

УДК 616.9:577.114:615.373

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛУЧЕННОГО МЕТОДОМ МИНИ-Tn5 МУТАГЕНЕЗА ШТАММА *Yersinia pestis*, ДЕФЕКТНОГО ПО СИНТЕЗУ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА*

© 2019 Р.З. Шайхутдинова¹, С.А. Иванов¹, С.В. Дентовская^{1**},
Г.М. Титарева¹, Ю.А. Книрель²

¹ ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии,
142279 Оболенск, Московская обл., Россия;
электронная почта: dentovskaya@obolensk.org,
dentovskaya@yandex.ru

² Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: knirel@ioc.ac.ru,
yknirel@gmail.com

Поступила в редакцию 07.09.2018

После доработки 25.10.2018

Принята к публикации 25.10.2018

Для определения генов, продукты которых позволяют *Yersinia pestis* уклониться от действия антибиотиков катионно-пептидной природы, использовали стратегию ненаправленного инсерционного мутагенеза при помощи мини-транспозона Tn5 с последующим скринингом библиотеки, позволяющим обнаружить чувствительные к полимиксину Б мутанты. Для одного из них охарактеризована мутация, ответственная за полимиксин-чувствительный фенотип, и определена структура липополисахарида (ЛПС). В штамме *Y. pestis* KM218-A3 мини-Tn5 находился в начале открытой рамки считывания, продукт которой на 82% идентичен белку GmhB *E. coli*, выполняющему функцию D-глицеро-D-манно-гептозо-1,7-дифосфатфосфатазы. Масс-спектр ESI ICR FT с регистрацией анионов немодифицированного ЛПС штамма *Y. pestis* KM218-A3 позволил выявить молекулы с полным кором или неполным кором двух типов: один состоял только из дисахаридов Kdo-Kdo и Ko-Kdo, а другой – из трисахаридов Нер-(Kdo)-Kdo или Нер-(Ko)-Kdo. Проведенная комплементация подтвердила, что полученный дефект в биологических свойствах мутантного штамма являлся следствием инактивации гена *gmhB*. Продемонстрировано, что продукт гена *gmhB* необходим *Y. pestis* для образования «дикого» типа ЛПС, устойчивого к антимикробным пептидам и сыворотке крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Yersinia pestis*, липополисахарид, биосинтез гептозы, устойчивость к сыворотке, устойчивость к антимикробным пептидам.

DOI: 10.1134/S0320972519040079

Реализация патогенных свойств *Y. pestis* в организме восприимчивого хозяина требует присутствия у возбудителя чумы факторов патогенности различной функциональной направленности, обеспечивающих защиту от врожденного и приобретенного иммунитета макроорганизма. Система врожденного иммунитета, являясь эволюционно наиболее древней, действует немедленно после внедрения патогена, активируя фа-

гоцитоз и воспалительные реакции, огромная роль в реализации которых отводится системе комплемента, цитокинам, лизоциму, пропердину, лейкину и β-лизину, а также другим антимикробным агентам, в том числе, катионным пептидам. В процессе эволюции взаимоотношений микро- и макроорганизма у бактериальных патогенов, в частности, у патогенных иерсиний сформировались механизмы устойчивости к

Принятые сокращения: КОЕ – колониеобразующая единица, ЛПС – липополисахарид; ESI ICR FT – масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса высокого разрешения с Фурье-преобразованием и ионизацией электрораспылением; ПМБ – полимиксин Б; Glc – глюкоза; GlcNAc – N-ацетил-глюкозамин; Kdo – 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновая кислота; Ko – D-глицеро-D-тало-окт-2-улозоновая кислота; Aga4N – 4-амино-4-дезоксид-L-арабиноза, Нер – L-глицеро-D-манно-гептоза; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; КАМП – катионные антимикробные пептиды; НЧС – нормальная человеческая сыворотка; тНЧС – нормальная человеческая сыворотка с комплементом, инактивированным путем прогревания при температуре 56 °С в течение 30 мин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-261, 28.01.2019.

** Адресат для корреспонденции.

факторам врожденного иммунитета, что позволяет им выживать и размножаться в организме чувствительного хозяина [1–3]. Устойчивость к катионным антимикробным пептидам (КАМП), обнаруженным во многих тканях млекопитающих и насекомых [4–6], является важным фактором патогенности *Y. pestis*. [7, 8]. Настоящая публикация посвящена определению новых генов, продукты которых позволяют возбудителю чумы уклониться от бактерицидного действия антибиотиков катионно-пептидной природы. Для получения штаммов *Y. pestis*, чувствительных к одному из представителей таких антибиотиков – полимиксину Б (ПМБ), нами была выбрана стратегия ненаправленного инсерционного мутагенеза при помощи мини-транспозона Tn5.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и плазмиды. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) и их характеристика представлены в табл. 1.

Выращивание бактерий. Для мутагенеза штамм *Y. pestis* выращивали при температуре 25 °С в течение 48 ч на плотной питательной среде Brain heart infusion («HiMedia», Индия) [14] с добавлением гемолизированной крови до 2% (v/v) при рН 7,2. Штамм *Escherichia coli* S17-1 λ pir и его производные выращивали при температуре 37 °С в течение 24 ч в среде Лурия–Бертани [15] при рН 7,2. Для выделения липополисахаридов (ЛПС) штаммы *Y. pestis* выращивали при температуре 25 °С, как описано ранее [16].

Инсерционный мутагенез. Получение инсерционных мутантов проводили конъюгативным методом [17]. В качестве реципиента использовали штамм *Y. pestis* KM218, устойчивый к полимиксину Б, в качестве донора использовали штамм *E. coli* S17 λ pir, содержащий плазмиду pUTKm [11]. Контрselection конъюгантов *Y. pestis* вели на средах, содержащих генцианвиолет (1 : 100 000) (w/v) («ДИАЭМ», Россия) с добавлением канамицина (40 мкг/мл) или ампициллина (100 мкг/мл).

