

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-75-81

УДК 616.98:579.842.23

Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова

Роль сидерофора иерсиниахелина в физиологии *Yersinia pestis*

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

Патогенные бактерии используют низкомолекулярные хелаторы железа – сидерофоры – для ассимиляции железа в организме хозяина. Будучи признанными факторами вирулентности, эти молекулы, различающиеся по структурным и функциональным свойствам, являются предметом наиболее интенсивного изучения в медицинской микробиологии. Настоящее исследование посвящено изучению сидерофора иерсиниахелина (Ych), обнаруженного у возбудителя чумы *Yersinia pestis*. **Цель** работы – выяснение роли Ych в физиологии *Y. pestis* путем сравнения свойств трех штаммов чумного микроба, различающихся по продукции Ych. **Материалы и методы.** В экспериментах использованы три варианта штамма *Y. pestis* EV76: родительский штамм *Y. pestis* EV76, его мутант, не продуцирующий Ych из-за делеции трех генов биосинтеза сидерофора (аналоги *ypo1530–1532* в штамме *Y. pestis* CO92), и комплементированный мутант, который трансформирован рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV, содержащей клонированные гены биосинтеза Ych в составе высококопийного плазмидного вектора pSC-A-amp/kan. Сравнительный анализ трех штаммов проведен по морфологии колоний, сидерофорной активности, скорости роста и чувствительности к перекиси водорода. **Результаты и обсуждение.** В результате сравнения штаммов установлено, что секреция бактериями Ych при 26 °C обеспечивает ассимиляцию бактериями железа. При 37 °C Ych не секретируется в среду и обеспечивает защиту бактерий от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. Таким образом, в ходе исследования показано, что иерсиниахелин способен стимулировать ассимиляцию бактериями железа в железодефицитных условиях и обладает антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: иерсиниахелин, сидерофор, *Yersinia pestis*.

Корреспондирующий автор: Кузнецова Дарья Александровна, e-mail: dariakuz3112@bk.ru.

Для цитирования: 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

Поступила 27.06.2022. Принята к публ. 06.09.2022.

D.A. Kuznetsova, V.A. Rykova, O.N. Podladchikova

The Role of the Yersiniachelin Siderophore in the Physiology of *Yersinia pestis*

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

Abstract. Pathogenic bacteria use low-molecular-weight iron chelators – siderophores – to assimilate iron in the host body. Being recognized as virulence factors, these molecules, differing in structural and functional properties, are the subject of the most intensive research in medical microbiology. The present study is devoted to the investigation of yersiniachelin siderophore (Ych) found in the causative agent of plague, *Yersinia pestis*. **The aim** of the work was to clarify the role of Ych in the physiology of *Y. pestis* by comparing the properties of three strains of the plague microbe, differing in Ych production. **Materials and methods.** Three variants of *Y. pestis* EV76 strain were used in the experiments: parent strain *Y. pestis* EV76, its mutant that does not produce Ych due to deletion of three siderophore biosynthesis genes (analogues of *ypo1530–1532* in *Y. pestis* CO92 strain) and a complemented mutant that was transformed by a recombinant pSC-A-5EV plasmid containing Ych biosynthesis genes cloned into the high-copy plasmid vector pSC-A-amp/kan. Comparative analysis of the three strains was carried out in terms of colony morphology, siderophore activity, growth rate, and sensitivity to hydrogen peroxide. **Results and discussion.** The comparison of these strains has revealed that the secretion of Ych by bacteria at 26 °C ensures the assimilation of iron. At 37 °C, Ych is not secreted into the medium and protects bacteria from the bactericidal action of reactive oxygen compounds. Thus, the study shows that yersiniachelin is able to stimulate the assimilation of iron by bacteria under iron-deficit conditions and has antioxidant properties.

Key words: yersiniachelin, siderophore, *Yersinia pestis*.

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

Corresponding author: Dar'ya A. Kuznetsova, e-mail: dariakuz3112@bk.ru.

Citation: 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. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-75-81

Received 27.06.2022. Accepted 06.09.2022.

Kuznetsova D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4198-0629>
Rykova V.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3484-5100>

Podladchikova O.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7178-2255>

В настоящее время выявлены и охарактеризованы многие факторы вирулентности *Yersinia pestis*, способствующие проникновению, приживлению и размножению возбудителя чумы в организме млекопитающих. Однако факторы, определяющие на-

чальную стадию инфекции, наименее изучены. В то же время способность выживать, размножаться и противостоять защитным механизмам врожденного иммунитета хозяина на первом этапе инфекции определяет дальнейшую судьбу инфекционного

