

Е.Г.Оглодин, Г.А.Ерошенко, Л.М.Куклева, Г.Н.Одинок, Н.П.Гусева, С.А.Бугоркова, В.В.Кутырев

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КРИПТИЧЕСКИХ ПЛАЗМИД ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ДВУХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИИ

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

Определены полные нуклеотидные последовательности двух криптических плазмид – рСКФ из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы и рТР33 из Тувинского горного очага чумы в России. Установлено, что размер плазмиды рСКФ составляет 5,4 т.п.н., а ее состав Г+Ц пар равен 38,4 %. В плазмиде содержится 8 открытых рамок считывания, кодирующих функции транспорта и секреции, в частности, системы секреции IV типа. Размер другой криптической плазмиды рТР33 равен 33,8 т.п.н., а состав Г+Ц пар равен 50,3 %. В рТР33 содержится 52 открытые рамки считывания, большинство из которых идентифицировано как фаговые белки, из чего следует, что рТР33 является кольцевым геномом фага. В рТР33 присутствуют также два гена двухкомпонентной системы белков токсин-антитоксин YoeB/YefM, действующей на репликативный аппарат бактерий.

Ключевые слова: возбудитель чумы, геном, криптические плазмиды, структурно-функциональный анализ.

E.G.Oglodin, G.A.Eroshenko, L.M.Kukleva, G.N.Odinokov, N.P.Guseva, S.A.Bugorkova, V.V.Kutyrev

Structural-Functional Analysis of Cryptic Plasmids in *Yersinia pestis* Strains from Two Natural Plague Foci of Russia

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Identified are the complete nucleotide sequences of two cryptic plasmids – pCKF from the Central-Caucasian high-mountain plague focus and pTP33 – from Tuva mountain plague focus in Russia. It is established that the size of the pCKF is 5.4 kbp, and its G-C pair composition accounts for 38.4 %. The plasmid contains 8 open reading frames, encoding transport and secretion functions, in particular, secretion systems of the VI type. The size of another cryptic plasmid, pTP33, is 33.8 kbp, and G-C pair composition accounts for 50.3 %. It contains 52 open reading frames, the majority of which have been classified as phage proteins. Hence, it is inferred that pTP33 is a ring genome of phage. It also has two genes of two-component protein system, toxin-antitoxin, YoeB/YefM, that affects replication apparatus of bacteria.

Key words: plague agent, genome, cryptic plasmids, and structural-functional analysis.

Геном возбудителя чумы включает три плазмиды рCad, рFra и рPst, которые кодируют ряд важных факторов патогенности, таких как система секреции III типа, белковая капсула F1, мышинный токсин Ymt, активатор плазминогена Pla, пестицин Pst и другие факторы, необходимые для выживания в организме теплокровного животного или в переносчике – блохе. У штаммов *Y. pestis* из некоторых природных очагов чумы встречаются дополнительные криптические плазмиды, функции которых до конца не определены [6, 8]. Так, у *Y. pestis* 91001 microtus из Китая выявлена плаزمида рCRY размером около 22 т.п.н., которая среди прочих генов содержит кластер *vir* системы секреции IV типа (СС4Т). СС4Т является фактором вирулентности и используется патогенными бактериями для передачи эффекторных белков в клетки макроорганизма, а также для секреции широкого спектра веществ [5, 8]. Другая плазмиды рУС размером 6 т.п.н. также выявлена у штаммов *Y. pestis* из Китая [6]. Плазмиды рУС содержит 12 открытых рамок считывания, часть из которых принимает участие в процессах инициации репликации и поддержания стабильности ДНК. Криптические плазмиды присутствуют и у штаммов, циркулирующих в некоторых природных очагах России. Наличие криптической плазмиды массой около 3 МДа вы-

явлено у штаммов *Y. pestis* из некоторых участков Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы. Штаммы, содержащие эту плазмиду, отличаются по ряду свойств от других штаммов чумного микроба, распространенных в этом очаге чумы. Они имеют сниженную вирулентность и потребность в факторе роста – аминокислоте пролине [3]. Структура этой плазмиды и кодируемые ею гены не исследованы. Не ясна ее роль в вирулентности или жизнедеятельности этих пролинзависимых штаммов *Y. pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы.

Неизвестны функции и другой криптической плазмиды – рТР33 размером около 34 т.п.н., присутствующей в штаммах из Тувинского горного очага чумы [1]. Возможно, плазмиды рТР33 играет роль в патогенности этих штаммов.