Генно-инженерные манипуляции. Выделение хромосомной ДНК бактерий и плазмидной ДНК проводили по рекомендациям производителя с использованием Genomic DNA Purification Kit и DNA Extraction Kit («Fermentas», Литва). Рестриктию и лигирование выполняли по стандартным методикам [15]. Трансформацию клеток *E. coli* проводили методом электропорации по методике, изложенной в руководстве Operating manual к прибору Electroporator 2510 («Eppendorf», Германия).

Секвенирование ДНК выполняли в ЗАО «Синтол», Россия. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы BLAST2 на сервере NCBI.

Комплементация. Для комплементации был сконструирован низкокопийный экспрессирующий вектор pAE-gfp. Для этого ген *gfp/asv*, включая SD-последовательность, из плазмиды pKK214GFP/ASV [18], клонировали в векторе pBluescript II SK (–) по сайтам рестрикции PstI и EcoRI. SmaI-SalI фрагмент полученной плазми-

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штаммы и плазмиды	Характеристика	Источник или ссылка
<i>Y. pestis</i> KM218	pFra ⁻ pCad ⁻ pPst ⁻ Δ pgm, производный вакцинного штамма EV линии НИИЭГ, авирулентный	РКПБ «Микроб»
<i>Y. pestis</i> KM218-A3	<i>gmhB</i> ::Tn5; получен из штамма KM218; Km ^R	НИ*
<i>Y. pestis</i> KM218-A3/pAE- <i>gmhB</i>	KM218-A3, комплементированный pAE- <i>gmhB</i>	НИ
<i>Y. pseudotuberculosis</i> EV11M	серотип O:3; pCad ⁻	ГКПМ-Оболенск
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	<i>thi pro hsdR-hsdM⁺recA</i> RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tp ^R Sm ^R)	[9]
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir/pUT Km	трансформант штамма S17-1 λ pir плазмидой pUT Km	НИ
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 (lacZYA-argF)U169</i>	[10]
pUT Km	<i>oriR6K bla tnp nptII</i>	[11] GenBank X06404
pUC19	<i>ori</i> pMB1 <i>bla LacZ</i> полилинкер	[12] GenBank L09137
pACYC184	<i>ori</i> pA15 <i>cat tet</i>	GenBank X06403
pAE-gfp	<i>ori</i> pA15 <i>cat SD-gfp/asv</i> , производное pACYC184	[13]
pAE- <i>gmhB</i>	производное pAE-gfp с <i>gmhB</i>	НИ

* НИ – настоящее исследование.

ды рBlu-gfp клонировали в плазмиду рАСУС184 по сайтам EcoRV-SalI. При конструировании плазмиды для комплементации ген *gfp/asv* из рAE-gfp [13] вырезали по сайтам рестрикции NdeI-SalI и заменяли на амплифицированную с помощью праймеров GmhBNdeI (5'-TTGATG-CATATGGTGAAGTCCGTT-3') и GmhBSalI (5'-CTTGTTCGACCTATTTATAACGCGC-3') («Синтол», Россия) кодирующую последовательность гена *gmhB*.

Выделение ЛПС и ДСН-ПААГ-электрофорез.

ЛПС выделяли из сухих бактериальных клеток смесью фенола, хлороформа и петролейного эфира [19] и очищали последовательным ферментативным расщеплением нуклеиновых кислот и белков с повторным ультрацентрифугированием (105 000 g, 4 ч) [16].

Для проведения скрининга полимиксин-чувствительных клонов ЛПС выделяли по методу Hitchcock и Brown [20]. ДСН-ПААГ-электрофорез проводили как описано ранее [21]. Для визуализации ЛПС гель окрашивали аммиачным раствором оксида серебра после окисления йодной кислотой в соответствии с рекомендациями Tsai и Frash [22].

Масс-спектрометрия. Установление строения компонентов ЛПС проводили методом масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса высокого разрешения с Фурье-преобразованием и ионизацией электрораспылением (ESI ICR FT). Съемку масс-спектров с регистрацией анионов проводили на приборе ApexII («Bruker Daltonics», США) как описано ранее [16].

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) полимиксина Б проводили по стандартной методике разведения в жидкой питательной среде [23].

Изучение взаимодействий *Y. pestis* с сывороткой.

Бактерицидные свойства сыворотки определяли по методу Barnes et al. [24] с небольшими модификациями. Жизнеспособность исследуемых штаммов после культивирования в нормальной человеческой сыворотке с интактным (НЧС) или инактивированным путем нагревания комплементом (тНЧС) определяли после высевов на плотную питательную среду.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение мини-Tn5 мутантов, чувствительных к полимиксину Б. Для определения генов, ответственных за устойчивость чумного микроба к ПМБ, применяли метод ненаправленного инсерционного мутагенеза, позволяющий получать большое количество мутантных клонов за счет встраивания в геном реципиентного штам-

ма мини-транспозона Tn5, содержащего маркерный ген *kan*. В качестве реципиента использовали бесплазмидный производный вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ – KM218, устойчивый к бактерицидному действию ПМБ и сыворотки крови. Структура ЛПС этого штамма определена нами ранее [16].

В целом, в пяти отдельных экспериментах по мутагенезу получили более 3000 клонов *Y. pestis* KM218 с внедренным в хромосому мини-транспозоном Tn5, среди которых выявлено 8 изолятов с фенотипом Pol^S. Полученные мутанты обозначили KM218-A3, KM218-7, KM218-7K, KM218-45K, KM218-457K, KM218-804K, KM218-2048K и KM218-3209K. МИК ПМБ для чувствительных мутантов оказались в 20–250 раз ниже, чем МИК для исходного штамма *Y. pestis* KM218 (табл. 2). Два из восьми выявленных клонов (KM218-457K и KM218-A3) проявляли чувствительность и к бактерицидной активности комплемента нормальной человеческой сыворотки. После 1 ч инкубации в НЧС количество колониеобразующих единиц (КОЕ) достоверно снижалось по сравнению с инкубацией в сыворотке с инактивированным путем нагревания комплементом. Штамм *Y. pseudotuberculosis* EV11M, коровая часть ЛПС которого по нашим данным практически полностью лишена остатков гептоз [16], обладал высокой чувствительностью к ПМБ и НЧС.