процесса. Известно, что в начале инфекции способность бактерий противостоять защитным механизмам хозяина зависит от способности ассимилировать железо [1]. Важным механизмом ассимиляции бактериями железа в организме хозяина является продукция низкомолекулярных хелаторов – сидерофоров [2]. Сидерофоры являются признанными факторами вирулентности бактерий, поэтому изучение этих молекул, различающихся по структурным и функциональным свойствам, является в настоящее время наиболее динамично развивающейся областью исследований в медицинской микробиологии. Анализ разных бактериальных сидерофоров показал, что, помимо обеспечения бактерий железом, сидерофоры выполняют множество других функций [3]. Многие бактерии продуцируют несколько сидерофоров, активных в разных условиях и на разных этапах инфекции. Накапливаются данные, что способность патогенных бактерий продуцировать множественные сидерофоры коррелирует с тяжестью вызываемого патогенами заболевания. Прежде всего, это связано с многообразием функций сидерофоров во время инфекции, а также с их разным сродством к белку иммунной системы сидерокалину-2, который продуцируется эпителиальными клетками и нейтрофилами и инактивирует некоторые (например, катехолатные) сидерофоры [4]. При этом другие сидерофоры (например, сидерофоры гидроксаматного типа) не взаимодействуют с сидерокалином. По современным представлениям, именно комбинация продуцируемых патогеном сидерофоров определяет его «репликативные ниши» и модулирует реакцию хозяина на инфекцию [5].

Важная роль сидерофоров для вирулентности бактерий показана в ходе многочисленных исследований сидерофора иерсиниабактина (Ybt) *Y. pestis*, который кодируется островом высокой патогенности (HPI-1) в составе нестабильного хромосомного *pgm*-локуса [6]. Хотя Ybt хорошо изучен как на модели *Y. pestis*, так и других синтезирующих его патогенных энтеробактерий, механизм его участия в реализации патогенных свойств возбудителя чумы остается предметом исследования. На протяжении многих лет Ybt считался единственным сидерофором *Y. pestis* [7], но в секвенированных геномах *Y. pestis* выявлены гены биосинтеза и других сидерофоров. Экспрессия этих генов *in vitro* и *in vivo* подтверждается результатами транскриптомных исследований [8].

Наши исследования свидетельствуют о том, что, помимо Ybt, *Y. pestis* действительно синтезирует еще один сидерофор – иерсиниахелин (Ych), который кодируется хромосомным *usu*-локусом [9]. В нашей предыдущей работе [10] для доказательства функциональности генов *usu*-локуса в клетках чумного микроба и изучения возможных функций Ych гены его биосинтеза из штамма *Y. pestis* EV76 клонированы в составе высококопийного вектора pSCA-amp/kan в клетках *Escherichia coli* H1884, не проду-

цирующих собственный сидерофор энтеробактин. С помощью сравнения свойств этого рекомбинантного штамма с родительским штаммом, трансформированным векторной плазмидой, установлено, что Ych может экспрессироваться в клетках кишечной палочки и способствует защите бактерий от реактивных соединений кислорода. Поскольку в рекомбинантной плазмиде имеются гены биосинтеза Ych и отсутствуют гены, ответственные за его транспорт, для анализа участия сидерофора в ассимиляции железа и реализации его других возможных функций необходимо использовать штамм *Y. pestis*, содержащий гены его транспорта. В настоящей работе использован вакцинный штамм *Y. pestis* EV76, не продуцирующий Ybt из-за делеции хромосомного *pgm*-локуса, в состав которого входят гены биосинтеза и транспорта этого сидерофора. При этом штамм содержит гены *usu*-локуса и продуцирует Ych. Для изучения роли Ych в клетках чумного микроба из штамма *Y. pestis* EV76 получен мутант, не продуцирующий Ych, а также комплементированный мутант, содержащий плазмиду pSCA-5EV с клонированными генами биосинтеза Ych из штамма EV76. **Цель работы** – выяснение роли Ych в физиологии *Y. pestis* путем сравнения свойств трех штаммов чумного микроба, различающихся по продукции Ych.

Материалы и методы

В работе использовали три штамма: родительский штамм *Y. pestis* EV76, его мутант, не продуцирующий Ych, трансформированные векторной плазмидой pSC-A-amp/kan, а также мутант, который трансформирован рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV. Штаммы, полученные из Коллекции патогенных микроорганизмов Ростовского-на-Дону противочумного института, представлены в таблице. Мутант получен методом конъюгативного переноса из клеток *E. coli* рекомбинантной плазмиды, содержащей делецию трех генов биосинтеза Ych (аналоги *upo1530–1532* в штамме *Y. pestis* CO92). В то же время у мутанта сохранены транспортные гены, необходимые для секреции Ych и поглощения бактериями нагруженного железом этого сидерофора. Для комплементации отсутствующих генов биосинтеза Ych мутант трансформирован рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV, содержащей эти гены [11].

