glu/Asp, а замена A₈₈TC/G₈₈TC в гене *hmsS* привела к смене гидрофобных аминокислот (Ile/Val). Таким образом, все эти нуклеотидные замены не должны были влиять на изменение стабильности и выраженности признака пигментации у штаммов чумного микроба по сравнению со штаммами псевдотуберкулезного микроба.

При анализе внутривидовой вариабельности штаммов чумного микроба обращает на себя внимание тот факт, что любая выявленная у определенного таксона(ов) замена отличает его (их) от всех остальных

сравниваемых иерсиний. Только нуклеотид –110-й G в гене *hmsH* сближает штаммы *Y. pestis* кавказского подвида и штамм Angola со штаммами псевдотуберкулезного микроба. В гене *hmsF* штаммов *Y. pestis* кавказского подвида и Pestoides F миссенс мутация CTA/CAA вызвала замену гидрофобной аминокислоты Leu на нейтральную полярную аминокислоту Gln. Подобного типа мутация произошла в гене *hmsH* штамма 91001 биовара *microtus* G₁₉₇₅CG/A₁₉₇₅CG (Ala/Thr); в гене *hmsR* – замена синонимическая ATT₄₈₆/ATC₄₈₆ (Ile). Замена 149-го нуклеотида в гене *hmsR* у штаммов биоваров *orientalis* и *antiqua* (GTC/GGC) привела к замене Val/Gly (обе гидрофобные). Как и в случае межвидовой вариабельности, выявленная внутривидовая вариабельность генов *hms*-оперона не объясняет различий в способности штаммов чумного микроба в разной степени сорбировать кислые красители.

По данным S.Forman *et al.* [10], полученным с помощью направленного мутагенеза, способность сорбировать кислые красители и образовывать биопленку у штаммов чумного микроба утрачивается при изменении в консервативных доменах Hms протеинов аминокислотных остатков на Ala: Asp 114, His 184 в протеине HmsF; Asp 176, Asp 269, Gln 305, Arg 308 в протеине HmsR; Trp 80, Tyr 83 в протеине HmsR. Снижение способности сорбировать кислые красители и образовывать биопленку происходит при замене аминокислотных остатков: Glu 281 в протеине HmsH; Trp 143 в протеине HmsF. Ни одна из

выявленных нами межвидовых или внутривидовых нуклеотидных замен не расположена в пределах кодонов указанных аминокислотных остатков. Это еще один аргумент в пользу того, что выявленные нами нуклеотидные замены не являются критическими для проявления способности патогенными иерсиниями сорбировать кислые красители и образовывать биопленку. Поэтому остается не выясненным вопрос о том, почему пигментсорбирующая способность у штаммов чумного микроба разных подвидов проявляется не в одинаковой степени и что является причиной слабой пигментсорбции у штаммов псевдотуберкулезного микроба и высокой частоты мутаций, приводящих к утрате Hms фенотипа и отсутствию способности блокировать преджелудок блох. Возможно, изучение структурной организации *hmsP* и *hmsT* поможет прояснить этот вопрос.

Обращает на себя внимание тот факт, что нуклеотидные последовательности двух штаммов O1 серотипа псевдотуберкулезного микроба имеют идентичные нуклеотидные последовательности *hms*-оперона; последовательности *hms*-оперона штаммов чумного микроба биовара *medievalis*, основного подвида, неосновных подвидов: алтайского, гиссарского, улэгейского и таласской группы штаммов полностью совпадают и отличаются от первых в основном синонимическими заменами. По-видимому, несмотря на то, что замены, выявленные у всех штаммов чумного микроба, привели к образованию кодонов-синонимов, они оказались необходимыми для освоения новых экологических ниш. В то же время, единичные нуклеотидные различия на подвидовом уровне с заменой аминокислот одного класса не оказались критическими для чумного микроба. Интересным оказался тот факт, что в промоторной области гена *hmsH* наиболее древних по происхождению штаммов *Y. pestis* кавказского подвида [2] и штамма Angola-110-й нуклеотид, в отличие от штаммов более молодых таксонов, совпадает с аналогичным нуклеотидом штаммов *Y. pseudotuberculosis*. В то же время нуклеотидная замена 149-го нуклеотида в гене *hmsR* характерна одновременно для штаммов самой молодой группы – биовара *orientalis* и древней группы – биовара *antiqua*. Однако она отсутствует у штаммов основного подвида и биовара *medievalis*, которые, по времени возникновения, находятся между первыми двумя группами, а также у всех неосновных подвидов, считающихся промежуточной формой чумного микроба. Вероятно, внутривидовые мутации определяют комплексом эколого-географических особенностей очагов циркуляции штаммов *Y. pestis*.