При анализе в ДСН-ПААГ обнаружили, что скорость миграции ЛПС шести чувствительных к ПМБ изолятов не отличалась от таковой для родительского штамма *Y. pestis* KM218. ЛПС мутантного штамма KM218-457K мигрировал с большей скоростью (данные не приводятся). ЛПС из мутантного штамма KM218-A3 формировал в полиакриламидном геле две полосы, одна из которых совпадала по скорости миграции с ЛПС исходного штамма KM218 (рис. 1), а вторая располагалась на уровне ЛПС, изолированного из штамма *Y. pseudotuberculosis* EV11M, кор которого, по нашим данным, полностью лишен остатков гептоз [16]. Структура ЛПС *Y. pestis* KM218-A3 и мутация, ответственная за данный фенотип, были в дальнейшем охарактеризованы.

Определение локализации мини-транспозона Tn5Km в штамме KM218-A3. Геномную ДНК, выделенную из мутанта KM218-A3, гидролизировали рестриктазами BamHI и BglII и лигировали с гидролизованной по сайту BamHI плазмидой рUC19. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5α и отбирали клоны, устойчивые к ампициллину (маркер плазмиды) и канамицину (маркер мини-Tn5). Плазмиды, выделенные из полученных клонов, содержали вставки размером около 1800

Таблица 2. Чувствительность штаммов иерсиний к ПМБ и НЧС

Штаммы <i>Y. pestis</i>	МИК ПМБ (мкг/мл)	Число живых бактерий (lg КОЕ /мл) после 1 ч инкубации в	
		НЧС	тНЧС
<i>Y. pestis</i> KM218	500	6,31 ± 0,62	6,44 ± 0,61
<i>Y. pestis</i> KM218-A3	31,25	2,35 ± 0,22	6,42 ± 0,59
<i>Y. pestis</i> KM218-7	15,625	5,63 ± 0,49	6,85 ± 0,58
<i>Y. pestis</i> KM218-7К	31,25	5,82 ± 0,52	6,08 ± 0,64
<i>Y. pestis</i> KM218-45К	31,25	6,22 ± 0,59	6,35 ± 0,62
<i>Y. pestis</i> KM218-457К	62,5	0,54 ± 0,04	5,92 ± 0
<i>Y. pestis</i> KM218-804К	15,625	5,93 ± 0,57	6,55 ± 0,62
<i>Y. pestis</i> KM218-2048К	7,8	6,32 ± 0,61	6,44 ± 0,61
<i>Y. pestis</i> KM218-3209К	31,25	6,24 ± 0,60	6,47 ± 0,64
<i>Y. pseudotuberculosis</i> EV11M	7,8	0,74 ± 0,06	5,85 ± 0,54

и 5000 п.н., представляющие собой последовательность ДНК *Y. pestis*, фланкирующую вставку мини-Tn5, и 900 п.н. ДНК мини-Tn5. Для определения нуклеотидной последовательности чумного микроба, расположенной в области внедрившегося транспозона, проводили сиквенс обеих цепей вставки ДНК. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности сравнили с банком данных NCBI (<https://www.ncbi>) с помощью программы BLAST2. Установили, что в штамме *Y. pestis* KM218-A3 мини-Tn5 находится в начале открытой рамки считывания *YPO1074* (NC_003143.1, 1216470..1217036). Продукт данного гена на 82% идентичен белку GmhB *E. coli* (WP_001608862.1), который выполняет функцию D-глицеро-D-манно-гептозо-1,7-дифосфатфосфатазы [25].

Комплементация Tn5-мутации в штамме *Y. pestis* KM218-A3. Для подтверждения того, что полученный дефект в биологических свойствах мутантного штамма является следствием инактивации соответствующего гена, интактный ген *gmhB* был клонирован в сконструированном экспрессирующем векторе pACYC-gfp. Полученную плазмиду pAE-*gmhB* вводили в штамм *Y. pestis* KM218-A3 методом электропорации. Выделенный из комплементированного штамма *Y. pestis* KM218-A3/pAE-*gmhB* препарат ЛПС обладал электрофоретическим профилем, подобным исходному штамму *Y. pestis* KM218, подтверждая, что клонированный ген *gmhB* успешно комплементировал созданную мутацию (рис. 1).

Структурная характеристика ЛПС штамма *Y. pestis* KM218-A3. Масс-спектр ESI ICR FT немодифицированного ЛПС, полученного из штамма KM218-A3, выращенного при 25 °C (рис. 2), содержал основной пик при m/z 3227,4670, соответствующий тетраацильной форме липида А с

двумя остатками 4-амино-4-дезоксид-арабинозы (Ara4N) и кору типа 1d со стехиометрическим содержанием N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) (рис. 2), который ранее был обнаружен нами в ЛПС «дикого» штамма KM218 [16]. Минорные компоненты соответствовали соединениям с