Штаммы выращивали в жидких и на плотных питательных средах: LB (DIFCO, США), NB (DIFCO, США), TA (DIFCO, США) и минимальной среде M9, в которую добавляли растворы четырех L-аминокислот (метионин, треонин, цистеин, фенилаланин) до концентрации 20 мкг/мл. При выращивании штаммов, содержащих векторную и рекомбинантную плазмиды, в среды добавляли антибиотики: ампициллин и канамицин (50 мкг/мл). Для анализа влияния железа на скорость роста бактерий в среды добавляли растворы FeCl₃ (100 мкМ) и хелатора железа 2-2'-дипиридила (50–100 мкМ). Бактериальные

Штаммы, использованные в работе
Strains used in the study

Название Name	Характеристика Description	Ссылка References
<i>Y. pestis</i> EV76	Родительский штамм Parent strain	[12]
<i>Y. pestis</i> EV76 Ych ⁻	Мутант родительского штамма, не продуцирующий Ych Mutant of the parent strain not producing Ych	[13]
<i>Y. pestis</i> EV76 /pSCA-amp/kan	Родительский штамм, трансформированный векторной плазмидой pSCA-amp/kan Parent strain transformed with vector plasmid pSCA-amp/kan	Настоящая работа Current study
<i>Y. pestis</i> EV76 Ych ⁻ /pSCA-amp/kan	Ych ⁻ мутант, трансформированный векторной плазмидой pSCA-amp/kan Ych ⁻ mutant transformed with a vector plasmid pSCA-amp/kan	Настоящая работа Current study
<i>Y. pestis</i> EV76 Ych ⁻ /pSCA-5EV	Ych ⁻ мутант, комплементированный рекомбинантной плазмидой pSCA-5EV, содержащей гены биосинтеза Ych, встроенные в вектор pSCA-amp/kan Ych ⁻ mutant complemented with pSCA-5EV recombinant plasmid containing Ych biosynthesis genes inserted into the pSCA-amp/kan vector	[11]

взвеси для экспериментов готовили на забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР), количество содержащихся в них бактерий определяли, используя оптический отраслевой стандарт мутности Тарасевича, измерение оптической плотности и высеив культур на плотную питательную среду LB для подсчета выросших колоний.

Анализ сидерофорной активности штаммов проводили на среде, разработанной для выявления сидерофоров у разных видов бактерий [14]. Эта среда содержит хромогенный хелатор железа хромазурол S (CAS), имеющий при 30%-м насыщении железом сине-зеленую окраску, которая изменяется на желтую после удаления из CAS-реагента железа сидерофорами, выделяемыми бактериями в среду. Для индукции сидерофорной активности перед посевом на индикаторную среду штаммы *Y. pestis* выращивали при 26 °С на железodefицитной среде NB, содержащей 50–100 мкМ 2-2'-дипиридила. На CAS-агар пятном наносили по 10 мкл суспензии (5·10⁹ м.кл./мл дистиллированной воды) каждого штамма и посеив инкубировали 2–5 суток при 26 или 37 °С.

Скорость роста бактерий определяли в жидких питательных средах (LB, M9 и M9 с дипиридилом). Бактерии предварительно выращивали при 26 °С на плотной среде LB с ампициллином в течение 48 ч, отмывали 2 раза холодным стерильным ЗФР от остатков среды и суспендировали в ЗФР (до 10⁹ м.кл./мл по стандарту мутности). Взвеси бактерий выравнивали до одинаковых показателей оптической плотности (соответствующей 0,1 при длине волны 550 нм) и по 10⁷ м.кл./мл засеивали в 150 мл питательной среды. Бактерии выращивали при 26 °С в условиях аэрации на шуттеле (150 об/мин). Через определенные промежутки времени из колб отбирали по 2 мл взвеси, измеряли оптическую плотность и параллельно высеивали на плотную среду LB для контроля чистоты культуры и подсчета колоний. Полученные данные оптической плотности использовали для построения кривых роста штаммов в различных средах с помощью программы Microsoft Excel.

Чувствительность трех исследуемых штаммов к перекиси водорода определяли на плотной питательной среде диско-диффузионным методом и в растворе (ЗФР) путем подсчета бактерий, выживших после действия перекиси. На плотную среду ТА высеивали суспензии (10⁹ м.кл./мл дистиллированной воды) штаммов, предварительно выращенных на этой среде при 37 °С в течение 48 ч. Через 6 ч инкубации при 37 °С в центр посевов помещали бумажный диск, пропитанный 3%-м раствором перекиси водорода. После 48 ч выращивания штаммов при 37 °С на агаре вокруг дисков отмечались зоны отсутствия роста бактерий, различающиеся по диаметру у разных штаммов.

