

# Функциональные свойства сидерофора иерсиниахелина возбудителя чумы

Кузнецова Д.А., Подладчикова О.Н.

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
Ростов-на-Дону, Россия



## Актуальность работы

В настоящее время выявлены и охарактеризованы многие факторы вирулентности одного из наиболее патогенных видов бактерий - возбудителя чумы (*Yersinia pestis*). Однако наименее изучены факторы, определяющие начальную стадию инфекции. Известно, что способность бактерий противостоять защитным механизмам хозяина в начале инфекционного процесса зависит от способности ассимилировать железо с помощью низкомолекулярных хелаторов – сидерофоров. Анализ этих признанных факторов вирулентности у разных бактерий показал, что помимо обеспечения клеток железом, они выполняют множество других функций, важных для выживания микробов в организме хозяина. Многие высоко патогенные бактерии продуцируют несколько разных сидерофоров, однако у *Y. pestis* до наших исследований был известен только один сидерофор иерсиниабактин, широко распространенный среди патогенных энтеробактерий. В геномах *Y. pestis* выявлены гены биосинтеза и других сидерофоров, но сами сидерофоры не были изучены. Наши исследования свидетельствуют о том, что *Y. pestis* действительно синтезирует еще один сидерофор- иерсиниахелин (*Ych*), который кодируется хромосомным *usu* локусом.

## Цель

Выявление роли сидерофора иерсиниахелина в физиологии *Y. pestis* и реализации патогенных свойств возбудителя чумы.

## Материалы и методы

Анализ роли *Ych* в физиологии возбудителя чумы был проведен при сравнении штамма *Y. pestis* EV76 и его мутанта (EV76 *Ych*-), не продуцирующего *Ych* из-за делеции трех генов биосинтеза сидерофора (аналоги *uro*1530-1532). При этом у мутанта были сохранены транспортные гены, необходимые для поглощения бактериями нагруженного железом сидерофора *Ych*.

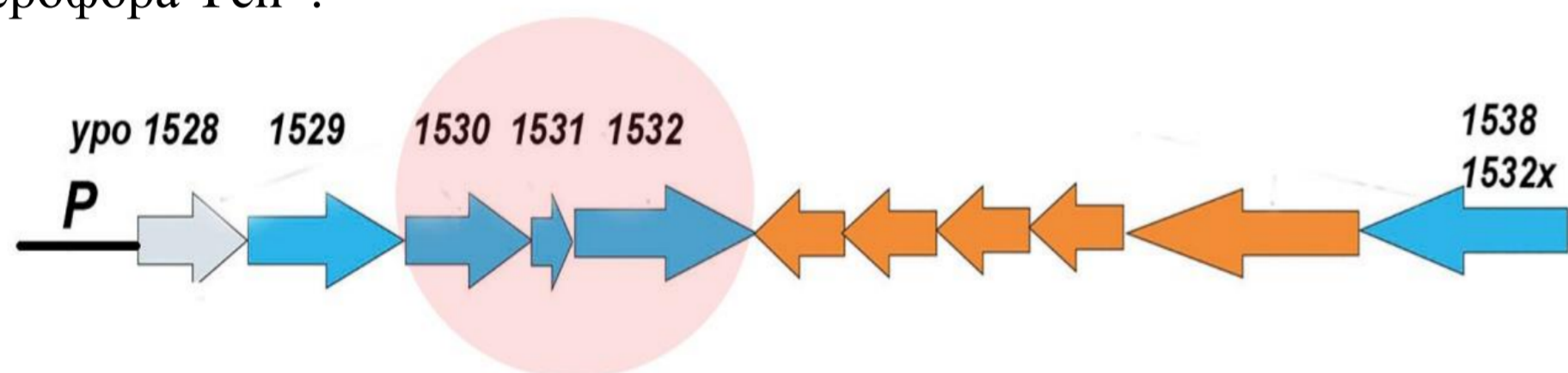


Рисунок 1 – Генетическая карта генов *usu* локуса *Y. pestis*.

А. Генетическая карта кластера генов, ответственных за биосинтез и транспорт *Ych*, в штамме *Y. pestis* CO92. Синим цветом обозначены гены, ответственные за биосинтез *Ych*, желтым цветом – за транспорт ферри-*Ych* в бактерии. Розовым выделены делетированные гены биосинтеза.