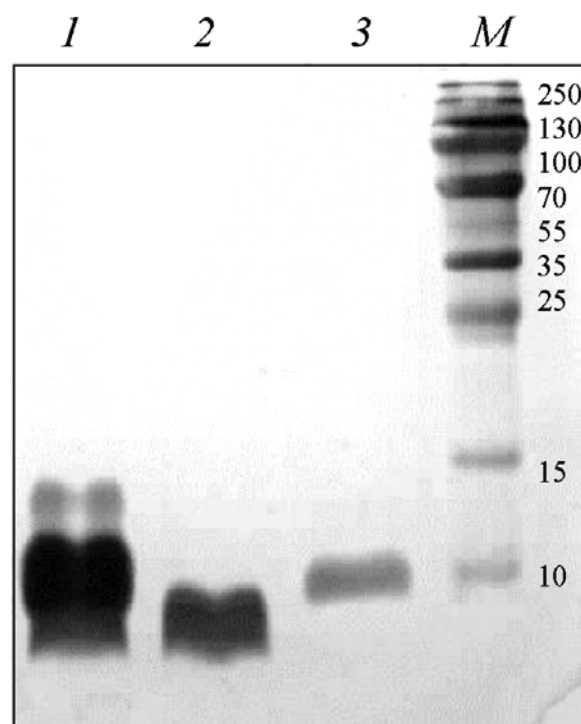


Рис. 1. ДСН-ПААГ препаратов ЛПС из штаммов *Y. pestis* KM218-A3, KM218-A3/pAE-*gmhB* и *Y. pseudotuberculosis* EV11M, выделенных микрометодом Hitchcock и Brown [17]. Дорожки: 1 – *Y. pestis* KM218-A3; 2 – *Y. pseudotuberculosis* EV11M; 3 – *Y. pestis* KM218-A3/pAE-*gmhB*; M – набор стандартных белков («Protein Molecular Weight Marker», Fermentas)

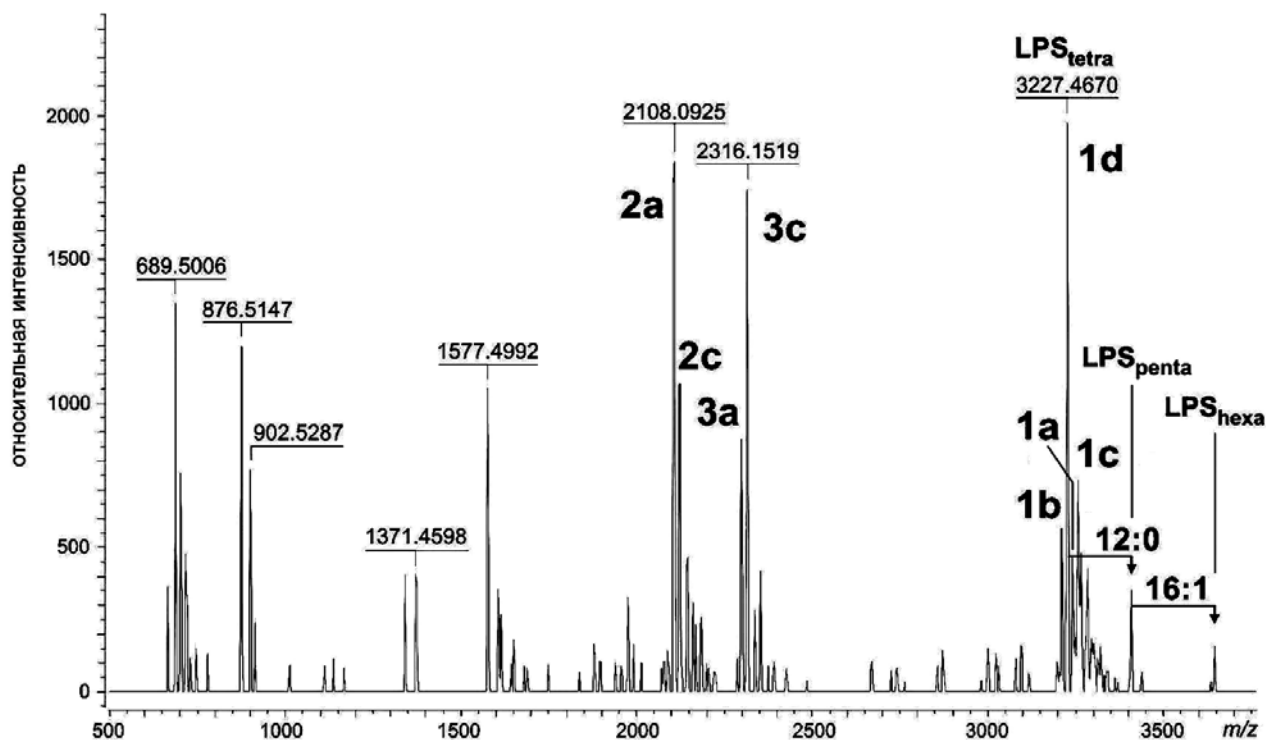
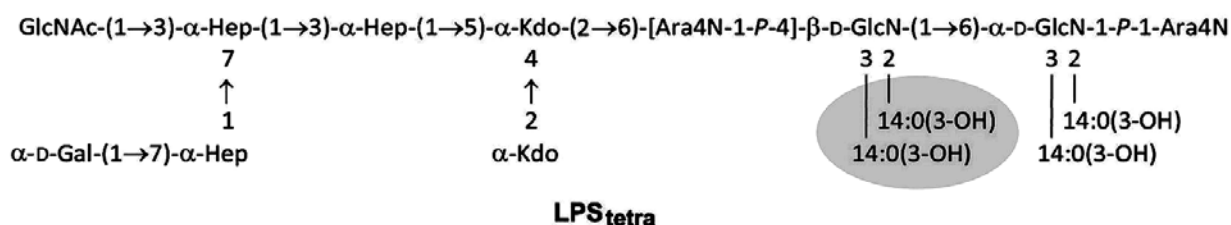
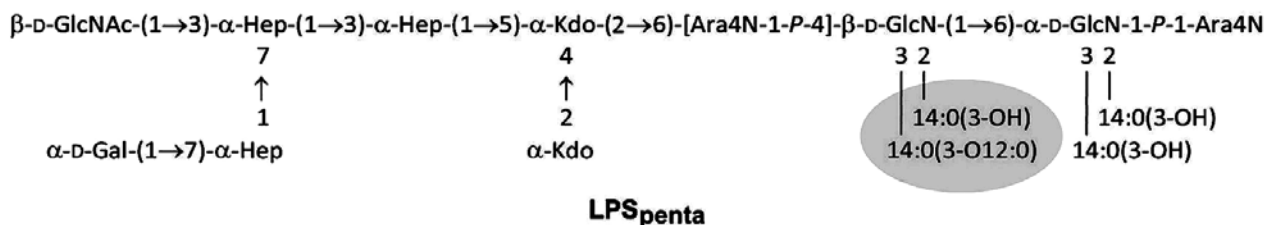
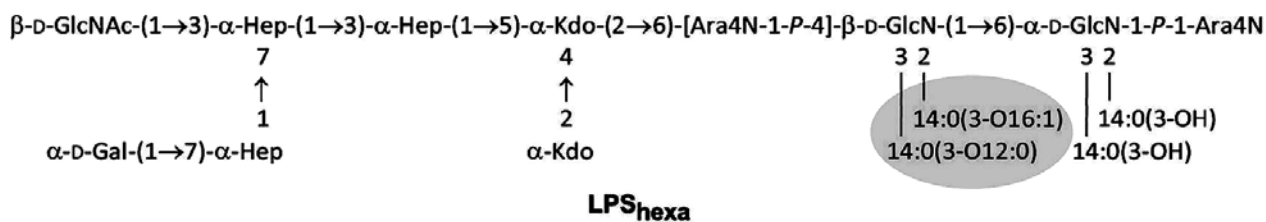