Анализ чувствительности трех штаммов к перекиси в ЗФР проводили, используя суспензии в ЗФР бактерий, выращенных за 48 ч при 37 °С на агаре LB. Суспензии разбавляли до концентрации 10⁵ м.к./мл и добавляли перекись водорода (до конечной концентрации 0,01 %). В контрольные пробы вместо перекиси добавляли стерильную дистиллированную воду. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С, после чего разбавляли в 100 раз и высеивали по 0,1 мл (т.е. 100 м.кл./чашка Петри) на среду LB (по 3 чашки на каждую пробу). Через 48–72 ч выращивания при 26 °С подсчитывали количество выросших колоний и рассчитывали процент выживших клеток по отношению к контролям.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ вариантов штамма *Y. pestis* EV76, различающихся по продукции Ych. Выяснение роли Ych в физиологии чумного микроба проведено путем сравнения свойств родительского штамма *Y. pestis* EV76 с его мутантом, не продуцирующим этот сидерофор, а также с мутантом, комплементированным рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV, содержащей гены биосинтеза Ych. Для корректного сравнения штаммов в одинаковых условиях в присутствии ампициллина, необходимого для сохранения в бактериях рекомбинантной плазмиды

pSC-A-5EV, родительский штамм и его мутант по продукции Ych трансформированы векторной плазмидой pSC-A-amp/kan. Анализ трех штаммов, выросших на среде LB при 26 и 37 °C, показал, что штаммы не различались по морфологии колоний при 26 °C, однако при 37 °C рекомбинантный штамм – суперпродукент Ych образовывал коричневые включения внутри колоний (рис. 1, А). По-видимому, при 37 °C Ych не выделяется рекомбинантным штаммом в среду, а накапливается в бактериях в комплексе с железом. Отсутствие подобного эффекта при 26 °C позволяло предположить, что при этой температуре сидерофор выделяется из клеток. Подтверждение этого предположения получено при анализе сидерофорной активности штаммов на индикаторной среде для выявления продукции сидерофоров (CAS-агар).

Сравнение сидерофорной активности трех вышеописанных вариантов штамма *Y. pestis* EV76 (рис. 1, В) проведено при 26 °C, поскольку при 37 °C штамм *Y. pestis* EV76 не растет на железodefицитных средах, в том числе и на CAS-агаре. Известно, что для роста в этих условиях чумному микробу необходим сидерофор Ybt [6], экспрессия которого активируется при 37 °C. Как видно на рис. 1, В, ни родительский штамм, ни его мутант не обладают сидерофорной активностью при 26 °C. По-видимому, это связано с известными результатами разных авторов, что *pgm*⁻ штаммы не обладают сидерофорной активностью на CAS-агаре, поскольку не продуцируют Ybt. Это наблюдение привело авторов к заключению, что *Y. pestis* не синтезирует других сидерофоров, кроме Ybt [7]. Тем не менее сидерофор Ych обнаружен в составе фактора аутоагглютинации чумного микроба, который представляет собой поверхностный Нср-подобный компонент системы секреции VI типа. Наше предыдущее исследование позволило установить, что отсутствие у *pgm*⁻ штаммов активности на CAS-агаре, не связано с отсутствием способности синтезировать другие сидерофоры. Как выяснилось, *pgm*⁻, в отличие от *pgm*⁺ штаммов, продуцируют низкомолекулярный ингибитор, который препятствует выделению сидерофоров в среду. Однако суперпродукция Ych рекомбинантным штаммом, содержащим гены биосинтеза Ych на высококопийной плазмиде, способствует преодолению действия ингибитора, выделению сидерофора в среду и образованию большой зоны просветления CAS-реагента вокруг посева.

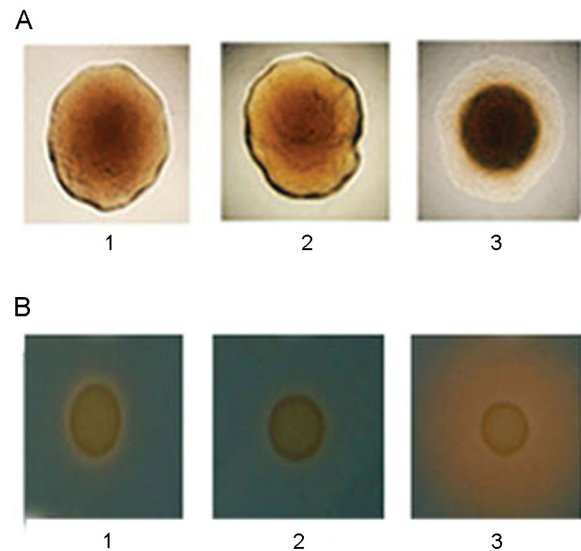


Рис. 1. Сравнительный анализ родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего Ych (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3):

А – морфология колоний, образованных тремя штаммами после 48 ч выращивания при 37 °C на среде LB; В – сидерофорная активность штаммов, выращенных в течение 48 ч на CAS-агаре при 26 °C

Fig. 1. Comparative analysis of the parent strain *Y. pestis* EV76 (1), its mutant that does not produce Ych (2), and the mutant complemented with the recombinant plasmid pSC-A-5EV (3):

A – morphology of colonies formed by three strains at 37 °C and cultivation time of 48 h on LB medium; B – siderophore activity of the strains cultured for 48 h on CAS-agar at 26 °C

Анализ участия Ych в ассимиляции бактериями железа. Исследование возможной роли Ych в ассимиляции чумным микробом железа проведено при сравнении трех штаммов по способности расти при 26 °C в средах, различающихся по концентрации железа. На первом этапе работы сравнение родительского и мутантного штаммов позволило установить, что оба штамма практически не отличались по скорости роста в богатой железом среде LB (рис. 2, А), однако мутант несколько отставал от родительского штамма при росте в минимальной среде М9 (рис. 2, В), особенно в железodefицитной среде М9, содержащей 50 мкМ хелатора железа 2-2'-дипиридила (рис. 2, С). Надо отметить, что при добавлении в среду М9 солей трехвалентного железа (100 мкМ) различия в скорости роста между штаммами отсутствовали, что подтверждало участие Ych в ассимиляции бактериями железа в условиях его дефицита.

