

С.В.Дентовская, М.Е.Платонов, Т.И.Комбарова, Г.М.Титарева, И.В.Бахтеева, Р.З.Шайхутдинова, С.А.Иванов, А.П.Анисимов

УКОРОЧЕНИЕ КОРА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА СНИЖАЕТ ВИРУЛЕНТНОСТЬ *YERSINIA PESTIS*

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск

Ранее с помощью сайт-направленного мутагенеза генов, отвечающих за биосинтез корового олигосахарида липополисахарида, получен изогенный набор штаммов *Y. pestis*, включающий штамм дикого типа 231 и его производные с делециями структурных генов *wabD*, *waalL*, *waaQ*, *waaE* и *hldE*. В этой работе показано, что постепенное укорочение корового олигосахарида сопровождается снижением вирулентности при подкожном способе заражения мышей и морских свинок.

Ключевые слова: чумной микроб, ЛПС, кор, вирулентность.

Липополисахарид (ЛПС) – основной фактор патогенности грамотрицательных бактерий. В ходе своей дивергенции с возбудителем псевдотуберкулеза чумной микроб утратил способность синтезировать S-форму ЛПС [7], что необходимо для проявления способности протеазы Pla активировать плазминоген. O-боковые полисахаридные цепи, характерные для S-формы ЛПС, синтезируемой *Yersinia pseudotuberculosis*, ингибируют активаторную способность Pla [6], что коррелирует со значительно выросшей, по сравнению с *Y. pseudotuberculosis*, вирулентностью *Y. pestis* при подкожном способе заражения животных [4]. В серии предварительных экспериментов мы определили гены, ответственные за синтез корового олигосахарида *Y. pestis*, сконструировали наборы изогенных мутантов, отличающихся по степени редуцированности кора, и установили, что постепенное укорочение олигосахарида сопровождалось повышением чувствительности бактерий возбудителя чумы к действию факторов врожденного иммунитета

(комplementу сыворотки и катионным пептидам) [5] и утратой активатором плазминогена фибринолитической и плазмокоагуляционной активностей [2]. Целью настоящего исследования была оценка влияния степени укорочения корового олигосахарида на вирулентность *Y. pestis* при подкожном заражении мышей и морских свинок.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Используемые в работе штаммы *Y. pestis* представлены в таблице. Бактерии выращивали на питательной среде на основе сердечно-мозговой вытяжки (ВНИ), pH 7,2. ВНИ агар с 5 % сахарозы использовали для селекции двойных рекомбинантов *Y. pestis*, полученных с помощью гибридных плазмид на основе суицидного вектора pCVD442 [3]. В случае необходимости в питательные среды добавляли антибиотики: ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин –

Вирулентность экспериментальных штаммов возбудителя чумы при подкожном заражении лабораторных животных

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Форма олигосахарида кора *	Мыши		Морские свинки	
		LD ₅₀ КОЕ **	средние сроки жизни, сут	LD ₅₀ КОЕ	средние сроки жизни, сут
231	Gal/DD-Нер-Нер Glc Ko GlcNAc---Нер-Нер-Kdo-LA	2 (1-4)	4,7±1,2	7 (2-27)	8,5±0,8
231Δ <i>wabD</i>	DD-Нер-Нер Glc Ko GlcNAc---Нер-Нер-Kdo-LA	8 (1-32)	4,2±0,7	н/д ***	н/д ***
231Δ <i>waalL</i>	Gal/DD-Нер-Нер Glc Ko Нер-Нер-Kdo-LA	13 (2-50)	4,5±0,8	32 (8-126)	9,0±1,5
231Δ <i>waaQ</i>	Glc Ko GlcNAc---Нер-Нер-Kdo-LA	5 (1-16)	4,3±0,9	15 (4-58)	10,0±1,1
231Δ <i>waaE</i>	Ko GlcNAc---Нер-Нер-Kdo-LA	32 (8-126)	7,9±0,8	> 10 ⁴	> 21
231Δ <i>hldE</i>	Ko Kdo-LA	2,0·10 ⁵ (5,0·10 ⁴ -7,9·10 ⁵)	11,5±0,5	> 10 ⁴	> 21

* Базовые структуры кора ЛПС и функции ферментов биосинтеза ЛПС *Y. pestis* дикого типа и мутантов, выращенных при 25 °С. Gal – β-D-галактоза; DD-Нер – D-глицеро-α-D-манно-гептоза; GlcNAc – β-D-глюкозамин; Glc – β-D-глюкоза; Нер – L-глицеро-α-D-манно-гептоза; Kdo – 3-деокси-α-D-манно-окт-2-улозоновая кислота; Ko – D-глицеро-α-D-тало-окт-2-улозоновая кислота; LA – липид А. GlcNAc присутствует в нестехиометрическом количестве; остаток Ko частично заменен на остаток Kdo; глицин на остатке LD-НерI не показан.

** 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках.

*** Нет данных.

40 мкг/мл, полимиксин В – 100 мкг/мл.

Мутагенез. Нокаутные мутанты получали с помощью конъюгативной передачи в клетки *Y. pestis* плазмид на основе суицидного вектора pCVD442 [3]. Верификацию замены генов проводили с помощью полимеразой цепной реакции.

