

Г.А.Ерошенко, Е.И.Кошель, Г.Н.Одинок, Н.Ю.Шавина, Я.М.Краснов, Н.П.Гусева, В.В.Кутырев

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *phoP/phoQ* И *rovA* – ГЛОБАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

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

Проведено сравнение нуклеотидных последовательностей генов – глобальных регуляторов транскрипции *phoP/phoQ* и *rovA* у природных штаммов *Yersinia pestis* разных подвидов. Выявлена полная идентичность у них последовательности секвенированного фрагмента *phoQ* и высокий консерватизм гена *rovA*. В гене *phoP* у всех штаммов возбудителя чумы основного подвида присутствует миссенс-мутация – замена единичного нуклеотида G→A в позиции 643 от начала гена, которая вызывает смену аминокислотного остатка Gly → Ser в позиции 215 а.о. полипептидной цепи белка PhoP и, возможно, является причиной изменения транскрипционной активности PhoP у штаммов *Y. pestis* основного подвида.

Ключевые слова: возбудитель чумы, регуляторные гены, вариабельность нуклеотидных последовательностей.

G.A.Eroshenko, E.I.Koshel', G.N.Odinokov, N.Yu.Shavina, Ya.M.Krasnov, N.P.Guseva, V.V.Kutyrev

## Variability of *phoP/phoQ* and *rovA* Genes Sequences – Global Regulators of the Plague Agent Life Span

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Compared are the gene sequences of the global *phoP/phoQ* and *rovA* transcription regulators in original *Yersinia pestis* strains of different subtypes. Detected is overall identity of the sequenced *phoQ* fragment and high conservatism of the *rovA* gene. All the plague agent strains belonging to the main subspecies have a missense mutation in *phoP* gene. It is a substitution of a single nucleotide G→A in the position 643 from the beginning of the gene, which causes amino-acid residue shift Gly→Ser in the position 215 in polypeptide chain of the PhoP protein, and, is a possible cause of alteration of the PhoP transcription activity in *Yersinia pestis* strains belonging to the main subspecies.

Key words: plague agent, regulatory genes, variability of the nucleotide sequences.

Жизненный цикл *Yersinia pestis* – возбудителя особо опасной природно-очаговой инфекции представляет собой последовательную смену фаз существования, включающих пребывание в организме хозяина – грызуна (или других теплокровных животных) и вне его – в переносчике блохе или во внешней среде. Возбудитель чумы имеет сложную систему генетической регуляции дифференциальной экспрессии систем жизнеобеспечения на разных стадиях своего жизненного цикла. Важное место в этой системе занимают глобальные регуляторные гены, такие как *phoP/phoQ* и *rovA*, осуществляющие контроль транскрипции значительного числа генов патогенности и жизнеобеспечения в соответствии с сигналами, поступающими из внешней среды [5, 7, 8, 9, 11, 13].

Для эффективной трансмиссии *Y. pestis* переносчиком-блохой необходимо формирование в преджелудке насекомого массивной биопленки – «чумного» блока [2, 4]. Недавно было показано, что для образования биопленки в пищеварительном тракте блохи обязательно наличие двухкомпонентной сенсорной системы PhoP/PhoQ [12]. У мутантного штамма  $\Delta phoP$  – производного *Y. pestis* КИМ6+ в преджелудке блохи значительно снижалась экспрессия 133 генов и существенно повышалась экспрессия других 62 генов. Это

означает, что ген *phoP* необходим для повышения выживаемости *Y. pestis* в пищеварительном тракте блох и для длительного сохранения при хронической инфекции этого переносчика чумы [12]. Наличие гена *phoP* также обязательно для развития инфекционного процесса в теплокровном хозяине, поскольку транскрипционный регулятор PhoP необходим для выживания в макрофагах и, следовательно, для проявления вирулентности возбудителем чумы [7, 9].

