

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ НЕКРОТИЗИРУЮЩИЙ ФАКТОР *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, ВОЗБУДИТЕЛЯ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ СКАРЛАТИНОПОДОБНОЙ ЛИХОРАДКИ

Елена Викторовна ПЕРСИЯНОВА¹, Руслан Ренатович АДГАМОВ²,
Алексей Константинович СУРИН^{3,4}, Екатерина Константиновна ПСАРЁВА¹,
Светлана Александровна ЕРМОЛАЕВА², Нэлли Фёдоровна ТИМЧЕНКО¹

¹ ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1

² ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

³ ФГБУН Институт белка РАН
142290, г. Пущино, ул. Институтская, 4

⁴ ФГБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии Минздрава России
142279, пос. Оболенск

В статье представлены материалы по выделению и очистке цитотоксического некротизирующего фактора *Yersinia pseudotuberculosis*, его идентификации методом масс-спектрометрии, молекулярно-генетической характеристике двух доменов гена этого токсина, в том числе функционально значимого, в штаммах *Yersinia pseudotuberculosis*, изолированных от больных, мелких мышевидных грызунов и из окружающей среды в Российской Федерации.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, штамм, цитотоксический некротизирующий фактор, белок, ген.

В современных условиях бактериальные инфекции представляют глобальную проблему. Стало очевидным, что остановить процесс их распространения среди населения и существенно повлиять на заболеваемость к настоящему времени не удалось. Более того, имеет место появление новых и возвращение старых инфекций. Ярким примером существования таких проблем служат возбудители чумы и псевдотуберкулеза (*Yersinia pestis* и *Y. pseudotuberculosis*). Это заставляет исследователей искать причины появления такой высокой агрессивности у возбудителей.

В середине XX столетия на Дальнем Востоке России (Приморский край) начали регистрироваться многочисленные вспышки ранее неизвестного заболевания, названного до выяснения его этиологии дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой (ДСЛ) [2]. Как обнаружено, возбудителем этого заболевания, протекающего с тяжелой клинической картиной и рецидивами, является *Y. pseudotuberculosis* [1]. Наблюдения позволили сформулировать положение, что ДСЛ – это острая инфекционная болезнь, характеризующаяся циклическим течением, инток-

Персиянова Е.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экологии патогенных бактерий,
t-mail: Helen-pers@yandex.ru

Адгамов Р.Р. – младший научный сотрудник лаборатории экологии возбудителей инфекций,
e-mail: bacter@yandex.ru

Сури́н А.К. – к.ф.-м.н., научный сотрудник лаборатории физики белка,
e-mail: alexey_surin@mail.ru

Псарёва Е.К. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенности бактерий,
e-mail: katehok_84@mail.ru

Ермолаева С.А. – д.м.н., проф., зав. лабораторией экологии возбудителей инфекций,
e-mail: sveta@ermolaeva.msk.su

Тимченко Н.Ф. – д.м.н., проф., зав. лабораторией молекулярных основ патогенности бактерий,
e-mail: ntimch@mail.ru

сикацией, лихорадкой, экзантемой и преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта, печени и суставов.

Возбудитель ДСЛ продуцирует факторы патогенности с инвазивной, антифагоцитарной и токсической функциями, кодируемыми хромосомными и плазмидными (*pYV*) генами [3]. В этой статье внимание сосредоточено на одном из недавно открытых белковых токсинов *Y. pseudotuberculosis* – цитотоксическом некротизирующем факторе (cytotoxic necrotizing factor, CNF) [9]. Авторы сообщили, что экстракты из *Y. pseudotuberculosis* индуцируют увеличение размеров и многоядерность клеток HEp-2, подобно цитотоксическому некротизирующему фактору *E. coli*. Активность препаратов не зависела от присутствия плазмиды вирулентности (*pYV*) и не ингибировалась антителами, способными нейтрализовать CNF1 *E. coli*. Также было выявлено, что нуклеотидная последовательность гена *cnfY. pseudotuberculosis* на 65,1 % идентична гену *cnfE. coli*.