Целью данной работы являлось проведение структурно-функционального анализа двух криптических плазмид штаммов *Y. pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы.

Материалы и методы

Использованные в работе штаммы *Y. pestis* получены из Государственной коллекции патогенных

бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». Штаммы культивировали при 37 °С в бульоне или на агаре LB (рН 7,2) в течение 18–24 ч.

Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* проводили с помощью набора AxyPrep Bacterial Genomic Miniprep Kit (производство AXYGEN Biosciences, Китай). Для секвенирования геномов штаммов использовали систему Ion PGM (Life technologies, США) и автоматический генетический анализатор ABI 3500xl Genetic Analyzer (Life technologies, США). Для обработки исходных данных секвенирования применяли пакет программ Ion Torrent Suite software (версия 3.4.2.) и Newbler gsAssembler (версия 2.6). Для финализации сборки секвенированных плазмид применяли программное обеспечение UGENE (версия 1.12.2). При обработке исходных данных по секвенированию нуклеотидных последовательностей учитывались контиги, содержащие не менее 100 единичных прочтений, кратность покрытия каждого нуклеотида составила более 1000 раз.

Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью сервера аннотирования микробных геномов с использованием технологии подсистем (RAST) [4], а аминокислотных последовательностей – алгоритма Psi-BLAST и баз данных NCBI GenBank, PATRIC, Uniprot, RAST, Pfam, FIGfams и EMBL. Карта плазмиды получена с помощью CGView Server [7].

Результаты и обсуждение

Выделение ДНК криптической 3 МДа плазмиды проводили из штамма *Y. pestis* C-627, изолированного в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы в 1986 г. Поскольку эта плазида не имела названия, мы обозначили ее рСКФ по названию очага, в котором циркулируют содержащие ее штаммы. На основе данных проведенного полногеномного и фрагментного секвенирования установлено, что последовательность плазмиды рСКФ секвенирована нами в геноме штамма C-627 с более чем с 100-кратным прочтением. Секвенированные на капиллярном генетическом анализаторе ABI 3500×1 Genetic Analyzer концевые участки контигов плазмиды объединили с помощью программы UGENE с полученными при полногеномном секвенировании нуклеотидными последовательностями фрагментов рСКФ в кольцевой репликацион. Размер плазмиды составил 5,4 т.п.н. Ее карта приведена на рис. 1.

Состав Г+Ц пар плазмиды равен 38,4 %, что отличается от состава хромосомы возбудителя чумы равного 47,6 %, а также от других представителей семейства *Enterobacteriaceae*. На основании анализа полной нуклеотидной последовательности рСКФ с помощью сервера поиска открытых рамок считывания RAST и алгоритма NCBI GenBank glimmer3 установлено, что в плазмиде содержится 8 открытых рамок считывания. Три кодирующие последовательности плазмиды (CDS) считались полностью

идентифицированными на основании их совпадения более чем на 70 % с другими нуклеотидными последовательностями из баз генетических данных. CDS1 плазмиды рСКФ имеет более 89 % гомологии с геном ORF1 белка репликации криптической плазмиды рУС из штаммов *Y. pestis* из Китая [6]. CDS3 показала более 70 % гомологии с *virB6* геном *Proteus mirabilis*, который кодирует VirB6 белок внутренней мембраны СС4Т. Аминокислотная последовательность продукта CDS3 гомологична на 45 % белку СС4Т *Y. enterocolitica* TriE, который кодируется плазмидой р29930. Последовательность CDS7 имеет более 70 % гомологии с *virB5* *Campylobacter upsaliensis*, который кодирует минорный пилин VirB5, принимающий участие в построении периплазматического канала СС4Т. Аминокислотная последовательность белка CDS7 имеет 55 % сходства с еще одним белком СС4Т *Y. enterocolitica* – TriD, также кодируемым плазмидой р29930.