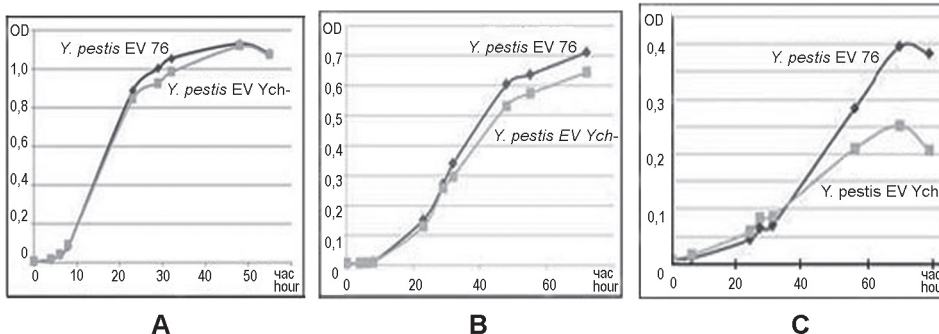


Рис. 2. Кривые роста родительского (*Y. pestis* EV76) и мутантного (*Y. pestis* EV76 Ych⁻) штаммов при выращивании с аэрацией (150 об/мин) при 26 °C в жидких питательных средах:

LB (А), М9 (В) и М9 с 50 мкМ 2-2'-дипиридила (С)

Fig. 2. Growth curves of parent (*Y. pestis* EV76) and mutant (*Y. pestis* EV76 Ych⁻) strains when cultured with aeration (150 rpm) at 26 °C in liquid nutrient media:

LB (A), M9 (B), and M9 with 50 μM of 2-2'-dipyridyl (C)

Полученные данные подтвердились и при включении в анализ мутанта, комплементированного плазмидой pSC-A-5EV. Сравнение скорости роста трех штаммов в среде M9 в присутствии ампициллина (50 мкг/мл) и 50 мкМ хелатора 2-2'-дипиридила (рис. 3) выявило различия между штаммами. Комплементированный мутант значительно обгонял в росте родительский штамм, а мутант, не продуцирующий сидерофор, отставал по росту от обоих штаммов.

Различия в скорости роста между тремя штаммами были более выраженными при их выращивании в условиях интенсивной аэрации и практически отсутствовали при выращивании бактерий в стационарных условиях. Эти данные свидетельствовали о том, что Ych, помимо участия в ассимиляции бактериями *Y. pestis* железа в железodefицитных условиях, способствует защите бактерий от действия реактивных соединений кислорода.

Анализ антиоксидантной активности Ych.

С целью подтвердить предположение, что экспрессия Ych защищает бактерии от реактивных соединений кислорода, мы проанализировали чувствительность штаммов к бактерицидному действию перекиси водорода. Сравнение показало (рис. 4), что мутант, не продуцирующий Ych, более чувствителен к действию перекиси, чем родительский штамм.

При анализе штаммов диско-диффузионным методом (рис. 4, А) мутант образовывал большую зону ингибиции роста, чем родительский штамм и комплементированный мутант. Анализ чувствительности трех штаммов к перекиси водорода в ЗФР (рис. 4, В) также показал, что мутант, комплементированный рекомбинантной плазмидой, восстанавливал способность сопротивляться действию перекиси. В разных экспериментах разница между родительским

и мутантным штаммом была количественно более стабильной, в то время как штамм-суперпродуцент Ych демонстрировал разный процент бактерий, выживших после воздействия перекиси. При этом во всех экспериментах сохранялась одна и та же тенденция – комплементированный мутант обладал большей устойчивостью к перекиси, чем мутант, не продуцирующий Ych. Вышеописанные различия между тремя штаммами подтверждают возможную роль Ych в качестве антиоксиданта, способствующего снижению чувствительности бактерий к бактерицидному действию перекиси водорода.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало экспрессию генов *usu*-кластера не только в клетках кишечной палочки [10], но и в бактериях *Y. pestis*. Вопрос о возможности экспрессии генов этого кластера клетками возбудителя чумы многие годы дискутировался в литературе, и функционирование генов этого кластера ставилось рядом авторов под сомнение [7]. Сомнения в возможности синтеза сидерофора, кодируемого *usu*-кластером, высказывались из-за наличия в нем гена биосинтеза сидерофора (аналог гена *upo1538* в штамме *Y. pestis* CO92), содержащего мутацию со сдвигом рамки счи-