Рис. 2. Масс-спектр ESI ICR FT с регистрацией анионов немодифицированного ЛПС штамма *Y. pestis* KM218-A3, выращенного при температуре 25 °С. Над спектром приведены структуры гексаацильной (LPS_{hexa}), пентаацильной (LPS_{penta}) и тетраацильной (LPS_{tetra}) форм ЛПС. Ara4N – 4-амино-4-дезоксид-арабиноза, Hep – L-глицеро-D-манно-гептоза, Kdo – 3-дезоксид-D-манно-окт-2-улононовая кислота, 14:0(3-OH) – (R)-3-гидроксимиристиновая кислота, 14:0(3-O12:0) – (R)-3-лауроилоксимиристиновая кислота, 14:0(3-O16:1) – (R)-3-пальмитолеилоксимиристиновая кислота, P – фосфатная группа

Таблица 3. Типы олигосахаридов кора в мутантном штамме *Y. pestis* KM218-A3

Тип кора	Структура олигосахарида кора
1a	$\beta\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{4)}\text{---}$ $\beta\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{5)-Kdo}$ $\text{D-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{7)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{7)}\text{---} \quad \alpha\text{-Kdo-(2}\rightarrow\text{4)}\text{---}$
1b	$\beta\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{4)}\text{---}$ $\beta\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{5)-Kdo}$ $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{7)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{7)}\text{---} \quad \alpha\text{-Kdo-(2}\rightarrow\text{4)}\text{---}$
1c	$\beta\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{4)}\text{---}$ $\beta\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{5)-Kdo}$ $\text{D-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{7)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{7)}\text{---} \quad \alpha\text{-Ko-(2}\rightarrow\text{4)}\text{---}$
1d	$\beta\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{4)}\text{---}$ $\beta\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{3)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{5)-Kdo}$ $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{7)-L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{7)}\text{---} \quad \alpha\text{-Ko-(2}\rightarrow\text{4)}\text{---}$
2a	Kdo $\alpha\text{-Kdo-(2}\rightarrow\text{4)}\text{---}$
2c	Kdo $\alpha\text{-Ko-(2}\rightarrow\text{4)}\text{---}$
3a	$\text{L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{5)-Kdo}$ $\alpha\text{-Kdo-(2}\rightarrow\text{4)}\text{---}$
3c	$\text{L-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{5)-Kdo}$ $\alpha\text{-Ko-(2}\rightarrow\text{4)}\text{---}$

корами типов 1a–1c, отличающимся от 1d заменой D-глицеро-D-тало-окт-2-улозоновой кислоты (Ko) на 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновую кислоту (Kdo) и/или Gal на D-глицеро-D-манно-гептозу (DD-Hep) (табл. 3). Кроме того, они содержали один или оба дополнительных остатка жирных кислот C12 : 0 и C16 : 1 соответственно (рис. 2). Небольшое число молекул включало один остаток Aga4N в липиде А.

Масс-спектр ESI ICR FT выявил молекулы с неполным кором двух типов. Один из них был представлен дисахаридами Kdo-Kdo (2a, основная форма) и Ko-Kdo (2c, минорный компонент), а другой – трисахаридами Hep-(Kdo)-Kdo (3a, минорный компонент) и Hep-(Ko)-Kdo (3c, основная форма) (рис. 2).

Чувствительность штамма *Y. pestis* KM218-A3 к полимиксину Б. При ежедневных последовательных

пересевах исследуемого штамма KM218-A3 МИК полимиксина Б увеличивалась (31,25–125 мкг/мл), не достигая значения МИК для родительского штамма (рис. 3). При этом, несмотря на пере-seвы, штамм оставался чувствительным к бактерицидному действующему компоненту НЧС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Способность *Y. pestis* к внутриклеточному размножению и устойчивость к бактерицидному действию катионных антимикробных пептидов и компоненту сыворотки крови играют важную роль в патогенезе чумной инфекции [7, 26–30]. Установлено, что *Y. pestis* превосходит *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* по устойчивости к действию бактерицидных катионных