Оценку вирулентности проводили на мышах (18±2) г и морских свинок (260±20) г при подкожном введении десятикратных разведений (10⁷ КОЕ–1 КОЕ и 10⁴ КОЕ–10¹ КОЕ соответственно) 28-градусных культур *Y. pestis* в изотоническом растворе NaCl в объеме 0,1 мл на животное. Одной дозой заражали 5 мышей и 3 морские свинки. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Животных, погибших в ходе эксперимента или умерщвленных после его завершения, вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Вычисление величин LD₅₀ проводили по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

Результаты и обсуждение

Укорочение кора сопровождалось снижением вирулентности мутантов для лабораторных животных (таблица). Величина LD₅₀ и средние сроки жизни мышей и морских свинок при заражении штаммами с мутациями по генам *wabD*, *waaL*, *waaQ* (ответствующими за синтез галактозилтрансферазы, О-лигазы и гептозилтрансферазы III соответственно) были сопоставимы с результатами, полученными для исходного штамма 231. При этом для штамма Δ*waaQ* отсутствовала строгая корреляция между вирулентностью и устойчивостью к факторам врожденного иммунитета. Чувствительный к полимиксину В и сыворотке крови *waaQ* мутант [5] сохранял вирулентность на уровне исходного штамма 231. При заражении мышей дальнейшее укорочение кора сопровождалось достоверным увеличением LD₅₀ и средней продолжительности жизни для мутанта *waaE* (нарушен синтез глюкозилтрансферазы). Мутант *hldE* (отсутствие продукции бифункциональной гептоза-7-фосфатакиназы / гептоза-1-фосфат-аденилтрансферазы), сохранивший из структур кора только остатки Кдо, был наименее вирулентен. При заражении морских свинок оба мутанта (*waaE* и *hldE*) не вызывали гибели животных в течение 21 сут.

Бактериологическое исследование селезенки всех животных, павших в ходе эксперимента, показало массивное обсеменение *Y. pestis*. Из органов животных, выживших после заражения исходным штаммом 231 и его мутантами по генам *wabD*, *waaL*, *waaQ* (мышь и морские свинки) и *waaE* (мышь) на 22-е сутки после заражения выделить культуры чумного микроба не удалось. В то же время из селезенки обоих видов животных, зараженных штаммом 231Δ*hldE*, и селезенки морских свинок, инфицированных культурой 231Δ*waaE*, на 22-е сутки после заражения удавалось стабильно высевать единичные

колонии возбудителя чумы.

Таким образом, укорочение кора «дикого типа» (9 моносахаридных остатков) до 5 моносахаридных остатков приводит к снижению вирулентности (при наблюдении за подкожно зараженными животными в течение 21 сут) для морских свинок не менее чем на 3 порядка, а до 3 моносахаридных остатков – к утрате вирулентности для обоих видов животных. Нельзя исключить, что при увеличении периода наблюдения за животными, из селезенки которых высеивали *Y. pestis*, в поздние сроки эксперимента могла бы произойти генерализация инфекции, ведущая к их гибели.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-49280-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. С. 85–104.
2. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазмидогена возбудителя чумы. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):49–51.
3. Donnenberg M.S., Kaper J.B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect. Immun. 1991; 59(12):4310–7.
4. Guinet F., Avè P., Jones L., Huerre M., Carniel E. Defective innate cell response and lymph node infiltration specify *Yersinia pestis* infection. PLoS ONE. 2008; 3(2):e1688
5. Knirel Y.A., Dentovskaya S.V., Bystrova O.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z. et al. Relationship of the lipopolysaccharide structure of *Yersinia pestis* to resistance to antimicrobial factors. Adv. Exp. Med. Biol. 2007; 603:88–96.
6. Kukkonen M., Suomalainen M., Kyllönen P., Lähteenmäki K., Lång H., Virkola R. et al. Lack of O-antigen is essential for plasmidogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. Mol. Microbiol. 2004; 51(1):215–25.
7. Skurnik M., Peippo A., Ervelä E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. Mol. Microbiol. 2000; 37(2):316–30.

Об авторах:

Дентовская С.В., Платонов М.Е., Комбарова Т.И., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболensk. E-mail: dentovskaya@obolensk.org

S.V.Dentovskaya, M.E.Platonov, T.I.Kombarova, G.M.Titareva, I.V.Bakhteeva, R.Z.Shaikhutdinova, S.A.Ivanov, A.P.Anisimov

Truncation of Lipopolysaccharide Core Decreases *Yersinia pestis* Virulence

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

The isogenic set of *Yersinia pestis* strains including wild-type strain 231 and its mutants with deletions of the structural genes, *wabD*, *waaL*, *waaQ*, *waaE*, and *hldE*, responsible for core oligosaccharide synthesis was generated using site directed mutagenesis. It was shown that gradual decrease of the core-oligosaccharide length was accompanied by reduction of mutants' virulence in subcutaneously infected mice and guinea pigs.

Key words: plague agent, LPS, core, virulence.

Authors:

Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Kombarova T.I., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: dentovskaya@obolensk.org

Поступила 16.09.08.