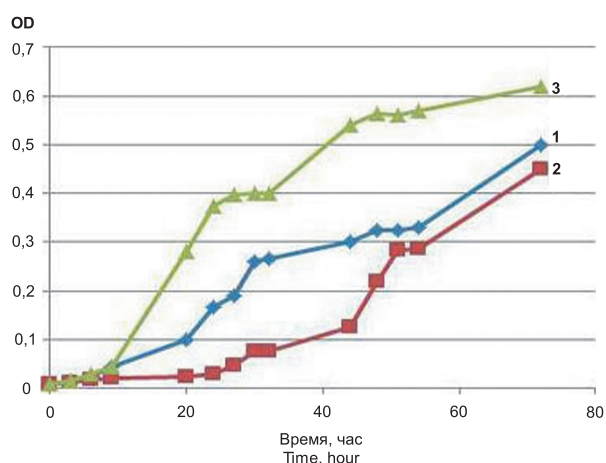


Рис. 3. Кривые роста родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего Ych (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3) в среде M9, содержащей ампициллин (50 мкг/мл) и 50 мкМ 2-2'-дипиридила

Fig. 3. Growth curves of the parent strain *Y. pestis* EV76 (1), its mutant that does not produce Ych (2), and the mutant complemented with the recombinant plasmid pSC-A-5EV (3) in M9 medium containing ampicillin (50 μg/ml) and 50 μM of 2-2'-dipyridyl

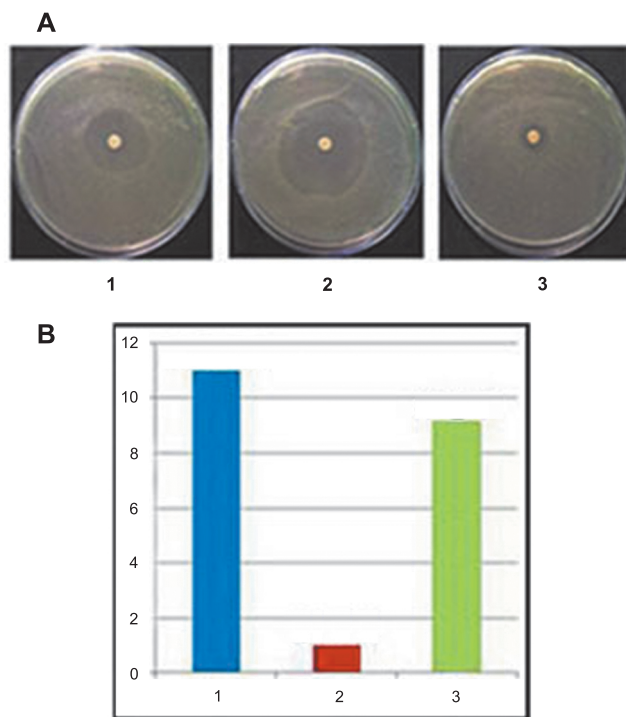


Рис. 4. Сравнительный анализ чувствительности к бактерицидному действию перекиси водорода родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего Ych (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой pSC-A-5EV (3):

A – диско-диффузионный метод; B – чувствительность (процент выживших бактерий) трех штаммов после воздействия 0,01%-й перекиси водорода в ЗФР в течение 30 мин

Fig. 4. Comparative analysis of sensitivity to the bactericidal effect of hydrogen peroxide in the parent strain *Y. pestis* EV76 (1), its mutant that does not produce Ych (2), and the mutant complemented with the recombinant plasmid pSC-A-5EV (3):

A – disk diffusion method; B – sensitivity (percentage of survived bacteria) of the three strains after the 30 min exposition to 0.01 % hydrogen peroxide in PBS (phosphate buffered saline solution)

тивания. Однако проведенный нами анализ структуры этого гена показывает, что он является копией гена *uro1532*, не содержащего видимых повреждений. Поэтому в геноме разных штаммов чумного микроба содержится полный набор генов, необходимых для синтеза Ych.

С помощью транскрипционного анализа с использованием тотальных геномных микрочипов показано, что входящие в *usi*-кластер гены транскрибируются чумным микробом [15] и обладают повышенной экспрессией в плазме крови человека по сравнению со средой LB [16]. Более того, установлено, что один из биосинтетических генов этого кластера, *usuI*, снижает свою экспрессию при 37 °С. Это позволяло предположить, что Ych должен обладать повышенной экспрессией при 26 °С и может участвовать в ассимиляции чумным микробом железа при этой температуре. Тем не менее многие годы попытки обнаружить у чумного микроба другие сидерофоры кроме Ybt на среде для выявления сидерофоров были отрицательными. Секрцию Ych клетками чумного микроба на индикаторной среде для выявления сидерофоров удалось обнаружить только в настоящем исследовании – у рекомбинантного штамма *Y. pestis* – суперпродуцента этого сидерофора.