Функции CDS6 и CDS8 определены по сходству аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков с аминокислотными последовательностями из баз данных PATRIC, Pfam, NCBI GenBank, EMBL и Uniprot. Кодируемый CDS6 белок на 30 % гомологичен белку СС4Т *Y. enterocolitica* – TriL, ген

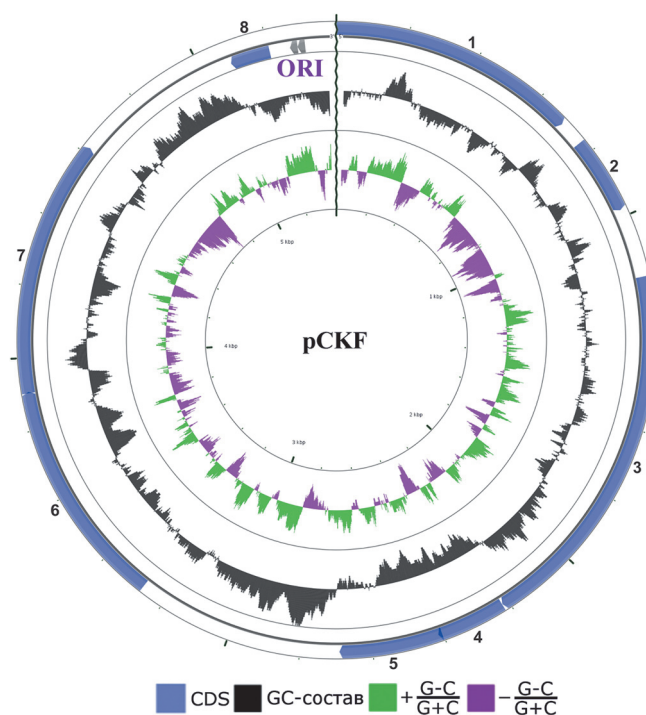


Рис. 1. Карта плазмиды рСКФ штамма *Y. pestis* C-627 из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы:

Синими стрелками отмечены открытые рамки считывания (CDS – coding sequences), определенные с помощью сервера RAST и алгоритма NCBI GenBank glimmer3. Цифрами обозначены номера CDS. Предполагаемая точка начала репликации плазмиды отмечена серой стрелкой. Черным круговым графиком обозначен GC-состав, отображающий отклонение от среднего значения GC-состава всей последовательности на положительную или отрицательную величину. Зеленым и фиолетовым цветом на графике обозначена положительная и отрицательная величина отношения разницы G-C пар к сумме G+C пар по сравнению со средним значением этой дроби для всей нуклеотидной последовательности

которого расположен на плазмиде p29930. Продукт CDS8 показал 43 % гомологии с ABC транспортным белком пермеазы *Bacillus anthracis*, который принимает участие в транспорте веществ из клетки. Белки, кодируемые CDS2, CDS4 и CDS5, имеют гомологию около 40 % с гипотетическими белками *Escherichia coli*, *Streptococcus parasanguinis* и *Clostridium sp.* соответственно. В последовательности плазмиды pСКФ присутствует также уникальный участок с богатым содержанием (65,9 %) А+Т пар, который расположен перед геном *rep* (CDS1) белка репликации и, по-видимому, является точкой начала репликации pСКФ (рис. 1).

Полученные данные свидетельствуют о связи плазмиды pСКФ с процессами транспорта и секреции, в частности, с системой секреции IV типа. Схожие функции описаны для плазмиды pCRY штамма *Y. pestis* 91001 microtus [8]. Плазмида pСКФ депонирована в базе данных NCBI GenBank с номером доступа KM112087.

Нами также проведен структурно-функциональный анализ криптоической плазмиды pTP33 штаммов *Y. pestis* из Тувинского горного очага чумы [1]. Выделение ДНК плазмиды pTP33 проводили из штамма *Y. pestis* KM932, изолированного в Тувинском горном очаге чумы в 1987 г. Определение полной нуклеотидной последовательности плазмиды и ее структурно-функциональный анализ выполняли также, как и для плазмиды pСКФ. Состав Г+Ц пар плазмиды pTP33 равен 50,3 %, что близко этому составу других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, и, возможно, эта плазмида приобретена от бактерий этого семейства. Размер pTP33 составляет 33,8 т.п.н. В плазмиде pTP33 содержится 52 открытые рамки считывания (рис. 2). Большинство генов pTP33 идентифицировано как фаговые белки. В частности, по данным RAST, CDS19, CDS27, CDS28, CDS30, CDS31, CDS33, CDS36, CDS37, CDS38, CDS41, CDS45, CDS46, CDS47, CDS48, CDS51, CDS52 кодируют фаговые или фаг-связанные белки. Гены CDS2, CDS25 и CDS26 участвуют в образовании структур хвоста фага. Продукт гена CDS21 является белком рекомбинации RecT фага, а CDS24 – белком ExoZ продукции экзополисахарида, CDS51 кодирует большую субъединицу фаговой терминазы. Продукты генов CDS1, CDS3, CDS4, CDS6, CDS11, CDS12, CDS16 и CDS20 принимают участие в процессе репликации ДНК, а также в лизисе бактериальной стенки. В том числе CDS1 кодирует интегразу, нарушающую присоединение ферментов к ДНК.