Скорость роста бактерий определяли в разных жидких питательных средах (LB, M9, M9+2-2'-дипиридил) по оптической плотности (OD) культур и по подсчету колониеобразующих единиц (КОЕ) после высева на среду LB. Антиоксидантную активность штаммов выявляли путем сравнения процента выживших бактерий каждого штамма в среде M9, содержащей перекись водорода в различных концентрациях. Оценка действия иерсиниахелина на организм животных была проведена при внутрибрюшинном и внутривенном заражении биопробных животных тремя вариантами штамма *Y. pestis* EV76: родительского штамма, его мутанта, не продуцирующего иерсиниахелин, и комплементированного мутанта, содержащего рекомбинантную плазмиду с генами биосинтеза иерсиниахелина.

## Выводы

Исследование функциональных свойств иерсиниахелина позволило заключить, что этот сидерофор может вносить определенный вклад в патогенез чумы, поскольку он обладает антиоксидантными свойствами, участвует в ассимиляции бактериями железа и стимулирует проницаемость сосудов, необходимую для диссеминации возбудителя чумы из первичных очагов инфекции.

## Результаты исследования

Экспрессия иерсиниахелина в штамме *E. coli*, не содержащем гены транспорта этого сидерофора, не обеспечивала ассимиляцию клетками железа, но способствовала защите бактерий от реактивных соединений кислорода. Сравнение свойств вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 и его мутанта, не продуцирующего иерсиниахелин, но содержащего гены его транспорта, позволило установить, что мутант значительно отставал от родительского штамма в росте в железodefицитных средах, что свидетельствует об участии иерсиниахелина в ассимиляции железа.

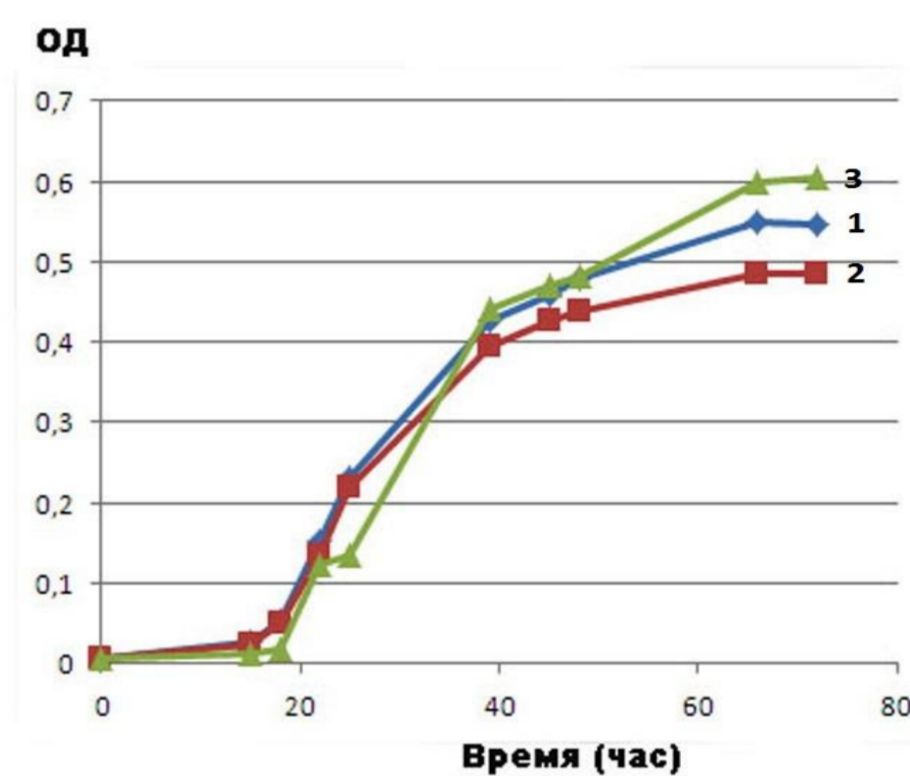


Рисунок 2 - Сравнительный анализ родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего *Ych* (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина (3). Кривые роста трех штаммов в среде M9, содержащей ампициллин (50 мкг/мл) и 50 мкМ 2-2'-дипиридила

Более того, мутант значительно отставал от родительского штамма при росте в условиях аэрации, а также обладал повышенной чувствительностью к действию перекиси водорода.