В следующие 10 лет появились статьи, в которых были представлены материалы по изучению механизмов действия этого токсина иерсиний, его роли в вирулентности бактерий и в развитии патологического процесса при псевдотуберкулезе [5–8, 10]. Стало ясно, что CNF *Y. pseudotuberculosis* является белком молекулярной массой около 115 кДа [6]. Несмотря на достигнутые успехи в изучении CNF *Y. pseudotuberculosis*, остается много вопросов, на которые пока нет ответов. Прежде всего это касается возможной роли данного фактора патогенности в появлении нового клона *Y. pseudotuberculosis* – возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки [4].

В связи с новыми фактами в настоящее время актуально исследование названного фактора патогенности в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих в России, а также его вклада в развитие патологического процесса при псевдотуберкулезе.

Целью работы явился поиск в штаммах *Y. pseudotuberculosis* цитотоксического некротизирующего фактора, выделение и идентификация этого белка, исследование варибельности доменов гена *cnfY*, в том числе функционально значимого.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали 102 штамма *Y. pseudotuberculosis* (коллекция ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН), выделенные от больных людей, мелких мышевидных грызунов,

рыб, из внешней среды в различных регионах России за период 1967–2008 гг. Бактерии выращивали на питательном агаре при температуре +37 °С в течение 20–24 ч. Белок выделяли из *Y. pseudotuberculosis* (штамм 2517, III серовар, коллекция Института им. Л. Пастера, Франция), определяли его молекулярную массу [3].

Из окрашенного геля после электрофореза вырезали фрагмент, содержащий интересующий нас белок. Гель отмывали, высушивали на вакуумном концентраторе (Eppendorf 5301, Германия), добавляли раствор протеазы (трипсин) из расчета 1:100 и инкубировали 24 ч. Полученные в результате гидролиза белка пептиды экстрагировали из геля, смесь пептидов наносили на колонку с обращенной фазой, состыкованную с масс-спектрометром (LCQ Deca XP, Thermo Finnigan, Германия). Пептиды смывали градиентом ацетонитрила. Смываемые с колонки пептиды в автоматическом режиме поступали в масс-спектрометр для анализа методом tandemной масс-спектрометрии. В результате для каждого набора пептидов были получены величины их молекулярных масс и масс-спектры фрагментации ионов пептидов. Фрагментацию проводили столкновением с инертным газом (гелием). Данные анализировали с помощью поисковой программы Mascot (www.matrixscience.com).

Для амплификации и секвенирования фрагментов гена *cnfY* использовали две пары праймеров: 5'-GCA-GGT-GGG-AGC-AAC-AAA-GAT (*CnfF*) и 5'-CAG-GAG-CGA-ACA-ACT-AAA-TGG-AA (*CnfR*), 5'-TGC-ATC-GTC-AAT-AAA-AGG-AGT-GTT (*Cnf-1*) и 5'-AAT-TTT-GGT-TTT-ACT-GGT-GGT-TCA (*Cnf-2*). Программы ПЦР – для 1-го фрагмента гена *cnfY* (функционально-значимого домена) [5] и для 2-го фрагмента гена *cnfY* [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографическое выделение CNF *Y. pseudotuberculosis* включало в себя несколько этапов. На первом этапе фракцию белков, полученную из лизата клеток *Y. pseudotuberculosis*, после высаливания 50 % сульфатом аммония наносили на колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенную 10 мМ Tris-HCl буфером, pH 7,3. При элюции в линейном градиенте NaCl (от 0,0 до 0,5 М) фракции CNF обнаруживали в диапазоне концентрации хлорида натрия от 0,2 до 0,5 М. Электрофоретическое исследование этих фракций выявило наличие более 20 белковых компонентов.