Наше исследование на модели трех вариантов штамма *Y. pestis* EV76, различающихся по продукции Ych, позволило обнаружить свидетельства экспрессии этого сидерофора не только штаммом-суперпродуцентом, но и родительским штаммом. Так, в отличие от мутанта, не синтезирующего Ych, родительский штамм более активно размножался в условиях дефицита железа при 26 °С, что свидетельствовало об участии Ych в ассимиляции железа при этой температуре. Предположение о существовании у чумного микроба криптической системы ассимиляции железа при 26 °С высказывалось еще в 1996 г. [17]. Подтверждение такому предположению получено в данной работе – продукция Ych родительским и рекомбинантным штаммом продуцентом иерсиниахелина способствует размножению бактерий в железodefицитной среде при 26 °С. Отсутствие роста исследуемых штаммов, не продуцирующих Ybt, в железodefицитных средах при 37 °С свидетельствует в пользу заключения о необходимости Ybt для роста *Y. pestis* в этих условиях [6]. Исследование функциональных свойств Ych на модели вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 позволило заключить, что этот сидерофор, при наличии у бактерий его рецептора на поверхности клеток и транспортных белков в мембранах бактерий, способен стимулировать ассимиляцию бактериями железа в железodefицитных условиях при 26 °С.

Свидетельства продукции Ych чумным микробом не только при 26 °С, но и при 37 °С, получены в настоящем исследовании. Накопление Ych штаммом-суперпродуцентом внутри бактерий при 37 °С предполагает снижение эффективности секреции сидерофора в этих условиях. При этом Ych способствует

защите бактерий от бактерицидного действия перекиси водорода – и родительский штамм, и суперпродуцент сидерофора более защищены от действия перекиси, чем мутант, не продуцирующий Ych. Повышение антиоксидантных свойств сидерофоров, локализованных внутри клеток было выявлено как у бактерий, так и у грибов [18, 19]. Результаты настоящего исследования на модели чумного микроба подтвердили данные, полученные на модели рекомбинантного штамма кишечной палочки, о том, что Ych обладает антиоксидантными свойствами [10], более выраженными при внутриклеточной локализации сидерофора.

Таким образом, проведенное исследование показало, что Ych экспрессируется клетками чумного микроба как при 26 °С, так и 37 °С. При 26 °С в железodefицитных условиях он секретируется в среду и способствует ассимиляции железа, а при 37 °С остается внутри бактерий и защищает их от бактерицидного действия реактивных соединений кислорода. Выявленные свойства иерсиниахелина позволяют предположить, что этот сидерофор может играть определенную роль и в инфекционном процессе. Анализ влияния Ych на организм лабораторных животных является предметом изучения в настоящее время.

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

Список литературы

1. Kontoghiorghes G.J., Kontoghiorghes C.N. Iron and chelation in biochemistry and medicine: new approaches to controlling iron metabolism and treating related diseases. *Cells*. 2020; 19(6):1456. DOI: 10.3390/cells9061456.
2. 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.
3. Johnstone T.C., Nolan E.M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans*. 2015; 44(14):6320–39. DOI: 10.1039/c4dt03559c.
4. Sia A.K., Allred B.E., Raymond K.N. Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. *Cur. Opin. Chem. Biol*. 2013; 17(2):150–7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.014.
5. Holden V., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*. 2015; 7(6):986–95. DOI: 10.1039/c4mt00333k.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Podladchikova O., Rykova V., Antonenka U., Rakin A. *Yersinia pestis* autoagglutination is mediated by Hcp-like protein and siderophore Yersiniachelin (Ych). *Adv. Exp. Med. Biol*. 2012; 954:289–92. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_36.
10. 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.
11. Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Кузнецова Д.А. Рекомбинантная плаزمид, экспрессирующая клонированные гены биосинтеза сидерофора иерсиниахелина возбудителя

чумы, способ ее получения и штамм *Y. pestis* – суперпродуцент иерсиниахелина. Патент на изобретение РФ № 2670949, опубл. 25.10.2018. Бюл. № 30.

12. Girard G. L'immunité dans l'infection pesteuse. Acquisitions apportées par 30 années de travaux sur la souche de *Pasteurella pestis* (Girard et Robic). *Biol. Med. (Paris)*. 1963; 52(6):631–731.

13. Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Морозова И.В. Способ выделения ингибитора секреции сидерофоров, синтезируемого *pgm*-штаммами *Y. pestis*, и выделенный ингибитор. Патент на изобретение РФ № 2549712, опубл. 27.04.2015. Бюл. № 12.

14. 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.

15. Motin V.L., Georgescu A.M., Fitch J.P., Gu P.P., Nelson D.O., Mabery S.L., Garnham J.B., Sokhansanj B.A., Ott L.L., Coleman M.A., Elliott J.M., Kegelmeyer L.M., Wyrobek A.J., Slezak T.R., Brubaker R.R., Garcia E. Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2004; 186(18):6298–305. DOI: 10.1128/JB.186.18.6298-6305.2004.