Все патогенные виды иерсиний содержат также транскрипционный регулятор RovA, который у энтеропатогенных иерсиний контролирует экспрессию фактора инвазии – инвазина-адгезина Inv, обеспечивающего транслокацию бактерий через эпителий кишечника [5]. У возбудителя чумы этот инвазин инактивирован, однако RovA все же участвует в проявлении вирулентности *Y. pestis*, поскольку установлено, что мутант  $\Delta rovA$  в 80 раз снижал свою вирулентность ( $LD_{50}$ ) и терял способность к распространению/колонизации селезенки и легких после заражения. Показано также, что RovA участвует в регуляции таких генов, как *psaEFABC*, и тем самым, вносит вклад в вирулентность возбудителя [5].

Штаммы возбудителя чумы существенно отличаются друг от друга по вирулентности и эпидемической значимости. Штаммы *Y. pestis*, относящиеся

к основному подвиду, как правило, высоковирулентны и имеют высокий эпидемический потенциал, в то время как штаммы неосновных – кавказского, алтайского, гиссарского и улегейского подвидов имеют избирательную вирулентность и низкий эпидемический потенциал. По сравнению с основным подвидом штаммы неосновных подвидов хуже колонизируют блох и с меньшей эффективностью образуют биопленку на кутикуле нематод [1, 6]. Они приспособлены к существованию в определенных ландшафтно-географических условиях, в то время как штаммы основного подвида распространены по всему миру. Причины различий в патогенности и в особенностях экологии у разных подвидов возбудителя чумы остаются до сих пор не выясненными. Возможно, они связаны с наличием различий в регуляции экспрессии систем жизнеобеспечения и патогенности у разных подвидов *Y. pestis*.

В этой работе нами впервые проведено сравнение нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA* у природных штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов для выявления возможных различий между ними в

структурно-функциональной организации этих регуляторных генов.

### Материалы и методы

В работе использовано 22 природных штамма *Y. pestis*, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий (таблица). Штаммы культивировали на 1,5 % агаре и бульоне LB (pH 7,2) при 28 °С в течение 18–24 ч. Выделение ДНК штаммов проводили общепринятым способом [3]. ПЦР выполняли в стандартных условиях при следующем температурном режиме: 1 цикл – 94 °С в течение 5 мин, 30 циклов – 94 °С 30 с, 55 °С 30 с, 72 °С 1 мин и завершающий цикл – 72 °С в течение 5 мин. Продукты, полученные в ПЦР, анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле.

Аmplифицированные фрагменты гена *phoP/phoQ* и *rovA* у штаммов *Y. pestis* секвенировали на генетическом анализаторе модели «CEQ 8000» (Beckman Coulter) по методу F.Sanger [10]. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов проводили с использованием ал-

Вариабельность нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA* у штаммов *Y. pestis* разных подвидов

Штамм, природный очаг	ГЕНЫ		
	<i>phoP</i> (G → A, 643*) 346**	<i>phoQ</i> (G → A, 214) 729	<i>rovA</i> (A → C, 65) 539
<u>Основной подвид:</u>			
CO92 (NCBI GenBank)	+	-	-
M956 Волго-Уральский песчаный	+	-	-
A-1822 Кызылкумский пустынный	+	-	-
A-1824 Кызылкумский пустынный	+	-	+C после 351
807 Кобыстанский равнинно-предгорный	+	-	-
A-1793 Зауральский степной	+	-	-
И-1270 Забайкальский степной	+	-	-
И-1996 Забайкальский степной	+	-	-
И-3244 Боян-Улегейский аймак, МНР	+	-	-
177 Прикаспийский песчаный	+	-	-
C-471 Центрально-Кавказский высокогорный	+	-	-
212 Африка	+	-	-
<u>Кавказский</u>			
pestodies F (NCBI GenBank)	-	+	-
3544 Арм Ленинанканский горный	-	-	-
1146 Зангезуро-Карабахский горный	-	-	-
<u>Алтайский</u>			
И-2359 Алтайский горный	-	-	-
И-2998 Алтайский горный	-	-	-
И-3086 Баян-Хонгорский аймак, МНР	-	-	T → A в позиции 200
<u>Улегейский</u>			
И-3068 Убур-Хангай, МНР	-	-	A → G в позиции 203
И-3071 Южно-Гобийский аймак, МНР	-	-	T → A в позиции 204
И-3130 Южно-Гобийский, МНР	-	-	-
<u>Гиссарский</u>			
A-1633 Гиссарский высокогорный	-	-	-
A-1728 Гиссарский высокогорный	-	-	-
A-1724 Гиссарский высокогорный	-	-	-

\*Положение мутации. \*\*Размер секвенированного фрагмента гена.