Продукт CDS3 является лизоцимом на 100 % идентичным по аминокислотной последовательности лизоциму *Y. pestis*, а CDS4 показал 100 % идентичности с холином *Y. pestis*. Продукт CDS6 является белком репликации ParA со 100 % идентичностью белку ParA *Y. pestis*. Продукты генов CDS10, CDS11 и CDS20 имеют 100 % покрытие и 99 % идентичности с белком *Y. pestis*, который является экзорибонуклеазой VIII (по классификации ферментов – EC 3.1.11.).

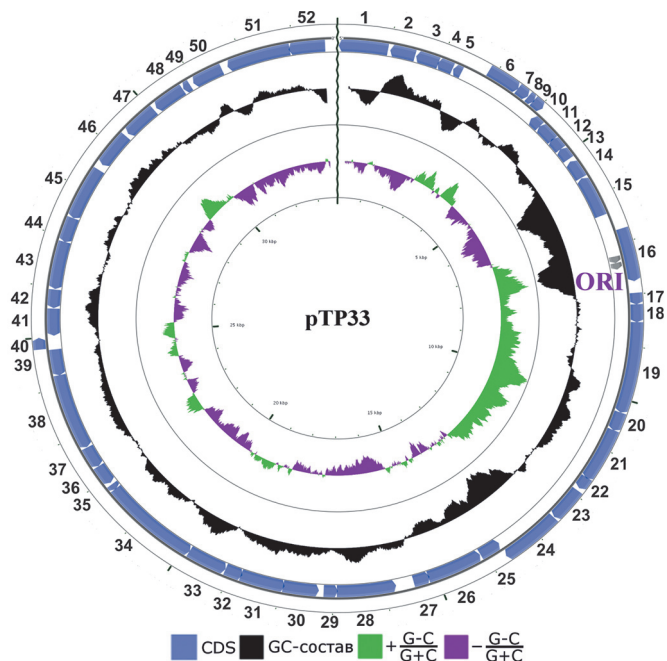


Рис. 2. Карта плазмиды pTP33 из штамма *Y. pestis* KM 932 из Тувинского горного очага чумы:

Синими стрелками отмечены открытые рамки считывания, определенные с помощью сервера RAST и алгоритма NCBI GenBank glimmer3. Цифрами обозначены номера CDS. Предполагаемая точка начала репликации плазмиды отмечена серой стрелкой. Черным круговым графиком обозначен GC-состав, отображающий отклонение от среднего значения GC-состава всей последовательности на положительную или отрицательную величину. Зеленым и фиолетовым цветом на графике обозначена положительная и отрицательная величина отношения разницы G-C пар к сумме G+C пар по сравнению со средним значением этой дроби для всей нуклеотидной последовательности

Продукт CDS12 имеет 97 % покрытие и 73 % сходство с белком YoeB суперсемейства токсин-антитоксин YoeB/YefM регулирующей системы, встречающейся на плазмидах семейства *Enterobacteriaceae*. Белок YoeB является токсином, действующим на репликативный аппарат бактерий. Он препятствует расхождению хромосом во время деления клетки. CDS13 имеет 100 % покрытие и 69 % идентичности с белком YefM суперсемейства токсин-антитоксин YoeB/YefM регулирующей системы. YefM является антитоксином и связывается в комплекс токсин-антитоксин, препятствуя действию токсина на ДНК собственной клетки.

CDS16 имеет 100 % гомологии с белком *Y. pestis*, участвующим в инициации репликации. Еще два гена CDS46 и CDS50 кодируют, по данным RAST, белки мобильных генетических элементов. Продукты CDS5, CDS7, CDS8, CDS9, CDS14, CDS15, CDS17, CDS18, CDS22, CDS23, CDS32, CDS35, CDS39, CDS40, CDS42, CDS43, CDS44, CDS49 определены как гипотетические белки с неустановленными функциями. Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что плазмида pTP33 является кольцевым геномом фага, который содержит гены фагового морфогенеза, а также гены двухкомпонентной системы белков токсин-антитоксин YoeB/YefM, действующей на репликативный аппарат бактерий.