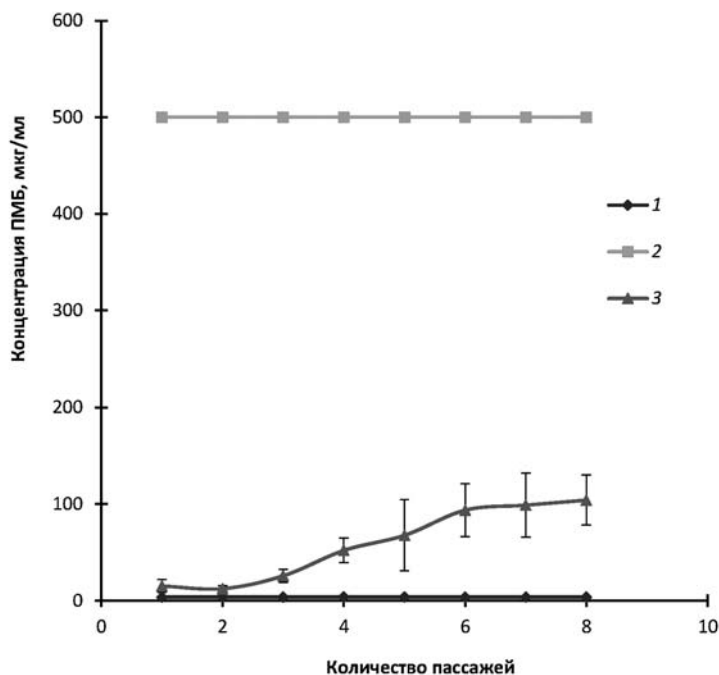


Рис. 3. Зависимость МИК ПМБ иерсиний от количества пересевов на плотной питательной среде. 1 – *Y. pseudotuberculosis* EV11M, 2 – *Y. pestis* KM218, 3 – *Y. pestis* KM218-A3

пептидов. Возрастание устойчивости коррелировало с увеличением степени редуцированности ЛПС. Полное отсутствие в структуре ЛПС *Y. pestis* отрицательно заряженных О-боковых полисахаридных цепей приводило к минимальной способности бактерий сорбировать катионные пептиды [31]. Наши данные подтверждают, что штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* KM218 высокоустойчив к ПМБ при температуре 25 °С [7]. В данном исследовании мы получили мутанты штамма *Y. pestis* KM218, чувствительные к ПМБ, и выявили один из генетических локусов, участвующих в обеспечении устойчивости к данному антимикробному агенту.

Ранее нами и другими исследователями было показано, что мутации, повреждающие структуру олигосахарида кора или липида А у представителей рода *Yersinia*, ведут к снижению устойчивости штаммов к ПМБ, β-дефензинам, кателицидинам и цекропинам [32–39]. Кроме того, было выявлено, что регион внутреннего кора ЛПС у возбудителя чумы, псевдотуберкулеза и некоторых других бактерий является рецептором бактериофагов, необходим для противостояния повреждающему действию комплемента сыворотки крови и устойчивости к опсонизации и захвату нейтрофилами [39–42]. В ходе выполнения настоящего исследования мы установили, что в чувствительном к ПМБ штамме *Y. pestis* KM218-A3 мини-Tn5 находится в начале открытой рамки считывания гена *YPO1074*

(NC_003143.1, 1216470..1217036), продукт которого оказался необходим и для устойчивости возбудителя чумы к комплементу сыворотки крови.

Функцию продукта гена *YPO1074* *Y. pestis* предположительно установили на основании гомологии, которая была определена с помощью поиска BLAST. Продукт открытой рамки считывания *YPO1074* *Y. pestis* оказался на 82% идентичен D-глицеро-D-манно-гептозо-1,7-дифосфатфосфатазе GmhB *E. coli* (ранее *YaeD*), которая участвует в превращении D-глицеро-D-манно-гептозо-1,7-дифосфата в D-глицеро-D-манно-гептозо-1-фосфат. Данная реакция является одним из этапов биосинтеза ADP- L-глицеро-D-манно-гептозы – субстрата для гептозилтрансфераз внутреннего отдела кора WaaC и WaaF у *E. coli* и других грамотрицательных микроорганизмов [25]. Путь биосинтеза ADP-L-глицеро-D-манно-гептозы и гены кишечной палочки, участвующие в этом биосинтезе, подробно описаны ранее [25, 43]. Таким образом, ген *YPO1074* идентифицировали как *gmhB* и назвали соответственно.

Согласно полученным данным, ЛПС штамма *Y. pestis* KM218 с мутацией в гене *gmhB* содержал несколько типов молекул олигосахарида кора: полноразмерные молекулы, характерные для исходного штамма KM218, и молекулы с кором, редуцированным до дисахарида (Kdo-Kdo или Ko-Kdo) и трисахарида (Hep-(Kdo)-Kdo или

Нер-(Ko)-Kdo). Кор, представленный дисахаридами из Kdo и Ko, был обнаружен нами ранее при определении структуры ЛПС лабораторного высокочувствительного к ПМБ штамма *Y. pseudotuberculosis* EV11M [16].

Kneidinger et al. [25] показали, что делеция в гене *gmhB* у штамма *E. coli* K-12 приводит к дефекту в биосинтезе кора ЛПС, при котором появляются как молекулы, лишенные остатков гептоз, так и содержащие их, что по мнению авторов отражает наличие частичной компенсации нарушенного синтеза ADP-L-глицеро-D-манногептозы. Они установили, что данная компенсация осуществляется за счет бифункционального белка HisB *E. coli*, который также проявляет гистидиноксигенфосфатазную активность. В случае с мутантом *Y. pestis* KM218-A3 различная степень редуцированности молекул кора ЛПС и обнаруженный незначительный рост устойчивости к ПМБ в процессе пересевов, вероятнее всего, также связаны с компенсаторными механизмами. Однако, несмотря на это, штамм продолжал оставаться чувствительным к ПМБ, не достигая значения МИК родительского высокоустойчивого штамма. Кроме того, вне зависимости от пересевов, штамм оставался чувствительным к НЧС.

Таким образом, исследование штамма *Y. pestis* KM218-A3, полученного методом ненаправленного инсерционного мутагенеза при помощи мини-транспозона Tn5, показало, что изменение гена *YPO1074*, продукт которого участвует в одном из этапов синтеза ADP-L-глицеро-D-манногептозы, нарушает синтез пентасахаридного фрагмента ЛПС, вызывая появление молекул ЛПС с укороченной коровой частью и приводя к уязвимости чумного микроба к бактерицидной активности нормальной сыворотки и полимиксина Б.