16. Chauvaux S., Rosso M.L., Frangeul L., Lacroix C., Labarre L., Schiavo A., Marceau M., Dillies M.A., Foulon J., Coppée J.Y., Médigue C., Simonet M., Carniel E. Transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in human plasma: an approach for discovering bacterial genes involved in septicemic plague. *Microbiology (Reading)*. 2007; 153(Pt. 9):3112–23. DOI: 10.1099/mic.0.2007/006213-0.

17. Lucier T.S., Fetherston J.D., Brubaker R.R., Perry R.D. Iron uptake and iron-repressible polypeptides in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1996; 64(8):3023–31. DOI: 10.1128/iai.64.8.3023-3031.1996.

18. Eisendle M., Schrettl M., Kragl C., Müller D., Illmer P., Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 2006; 5(10):1596–603. DOI: 10.1128/EC.00057-06.

19. Peralta D.R., Adler C., Corbalán N.S., Paz García E.C., Pomares M.F., Vincent P.A. Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS One*. 2016; 11(6):e0157799. DOI: 10.1371/journal.pone.0157799.

References

1. Kontoghiorghes G.J., Kontoghiorghes C.N. Iron and chelation in biochemistry and medicine: new approaches to controlling iron metabolism and treating related diseases. *Cells*. 2020; 19(6):1456. DOI: 10.3390/cells9061456.

2. 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.

3. Johnstone T.C., Nolan E.M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans.* 2015; 44(14):6320–39. DOI: 10.1039/c4dt03559c.

4. Sia A.K., Allred B.E., Raymond K.N. Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 2013; 17(2):150–7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.014.

5. Holden V., Bachman M.A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*. 2015; 7(6):986–95. DOI: 10.1039/c4mt00333k.

6. 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.

7. 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*. *Biomaterials*. 2010; 23(2):275–94. DOI: 10.1007/s10534-009-9286-4.

8. 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.

9. Podladchikova O., Rykova V., Antonenka U., Rakin A. *Yersinia pestis* autoagglutination is mediated by Hcp-like protein and siderophore Yersiniachelin (Ych). *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:289–92. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_36.

10. Kuznetsova D.A., Podladchikova O.N. [Cloning and expression of *Yersinia pestis* yersiniachelin siderophore biosynthesis genes in *Escherichia coli* cells]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(1):36–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44.

11. Podladchikova O.N., Rykova V.A., Kuznetsova D.A. [Recombinant plasmid expressing cloned genes for biosynthesis of yersiniachelin siderophore of the plague pathogen, method for its production, and *Y. pestis* strain-superproducer of yersiniachelin]. RF Patent for an invention. 2018. No. 2670949, publ. October 25, 2018. Bull. No. 30.

12. Girard G. L'immunité dans l'infection pesteuse. Acquisitions apportées par 30 années de travaux sur la souche de *Pasteurella pestis* (Girard et Robic). *Biol. Med. (Paris)*. 1963; 52(6):631–731.

13. Podladchikova O.N., Rykova V.A., Morozova I.V. [A method for isolating an inhibitor of siderophore secretion synthesized by *pgm*-strains of *Y. pestis* and an isolated inhibitor]. RF Patent for an invention. No. 2549712, publ. April 27, 2015. Bull. No. 12.

14. 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.

15. Motin V.L., Georgescu A.M., Fitch J.P., Gu P.P., Nelson D.O., Mabery S.L., Garnham J.B., Sokhansanj B.A., Ott L.L., Coleman M.A., Elliott J.M., Kegelmeyer L.M., Wyrobek A.J., Slezak T.R., Brubaker R.R., Garcia E. Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2004; 186(18):6298–305. DOI: 10.1128/JB.186.18.6298-6305.2004.

16. Chauvaux S., Rosso M.L., Frangeul L., Lacroix C., Labarre L., Schiavo A., Marceau M., Dillies M.A., Foulon J., Coppée J.Y., Médigue C., Simonet M., Carniel E. Transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in human plasma: an approach for discovering bacterial genes involved in septicemic plague. *Microbiology (Reading)*. 2007; 153(Pt. 9):3112–23. DOI: 10.1099/mic.0.2007/006213-0.

17. Lucier T.S., Fetherston J.D., Brubaker R.R., Perry R.D. Iron uptake and iron-repressible polypeptides in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1996; 64(8):3023–31. DOI: 10.1128/iai.64.8.3023-3031.1996.

18. Eisendle M., Schrettl M., Kragl C., Müller D., Illmer P., Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 2006; 5(10):1596–603. DOI: 10.1128/EC.00057-06.

19. Peralta D.R., Adler C., Corbalán N.S., Paz García E.C., Pomares M.F., Vincent P.A. Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS One*. 2016; 11(6):e0157799. DOI: 10.1371/journal.pone.0157799.

Authors:

Kuznetsova D.A., 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., 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.