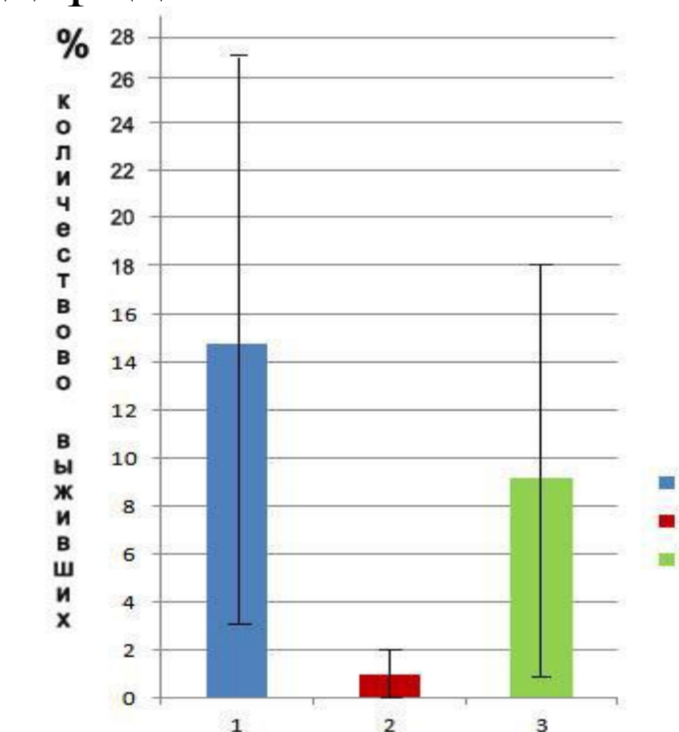


Рисунок 3 - Сравнительный анализ родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего *Ych* (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина (3). Чувствительность (процент выживших) трех штаммов к действию 0,005%-ной перекиси водорода.

При инфицировании животных мутант, в отличие от родительского штамма, не вызывал образование геморрагий в органах.

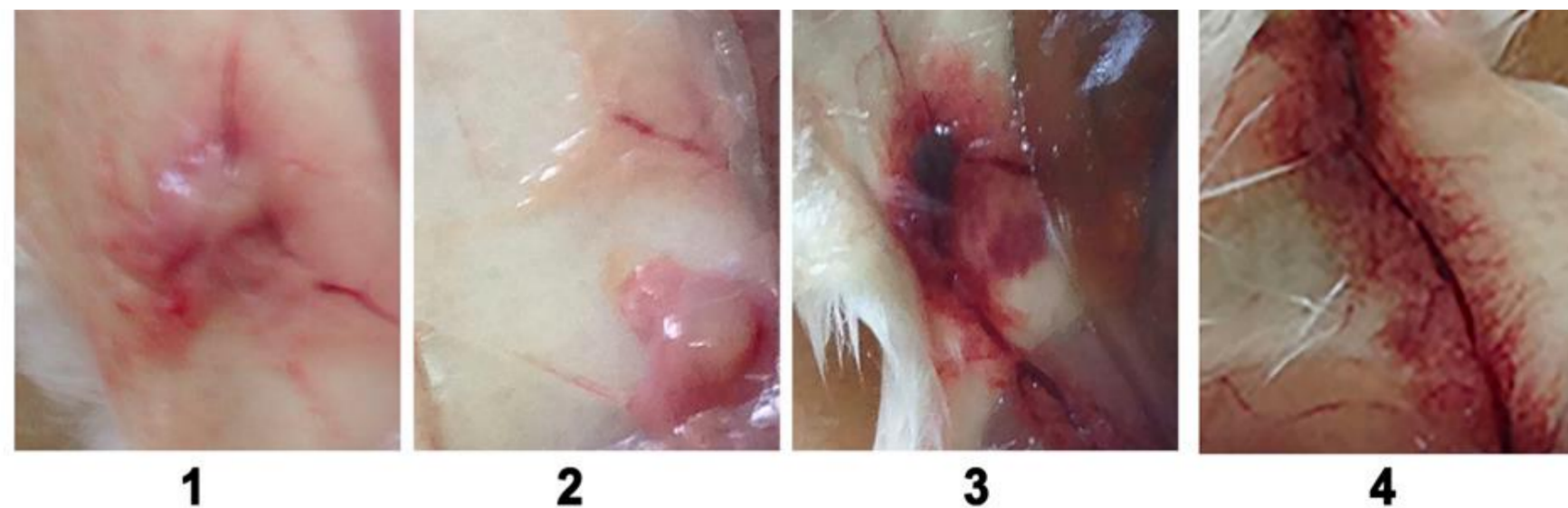


Рисунок 4 – Сравнительный анализ действия на мышей родительского штамма *Y. pestis* EV76 (1), его мутанта, не продуцирующего *Ych* (2), и мутанта, комплементированного рекомбинантной плазмидой, содержащей гены биосинтеза *Ych* (3, 4).

При этом комплементация мутанта рекомбинантной плазмидой, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина, приводила к восстановлению всех перечисленных свойств.