Ранее нами установлено, что нокаутные мутанты *Y. pestis* с двумя или менее моносахаридами в коре ЛПС не только чувствительны к КАМП и НЧС, но и являются авирулентными при подкожном заражении мышей и морских свинок. Этот факт подтверждает, что структура ЛПС играет ключевую роль в летальности при заболевании чумой, а ген *gmhB*, наряду с выявленными нами ранее генами *waaC*, *hldE* и *waaA* [39], или кодируемый им белок, может считаться потенциальным кандидатом на роль молекулярной мишени для специфических ингибиторов вирулентности *Y. pestis*.

Финансирование

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг.: «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Благодарности

Авторы благодарят Буко Линднера («Исследовательский центр Борстеля», Германия) за помощь в съемке масс-спектров.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П. (2002) Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных сообществ. Сообщение 1, *Молекул. генетика*, **3**, 3–23.
2. Анисимов А.П. (2002) Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных сообществ. Сообщение 2, *Молекул. генетика*, **4**, 3–11.
3. Portnoy, D.A. (2005) Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens, *Curr. Opin. Immunol.*, **17**, 25–28.
4. Boman, H.G. (2002) Our endogenous peptide antibiotics keep us healthy, *Lakartidningen*, **99**, 3424–3428.
5. Yoshio, H., Tollin, M., Gudmundsson, G.H., Lagercrantz, H., Jornvall, H., Marchini, G., and Agerberth, B. (2003) Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense, *Pediatr. Res.*, **53**, 211–216.
6. Dimopoulos, G. (2003) Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions, *Cell Microbiol.*, **5**, 3–14.
7. Anisimov, A.P., Dentovskaya, S.V., Titareva, G.M., Bakhteeva, I.V., Shaikhutdinova, R.Z., Balakhonov, S.V., Lindner, B., Kocharova, N.A., Senchenkova, S.N., Holst, O., Pier, G.B., and Knirel, Y.A. (2005) Intraspecies and temperature-dependent variation in susceptibility of *Yersinia pestis* to bactericidal action of serum and polymyxin B, *Infect. Immun.*, **73**, 7324–7331.
8. Rebeil, R., Ernst, R.K., Gowen, B.B., Miller, S.I., and Hinnebusch, B.J. (2004) Variation in lipid A structure pathogenic yersiniae, *Mol. Microbiol.*, **52**, 1363–1373.
9. Simon, R., Priefer, U., and Pulher, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria, *Biotechnology*, **1**, 784–791.