Выявленные нуклеотидные замены, различающие штаммы биоваров *orientalis*, *antiqua*, *medievalis*, *microtus* и штаммы кавказского подвида, предполагают возможность использования вариативных областей *hms*-оперона для создания системы типирования методом мультилокусного секвенирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та; 1989. 90 с.
2. Бобров А.Г., Филиппов А.А. Распространенность IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Мол. генет. 1997; 2:36–40.
3. Buchrieser C., Rusniok C., Frangeul L., Couve E., Billault A., Kunst F. et al. The 102-kilobase pgm locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. Infect. Immun. 1999; 67(9):4851–61.
4. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M. et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 101:13826–31.
5. Chain P.S.G., Hu P., Malfatti S.A., Radnedge J., Larimer F.W., Vergez L.M. et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal 516: Evidence of gene reduction in an emerging pathogen. J. Bacteriol. 2006; 188:4453–63.
6. Deng W., Burland V., Plunkett G., Boutin A., Mayhew G.F., Liss P. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. J. Bacteriol. 2002; 184:4601–11.
7. Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F., Rasko D.A., Kokorina G., Fayolle C. et al. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. PLoS Genet. 2007; 3:1508–23.
8. Eppinger M., Worsham P.L., Nikolich M.P., Riley D.R., Sebastian Y., Mou S. et al. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. J. Bacteriol. 2010; 192(6):1685–99.
9. Erikson D.L., Jarrett C.O., Wren B.W., Hinnebusch B.L. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. 2006; 188(3):1113–9.
10. Forman S., Bobrov A.G., Kirillina O., Craig S.K., Abney J., Fetherston J.D. et al. Identification of critical amino acid residues in the plague biofilm Hms proteins. Microbiology. 2006; 152:3399–410.
11. Garcia E., Worsham P., Bearder S., Malfatti S., Lang D., Larimer F. et al. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. Adv. Exp. Med. Biol. 2007; 603:17–22.
12. Hinnebusch B.J., Perry R.D., Schwan T.G. Role of *Yersinia pestis* gemin storage (*hms*) locus in transmission of plague by fleas. Science. 1996; 273(5273):367–70.
13. Jones H.A., Lillard J.W., Perry R.D. HmsT, a protein essential for expression of the haemin storage (*Hms+*) phenotype of *Yersinia pestis*. Microbiol. 1999; 145:2117–28.
14. Kirillina O., Fetherston J., Bobrov A., Abney J., Perry R.D. et al. HmsP, a putative phosphodiesterase and HmsT, a putative diguanilate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 2004; 54(1):75–88.
15. Lowe T., Sharefkin J., Yang Sh., Dieffenbach C.W. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 1990; 18(7):1157–61.
16. Parkhill J., Wren B.W., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebaihia M. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature. 2001; 413(6855):523–7.
17. Song Y., Tong Z., Wang J., Wang L., Guo Z., Han Y. et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001 an isolate avirulent of humans. DNA Res. 2003; 11:179–97.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Aparin G.P., Golubinskii E.P. [Microbiology of Plague]. Irkutsk: Izdanie stvo Irkutskogo Universiteta; 1989. 90 p.
2. Bobrov A.G., Filippov A.A. [Distribution of IS285 and IS100 in the Genomes of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*]. 1997; 2:36–40.

Authors:

Boolgakova E.G., Krasnov Ya.M., Gaeva A.V., Sukhonosov I.Yu., Anisimova L.V., Guseva N.P., Novichkova L.A., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Булгакова Е.Г., Краснов Я.М., Гаева А.В., Сухоносов И.Ю., Анисимова Л.В., Гусева Н.П., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.04.11.