горитма BLAST (NCBI) и программного обеспечения MEGA 5.0.

### Результаты и обсуждение

На первом этапе нами был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA* у штаммов *Y. pestis* CO92 (*orientalis*), KIM (*medievalis*), Antiqua (*antiqua*), Nepal516 (*antiqua*), Angola, 91001 (*microtus*), Pestoides F (кавказский подвид), Z176003, D106004, D182038, представленных в базе данных NCBI GenBank. В результате было установлено, что ген *phoQ*, имеющий размер 1455 пар нуклеотидов (п.н.) и кодирующий сенсорный белок PhoQ, имеет идентичное строение у штаммов CO92, KIM, Antiqua, Nepal516, Angola, 91001, Z176003, D106004 возбудителя чумы. В отличие от них у штамма Pestoides F в 214 позиции от начала гена *phoQ* присутствует миссенс-мутация G → A, приводящая к смене кодона GTT → ATT и кодируемой аминокислоты Val → Ile в позиции 72 аминокислотного остатка (а.о.) белка PhoQ. Только у одного штамма – D182038, относящегося к основному подвиду, присутствует миссенс-мутация T → G в 662 позиции от начала гена *phoQ*, вызывающая смену кодона CTG → CGG и кодируемой им аминокислоты Leu → Arg в позиции 221 а.о. Кроме того, у штамма D182038 в гене *phoQ* содержится еще одна мутация – делеция единичного нуклеотида (ΔC) в 719 позиции, приводящая к сдвигу рамки считывания и терминации трансляции белка PhoQ после 247 а.о. Однако данная мутация может не вызвать потери функции сенсорного белка PhoQ, поскольку она не затрагивает структуру его активного центра.

В гене *phoP* (размер гена 672 п.н.) у всех штаммов *Y. pestis* основного подвида (CO92, KIM, Antiqua, Nepal516, Z176003, D106004, D182038) наблюдалось наличие миссенс-мутации в 643 позиции от начала гена – замены единичного нуклеотида G → A относительно штаммов Angola, 91001, Pestoides F, которая приводит к смене аминокислотного остатка Gly → Ser в позиции 215 а.о. полипептидной цепи, кодируемой этим геном. Выявленная мутация в гене *phoP*, по видимому, может быть связана с различной патогенностью или разной выживаемостью в блохах, поскольку присутствует у всех штаммов основного подвида и отсутствует у штаммов неосновных подвидов.

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности еще одного глобального регулятора – гена *rovA* (размер гена 432 п.н.) – выявил идентичность его структуры у всех штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* за исключением штамма Antiqua, у которого в 65 позиции этого гена обнаружена миссенс-мутация A → C, приводящая к смене триплета CAT → CCT и кодируемой аминокислоты His → Pro в позиции 22 а.о. полипептидной цепи белка – регулятора транскрипции RovA.

Для выявления изменчивости генов *phoP*, *phoQ* и *rovA* у природных штаммов возбудителя чумы основ-

ного и неосновных подвидов нами с использованием программы Primer Express были рассчитаны праймеры на переменные участки этих генов, которые имели следующий состав:

<i>phoP</i> -S	TTATCCGCAACGCAGGGAAAGT
<i>phoP</i> -As	ATGGGCTCTGAAGGTGCTTT
<i>phoQ</i> -S	CGGTGGTAGGTTATATCG
<i>phoQ</i> -As	TAAGGCTGTGAGTGAGGT
<i>rovA</i> -S	ATAGACTGGACTCTGGGA
<i>rovA</i> -As	GTAAGTGTGGGGCTTGT