Второй этап очистки CNF проведен на колонке с анионитом Mono Q, уравновешенной

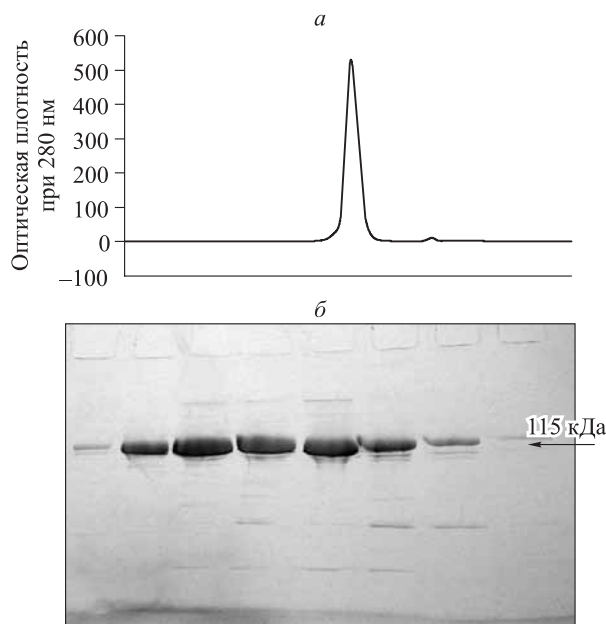


Рис. 1. Хроматографическое выделение белка CNF *Y. pseudotuberculosis* с помощью высокоэффективной гельфильтрации на колонке Superose 6. *a* – профиль элюции препарата; *б* – электрофореграмма фракций элюируемого пика

буфером 20 мМ Tris-HCl, pH 7,6. Элюируемый в середине линейного градиента NaCl (от 0,0 до 0,6 М) преобладающий пик содержал CNFY с примесью других белков. Окончательную очистку осуществляли на колонке Superose 6. Буфер содержал 20 мМ Tris-HCl, 0,1 М NaCl, pH 7,6. В результате высокоэффективной гельфильтрации элюируемый (в течение 80 минут) CNF вышел одним симметричным пиком с 34 по 45 минут, а SDS-электрофорез выделенных фракций показал наличие 4–6 минорных белковых компонентов и одного мажорного белка молекулярной массой около 110–115 кДа (рис. 1). Таким образом, нами был получен препарат для дальнейшего исследования его методом tandemной масс-спектрометрии.

При идентификации мажорного белка установлено, что он является цитотоксическим некротизирующим фактором *Y. pseudotuberculosis* молекулярной массой 114479 Да. Как показано на рис. 2, столбец с правой стороны гистограммы соответствует степени достоверности идентификации белка (Protein score), рассчитанной для данного эксперимента. Степень достоверности свидетельствует о полном соответствии искомого белка цитотоксическому некротизирующему фактору, белку из *Y. pseudotuberculosis*.

На рис. 3 представлена последовательность узnanного белка. Курсивом обозначены пептиды, идентифицированные методом масс-

Mascot Search Results:
Database: NCBIInr 20110924 (15334873 sequences;
5258635425 residues)
Taxonomy: Bacteria (Eubacteria) (8877447 sequences)
Protein hits: cytotoxic necrotizing factor [*Yersinia pseudotuberculosis*]

Mascot Score Histogram:
Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 58 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

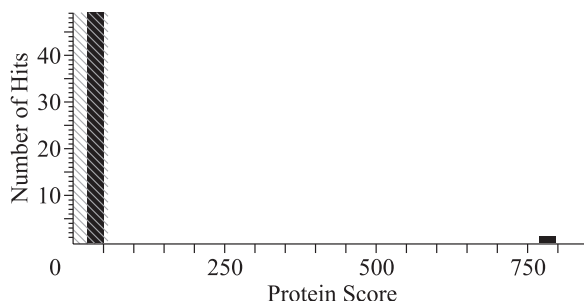


Рис. 2. Результаты поиска по базе белковых последовательностей для масс-спектров фрагментации ионов пептидов

спектрометрии. Для этих пептидов показано полное соответствие последовательностей, полученных из масс-спектрометрических экспериментов и последовательности белка.