10. Woodcock, D., Crowther, P., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3469–3478.
11. Herrero, M., De Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria, *J. Bacteriol.*, **172**, 6557–6567.
12. Norrander, J., Kempe, T., and Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis, *Gene*, **26**, 101–106.
13. Дентовская С.В. (2012) Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость липополисахарида *Yersinia pestis*. Дисс. докт. мед. наук, МНИИЭМ, Москва.
14. Ajello, L., Georg, L., Kaplan, W., and Kaufman, L. (1963) *CDC Laboratory Manual for Medical Mycology*, PHS Publication No. 994, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
15. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.
16. Knirel, Y.A., Lindner, B., Vinogradov, E.V., Kocharova, N.A., Senchenkova, S.N., Shaikhutdinova, R.Z., Dentovskaya, S.V., Fursova, N.K., Bakhteeva, I.V., Titareva, G.M., Balakhonov, S.V., Holst, O., Gremyakova, T.A., Pier, G.B., and Anisimov, A.P. (2005) Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, *Biochemistry*, **45**, 1731–1743.
17. Кокушкин А.М. (1983) Трансформирующая активность плазмид чуждого микроба. Дисс. канд. мед. наук, РосНИПЧИ «Микроб» Саратов.
18. Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G., and Forsman, M. (2003) Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 600–606.
19. Galanos, C., Luderitz, O., and Westphal, O. (1969) A new method for the extraction of R lipopolysaccharides, *Eur. J. Biochem.*, **9**, 245–249.
20. Hitchcock, P.J., and Brown, T.M. (1983) Preparation of proteinase K-treated cell lysates for SDS-PAGE, *J. Bacteriol.*, **154**, 269–277.
21. Prior, J.L., Hitchen, P.G., Williamson, E.D., Reason, A.J., Morris, H.R., Dell, A., Wren, B.W., and Titball, R.W. (2001) Characterization of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, *Microb. Pathog.*, **30**, 49–57.
22. Tsai, C.M., and Frash, C.E. (1982) A sensitive silverstain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **119**, 115–119.
23. Hitchen, P.G., Prior, J.L., Oyston, P.C., Panico, M., Wren, B.W., Titball, R.W., Morris, H.R., and Dell, A. (2002) Structural characterization of lipo-oligosaccharide (LOS) from *Yersinia pestis*: regulation of LOS structure by the PhoPQ system, *Mol. Microbiol.*, **44**, 1637–1650.
24. Barnes, M.G., and Weiss, A.A. (2001) BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition, *Infect. Immun.*, **69**, 3067–3072.
25. Kneidinger, B., Marolda, C., Graninger, M., Zamyatina, A., McArthur, F., Kosma, P., Valvano, M.A., and Messner, P. (2002) Biosynthesis pathway of ADP-L-glycero-beta-D-mannoheptose in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **184**, 363–369.
26. Cavanaugh, D.C., and Randall, R. (1959) The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague, *J. Immunol.*, **83**, 348–371.
27. Janssen, W.A., and Surgalla, M.J. (1969) Plague bacillus: survival within host phagocytes, *Science*, **163**, 950–952.
28. Straley, S.C., and Harmon, P.A. (1984) Growth in mouse peritoneal macrophages of *Yersinia pestis* lacking established virulence determinants, *Infect. Immun.*, **45**, 649–654.
29. Charnetzky, W.T., and Shuford, W.W. (1985) Survival and growth of *Yersinia pestis* within macrophages and an effect of the loss of the 47-megadalton plasmid on growth in macrophages, *Infect. Immun.*, **47**, 234–241.
30. Pujol, C., Grabenstein, J.P., Perry, R.D., and Bliska, J.B. (2005) Replication of *Yersinia pestis* in interferon- γ -activated macrophages requires *ripA*, a gene encoded in the pigmentation locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12909–12914.
31. Bengoechea, J.A., Diaz, R., and Moriyon, I. (1996) Outer membrane differences between pathogenic and environmental *Yersinia enterocolitica* biogroups probed with hydrophobic permeants and polycationic peptides, *Infect. Immun.*, **64**, 4891–4899.
32. Ho, N., Kondakova, A.N., Knirel, Y.A., and Creuzenet, C. (2008) The biosynthesis and biological role of 6-deoxyheptose in the lipopolysaccharide O-antigen of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Mol. Microbiol.*, **68**, 424–447.
33. Felek, S., Muszynski, A., Carlson, R.W., Tsang, T.M., Hinnebusch, B.J., and Krukoni, E.S. (2010) Phosphoglucosyltransferase of *Yersinia pestis* is required for autoaggregation and polymyxin B resistance, *Infect. Immun.*, **78**, 1163–1175.
34. Aoyagi, K.L., Brooks, B.D., Bearden, S.W., Aoyagi, K.L., Brooks, B.D., Bearden, S.W., Monteneri, J.A., Gage, K.L., and Fisher, M.A. (2015) LPS modification promotes maintenance of *Yersinia pestis* in fleas, *Microbiology*, **161**, 628–638.
35. Guo, J., Nair, M.K., Galvan, E.M., Liu, S.L., and Schifferli, D.M. (2011) Tn5AraOut mutagenesis for the identification of *Yersinia pestis* genes involved in resistance towards cationic antimicrobial peptides, *Microbiol. Pathog.*, **51**, 121–132.
36. Klein, K.A., Fukuto, H.S., Pelletier, M., Romanov, G., Grabenstein, J.P., Palmer, L.E., Ernst, R., and Bliska, J.B. (2012) A transposon site hybridization screen identifies *galU* and *wecBC* as important for survival of *Yersinia pestis* in murine macrophages, *J. Bacteriol.*, **194**, 653–662.
37. Rebeil, R., Ernst, R.K., Jarrett, C.O., Adams, K.N., Miller, S.I., and Hinnebusch, B.J. (2006) Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation, *J. Bacteriol.*, **188**, 1381–1388.
38. Reines, M., Llobet, E., Llombart, C.M., Moranta, D., Perez-Gutierrez, C., and Bengoechea, J.A. (2012) Molecular basis of *Yersinia enterocolitica* temperature-dependent resistance to antimicrobial peptides, *J. Bacteriol.*, **194**, 3173–3188.
39. Dentovskaya, S.V., Anisimov, A.P., Kondakova, A.N., Lindner, B., Bystrova, O.V., Svetoch, T.E., Shaikhutdinova, R.Z., Ivanov, S.A., Bakhteeva, I.V., Titareva, G.M., and Knirel, A.Y. (2011) Functional characterization and biological significance of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide biosynthesis genes, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 808–822.
40. Kiljunen, S., Datta, N., Dentovskaya, S.V., Anisimov, A.P., Knirel, Y.A., Bengoechea, J.A., Holst, O., and Skurnik, M. (2011) Identification of the lipopolysaccharide core of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* as the receptor for bacteriophage μ A1122, *J. Bacteriol.*, **193**, 4963–4972.
41. Hong, W., Juneau, R.A., Pang, B., and Swords, W.E. (2009) Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes nontypeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model for otitis media, *J. Innate Immun.*, **1**, 215–224.
42. Langereis, J.D., and Weiser, J.N. (2014) Shielding of a lipooligosaccharide IgM epitope allows evasion of neu-

trophil mediated killing of an invasive strain of nontypeable *Haemophilus influenzae*, *mBio.*, **5**, e01478–14, <http://doi.org/10.1128/mBio.01478-14>.

43. Raetz, C.R.H., and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 635–700.

CHARACTERIZATION OF A TRANSPOSON Tn5-GENERATED MUTANT OF *Yersinia pestis* DEFECTIVE IN LIPOOLIGOSACCHARIDE BIOSYNTHESIS

R. Z. Shaikhutdinova¹, S. A. Ivanov¹, S. V. Dentovskaya^{1*},
G. M. Titareva¹, and Yu. A. Knirel²

¹ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,
142279 Obolensk, Moscow Region, Russia; E-mail: dentovskaya@obolensk.org,
dentovskaya@yandex.ru

² Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; E-mail: knirel@ioc.ac.ru, yknirel@gmail.com

Received September 7, 2018

Revised October 25, 2018

Accepted October 25, 2018

To identify *Yersinia pestis* genes involved in cationic antimicrobial peptides (CAMP)-resistance, libraries of KM218 minitransposon Tn5 mutants were screened for polymyxin B susceptible ones. The mutation responsible for polymyxin-sensitive phenotype and the lipopolysaccharide (LPS) structure of *Y. pestis* strain KM218-A3 were characterized. The mini-Tn5 was identified in the open reading frame, which product is homologous to the product of the *E. coli* *gmhB* gene (82% identity) performing the function of a D-D-heptose 1,7-diphosphate phosphatase. ESI FT-ICR mass spectrometry was used to study the structure of the unmodified LPS of *Y. pestis* KM218-A3. The molecules with the full-size-LPS core or with one of two types of partially truncated core ((i) including the disaccharide Kdo-Kdo or Ko-Kdo only, (ii) the trisaccharides Hep-(Kdo)-Hep or Kdo-(Ko)-Kdo) were identified with the ESI FT-ICR mass spectrometry. The performed complementation confirmed that the obtained defect in the biological properties of the mutant strain was the result of *gmhB* gene inactivation. These results indicate that the *gmhB* gene product of *Y. pestis* is essential for production of wild-type LPS, CAMP- and serum-resistant.

Keywords: *Yersinia pestis*, lipopolysaccharide, heptose biosynthesis, serum resistance, antibiotic resistance