Размеры амплифицированных с помощью этих праймеров фрагментов ДНК составляли для *phoQ* – 729 п.н., *phoP* – 346 п.н., *rovA* – 539 п.н. Полученные с применением рассчитанных праймеров ПЦР фрагменты природных штаммов *Y. pestis* были секвенированы и определены нуклеотидные последовательности переменных фрагментов генов *phoP*, *phoQ* и всего гена *rovA*. Всего изучено 22 природных штамма *Y. pestis*, 11 из которых принадлежали к основному подвиду и 11 (по три штамма алтайского, гиссарского и улегейского подвидов и два штамма кавказского подвида) – к неосновным подвидам (таблица).

Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *phoP* у штаммов *Y. pestis* выявило наличие переменного локуса в позиции 643 от начала гена. У всех 11 штаммов неосновных подвидов в этой позиции присутствовал нуклеотид G. У штаммов предшественника возбудителя чумы – псевдотуберкулезного микроба *Y. pseudotuberculosis* PB1+, YPIII, IP 32953, IP 31758, представленных в базе NCBI GenBank, в этой позиции также содержался нуклеотид G. В отличие от них все 11 секвенированных нами штаммов *Y. pestis* основного подвида содержали миссенс-мутацию в 643 позиции от начала гена – замену единичного нуклеотида G → A, которая приводит к замене аминокислотного остатка (Gly → Ser) в позиции 215 регуляторного белка PhoP. Регуляторный белок PhoP состоит из 223 а.о. и включает согласно базе данных Pfam (<http://pfam.janelia.org/>) два домена. Первый из них – N-концевой регуляторный домен (3–112 а.о.) и второй C-концевой домен (146–220 а.о.), обладающий ДНК-связывающей активностью с НТН (от англ. helix-turn-helix) мотивом. Выявленная в штаммах *Y. pestis* основного подвида мутация приводит к замене аминокислоты в положении 215 а.о. C-концевого ДНК-связывающего домена, что, возможно, вызывает изменение активности белка PhoP у штаммов *Y. pestis* основного подвида по сравнению со штаммами неосновных подвидов.

Сравнение нуклеотидных последовательностей другого гена – *phoQ* этой двухкомпонентной сенсорной системы PhoP/PhoQ выявило полную идентичность секвенированного фрагмента гена (729 п.н.) у всех 22 изученных штаммов основного и неосновных подвидов, в том числе и у двух штаммов кавказского подвида (таблица). Ранее у штамма кавказского подвида *Y. pestis* pestoides F, представленного в базе данных NCBI GenBank, нами выявлено наличие замены единичного нуклеотида G → A в позиции 214 от нача-

ла гена, однако ее отсутствие у двух изученных нами природных штаммов этого подвида означает, что выявленная у *pestoides* F мутация является либо индивидуальной для этого штамма, либо она характерна для определенной группы штаммов этого подвида.

В гене *rovA* у исследованных штаммов *Y. pestis* установлено наличие индивидуальных замен, встречающихся только у отдельных штаммов. У штамма алтайского подвида *Y. pestis* И-3086 присутствовала замена единичного нуклеотида Т → А в позиции 200, у штаммов гиссарского подвида И-3068 замена А → Г в позиции 203 и у И-3071 – Т → А в позиции 204. Все три штамма выделены на территории Монголии. У других штаммов эти мутации отсутствовали. Только у одного из штаммов основного подвида – А-1824 из Кызылкумского песчаного очага чумы выявлена другая мутация – вставка единичного нуклеотида С после 351 позиции. Эта мутация приводит к сдвигу рамки считывания, что влечет за собой изменение аминокислотного состава белка RovA в его концевой части (таблица).