По данным баз NCBI GenBank, PATRIC, Uniprot, RAST, Pfam и EMBL, в них отсутствуют бактериофаги высокомолекулярные рТР33. Наибольшее сходство рТР33 имеет с бактериофагом из бактерии *Photorhabdus asymbiotica subsp. asymbiotica*, фагом *Aggregatibacter S1249*, почвенным бактериофагом *Aaphi23*, фагом *Xylella fastidiosa 9a5c*, фагом *Sodalis glossinidius str. morsitans*. Бактерии, содержащие эти фаги, являются почвенными. Штаммы *Y. pestis* также циркулируют в почвенных биоценозах нор грызунов в природных очагах чумы, где они должны выживать в условиях взаимодействия с многочисленными членами этих биоценозов – простейшими, нематодами, другими микроорганизмами [2]. Стабильное сохранение плазмиды рТР33 в штаммах из Тувинского горного очага доказывает наличие селективных преимуществ, придаваемых этим штаммам белками рТР33.

Таким образом, с помощью секвенирования рСКФ из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы и рТР33 из Тувинского горного очага чумы установлено, что первая содержит гены системы секреции IV типа, а вторая представлена геномом фага, включающего гены двухкомпонентной системы белков токсин-антитоксин YoeB/YefM. Повидимому, белки, кодируемые этими плазмидами, являются факторами адаптации штаммов *Y. pestis* к условиям конкретных ландшафтно-географических биоценозов природных очагов чумы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б. Первый случай выделения *Yersinia pestis subsp. pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение I. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:12–6.
2. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2009; 24(4):169–76.
3. Проценко С.Л., Сердюкова Т.В., Розанова Г.Н. Выявление новой плазмиды у пролинзависимых штаммов возбудителя чумы из Центрально-Кавказского природного очага и гетерогенность циркулирующих в нем штаммов по плазмидному составу. В кн.: Особо опасные инфекции на Кавказе. Ставрополь; 1987. С. 265–7.
4. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics.* 2008; 9:75.
5. Christie P.J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubovsky S., Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005; 59:451–85.
6. Dong X.Q., Lindler L.E., Chu M.C. Complete DNA sequence and analysis of an emerging cryptic plasmid isolated from *Yersinia pestis*. *Plasmid.* 2000; 43:144–8.
7. Grant J.R., Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36:W181–4. DOI: 10.1093/nar/gkn179.
8. Song Y., Tong Z., Wang J., Guo Z., Han Y., Zhang J., Pei D., Zhou D., Qin H., Pang X., Han Y., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Chen F., Li S., Ye C., Du Z., Lin W., Wang J., Yu J., Yang H., Wang J., Huang P., Yang R. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Research.* 2004; 11:179–97.

References

1. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdvestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. [The first case of *Yersinia pestis subsp. pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication I. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:60–5.
2. Kutuyev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of interaction between plague agent and invertebrate animals]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 24(4):169–76.
3. Protsenko S.L., Serdyukova T.V., Rozanova G.N. [Detection of new plasmid in proline-dependent plague agent strains from the Central-Caucasian natural focus and heterogeneity of the circulating strains based on their plasmid composition]. In: [Particularly Dangerous Infections in the Caucasus]. Stavropol; 1987. P. 265–7.
4. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics.* 2008; 9:75.
5. Christie P.J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubovsky S., Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005; 59:451–85.
6. Dong X.Q., Lindler L.E., Chu M.C. Complete DNA sequence and analysis of an emerging cryptic plasmid isolated from *Yersinia pestis*. *Plasmid.* 2000; 43:144–8.
7. Grant J.R., Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36:W181–4. DOI: 10.1093/nar/gkn179.
8. Song Y., Tong Z., Wang J., Guo Z., Han Y., Zhang J., Pei D., Zhou D., Qin H., Pang X., Han Y., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Chen F., Li S., Ye C., Du Z., Lin W., Wang J., Yu J., Yang H., Wang J., Huang P., Yang R. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Research.* 2004; 11:179–97.

Authors:

Oglodin E.G., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Odimokov G.N., Guseva N.P., Bugorkova S.A., Kutuyev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Одинокоев Г.Н., Гусева Н.П., Бугоркова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 20.04.15.