В продолжение развития вопроса о CNF *Y. pseudotuberculosis* с помощью молекулярно-генетических методов исследованы штаммы, выделенные из разных источников и регионов Российской Федерации. Фрагмент гена, кодирующего функциональный домен изучаемого белка, амплифицирован в ПЦР, определена последова-

```

1 MKNQWQHGYF LSYSELVANF PSEKVVSDY IKHKFSTTLP WFGWADPDNL
51 YFIRFTQSRN NNSYTGWDH LGKYAIEITL LTQAAIVNIG SRFDIFDEAN
101 STAGIYKTNN ADSFDETNEA KMLPSEYLYF LRDCDFSNLY NKALS DYWAE
151 NYKFFSTLLQ NYISSAYYL YKDSAISKDE YEFSDAIFN KKSILRYFF
201 DVYGYSSDM FVAMNDNKT M LFIGPATNPF IFADNITDLR DKIKALISDK
251 NTRELFSKHF SLYDRQDGT YLGVNSMLEQ IVSGVVDYNY IMYSKNKIRE
301 RNVFGSMAPS TRERSFNDGD VLIKSNAEVQ RYALNLVLT ILSLSPIFDI
351 VLPEVSIPI S LGITASSVGI SFDELINGDT YEERRSAIPG LATNTVLLGI
401 SFAIPFLISK AEENKLIINN LVGSDENILN KNNLGDPLEK YNISESDIPE
451 NGSLVINLKN TNVPLVRLVKL NDEEGEIVAI KGSTLSGIYY EVDTEGYEI
501 LSRRVERTEY NEKIVYTRGG GLKGGQPFNF EGLDIPVYFI DKPYSELESS
551 VELSFVNDSS PLLFPEDMSR LPKPTPELDI KYYSSNLSSF KEDTVILMRG
601 TTEEEAWNIA NYKTAGGSNK DLEENFIEAG PQFNLSFSEY TSSINSADTA
651 SRKHFVLIK VQVKYISNDN VLYANHWAI P DEAPVEVLAV VDRRFIFPEP
701 PVKPKLSFTQ KIANRFLTEN VAEISSINFR RLNSGNINVL KGRGVFSSRR
751 LREIYLRFDA ANADELRPGD VYVVKTKFDS MGYDSHFYNE GIGINGAPTL
801 NTYTGEYVAD SSSQGATYWL KYNLTNETSI IKVSNARGA NGIKIALEEI
851 EENKPVVITS GLTGCTVVF ARKGEYFYAV HTGNSESLIG FTSTSGVAKA
901 IEVLSSELSEL EVPALPDVIN NNTLVEYLSL NFDALISYS SSSLKPNMSI
951 NISRENVSTF SYTTDDIQLP SFGTSVTILV RTNDNTVVRS LSESYTMNSN
1001 SSKMVFVNVL QKDF
    
```

Рис. 3. Последовательность cytotoxic necrotizing factor из *Y. pseudotuberculosis*. Курсивом выделены части последовательности, которые соответствуют полученным масс-спектрам фрагментации

тельность ампликона. Длина фрагмента гена *cnfY* составила 1041 пару нуклеотидов (п. н.).

При анализе последовательности гена *cnfY* у подавляющего большинства штаммов выявлена делеция фрагмента, кодирующего функциональный Rho-домен, вовлекаемый непосредственно в белок-белок взаимодействие с Rho GTF-зами. Сайт делеции размером 946 п.н. картирован. Полноразмерная копия гена *cnfY* была выявлена только у двух штаммов из всей коллекции. Первый штамм выделен на Дальнем Востоке Российской Федерации (Приморский край) из смыва с капусты, являющейся одним из основных факторов передачи *Y. pseudotuberculosis* при ДСЛ, второй – коллекционный.