Таким образом, в этой работе нами проведено сравнение нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA*, кодирующих глобальные транскрипционные регуляторы PhoP/PhoQ и RovA. В гене *phoP* у всех штаммов основного подвида присутствует миссенс-мутация, которая вызывает замену единичного нуклеотида и смену кодируемого аминокислотного остатка глицина на серин в позиции 215 регуляторного белка PhoP. Возможно, что эта мутация, общая для всех штаммов основного подвида, приобретенная на ранней стадии эволюции этого подвида, привела к изменению вторичной структуры одного из доменов белка PhoP, что вызвало изменение его регуляторной активности. Известно, что штаммы основного подвида обладают большей патогенностью и способностью выживать в блохах по сравнению со штаммами неосновных подвидов. Последовательность гена *phoQ*, кодирующего сенсорный белок двухкомпонентной системы PhoP/PhoQ, была высококонсервативна у штаммов всех подвидов, несмотря на большой размер секвенированного нами фрагмента (729 п.н.) этого гена, что указывает на важность сохранения структурно-функциональной целостности гена *phoQ* и кодируемого им белка PhoQ.

Последовательность небольшого (432 п.н.) гена *rovA* оказалось достаточно консервативной у исследованных штаммов *Y. pestis* разных подвидов, что также свидетельствует о важности сохранения его структурно-функциональной целостности для патогенности *Y. pestis*.

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д от 25 июля 2011 г. в рамках федераль-

ной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базанова Л.П., Иннокентьева Т.И. О роли блох – основных и второстепенных переносчиков чумы – в циркуляции возбудителя в сибирских природных очагах. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2008; 3:4–60.
2. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина; 2007. 222 с.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 480 с.
4. Vacot A.W., Martin C.J. Observation on the mechanism of the transmission of plague by fleas. J. Hyg. (Lond). 1914; 13 (Suppl.):423–39.
5. Cathelyn J.S., Grosby S.D., Lathem W.W., Goldman W.E., Miller V.I. RovA – a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103:13514–19.
6. Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kutyrev V.V. Comparative analysis of biofilm formation by main and nonmain subspecies of *Yersinia pestis* strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010; 59:513–20.
7. Grabenstein J.P., Fukuto H.S., Palmer L.E., Bliska J.B. Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. Infect. Immun. 2006; 74:3727–41.
8. Hütchen P.G., Prior G.L., Oyston P.C., Panico M., Wren B.W., Titball R.W. et al. Structural characterization of lipo-oligosaccharide (LOS) from *Yersinia pestis*: regulation of LOS structure by the PhoPQ system. Mol. Microbiol. 2002; 44:637–50.
9. Oyston P.C.F., Dorell N., Williams K., Li S.-R., Green M., Titball R.W., Wren B.W. The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 2000; 68:3419–25.
10. Sanger F., Nicklen L., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74:5463–7.
11. Tran H.J., Heroven A.K., Winkler L., Spreter T., Beatrix B., Dersch P. Analysis of RovA, a transcriptional regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence that acts through antirepression and direct transcriptional activation. J. Biol. Chem. 2005; 280:42423–32.
12. Vadivaloo V.V. PhoP regulation of *Yersinia pestis* during flea infection. In: *Yersinia* 2010. 10th Intern. Symp.; 2010 Oct 23–27. Brazil; 2010. P. 67.
13. Zhou D., Han Y., Qin I., Chen Z., Qin J., Song Y. et al. Transcriptome analysis of the Mg<sup>2+</sup>-responsive PhoP regulator in *Yersinia pestis*. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 250:85–95.

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

1. Bazanova L.P., Innokent'eva T.I. [Concerning the role of fleas – primary and secondary vectors of plague – for the agent circulation in the Siberian natural foci]. Med. Parazitol. Parazitarn. Bol. 2008; 3:54–60.
2. Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. [Plague Agent: Ultrastructure and Localization in the Vector]. M.: Meditsina; 2007. 222 p.
3. Maniatis T., Fritch E., Sambrook G. [Molecular Cloning]. M.: Mir; 1984. 480 p.

#### Authors:

Eroshenko G.A., Koshel' E.I., Odinokov G.N., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Ерошенко Г.А., Кошель Е.И., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 20.12.11.