Результаты исследования второго фрагмента гена *cnfY* в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, изолированных из разных источников, в том числе и от больных ДСЛ, показали, что большинство изолятов (97,6 % – больные, 84,6 % – окружающая среда, 100 % – грызуны) имели делецию размером 300 пар нуклеотидов в исследуемом участке гена. Размер фрагмента гена этой группы изолятов составил 1800 п. н. Полноразмерная копия данного участка гена *cnfY* (2100 п. н.) выявлена у небольшого числа штаммов (2,4 % – больные, 15,4 % – окружающая среда, 0 % – грызуны).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из *Y. pseudotuberculosis* с помощью ионообменной и гельфильтрационной хроматографии, а также тандемной масс-спектрометрии выделен и идентифицирован цитотоксический некротизирующий фактор-белок молекулярной массой 114479 Дальтон.

При анализе последовательности *cnfY* гена *Y. pseudotuberculosis*, кодирующей функционально значимый Rho-домен в штаммах, изолированных от больных дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой людей, выявлена делеция фрагмента. Сайт делеции размером 931 п. н. картирован. Полноразмерная копия *cnfY* гена обнаружена только у двух из 30 исследованных штаммов.

У подавляющего числа исследованных штаммов *Y. pseudotuberculosis* обнаружена делеция во втором фрагменте гена *cnfY*. Сайт делеции размером 300 п. н.

Полученные данные позволяют поставить вопрос о роли цитотоксического некротизирующего фактора в вирулентности возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки,

и в патогенезе этой новой клинико-эпидемической формы псевдотуберкулеза, в гене которого имеют место несколько делеций, в том числе в функционально значимой области. Несомненно, результаты дальнейших исследований в названных направлениях позволят ответить на эти важные вопросы, касающиеся возбудителя псевдотуберкулеза.

Авторы благодарят сотрудников Института белка РАН Нину Владимировну Котову и Виктора Викторовича Марченкова за оказанную помощь при проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Знаменский В.А., Вишняков А.К. Этиология дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки // Журн. микробиол. 1967. (2). 125–130.
2. Сомов Г.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка. М.: Медицина, 1979. 183 с.
3. Тимченко Н.Ф., Ермолаева С.А., Адгамов Р.Р. и др. Возбудитель дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (псевдотуберкулеза человека) – клон *Yersinia pseudotuberculosis* // Мат. III Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. СПб., 2011. 109–110.
4. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток: Приморский полиграфкомбинат, 2004. 220 с.
5. Timchenko N.F., Adgamov R.R., Ermolaeva S.A. Variability in the functional domains of the Rho-modifying toxins of *Yersinia pseudotuberculosis* // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. 954. 261–266.
6. Blumenthal B., Hoffmann C., Aktories K. et al. The cytotoxic necrotizing factors from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Escherichia coli* bind to different cellular receptors but take the same route to the cytosol // Infect. Immun. 2007. 75. 3344–3353.
7. Hoffmann C., Pop M., Leemhuis J. et al. The *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA // J. Biol. Chem. 2004. 279. 16026–16032.
8. Knust Z., Schmidt G. Cytotoxic necrotizing factors (CNFs)-a growing toxin family // Toxins. 2010. 2. (1). 116–127.
9. Lockman H.A., Gillespie R.A., Baker B.D., Shakhnovich E. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor // Infect. Immun. 2002. 70. 2708–2714.
10. Worsham P.L., Mou S., Cote C.K., Fritz D. Virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in Aerosol Model // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. 954. 217–222.

CYTOTOXIC NECROTIZING FACTOR OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, PATHOGEN OF FAR EASTERN SCARLET-LIKE FEVER

**Elena Viktorovna PERSIYANOVA¹, Ruslan Renatovich ADGAMOV²,
Aleksey Konstantinovich SURIN^{3,4}, Ekaterina Konstantinovna PSAREVA¹,
Svetlana Aleksandrovna ERMOLAEVA², Nelly Fedorovna TIMCHENKO¹**

¹ *FSBI «RI for Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov» of SB RAMS
690087, Vladivostok, Selskaya str., 1*

² *Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. N.F. Gamaleya
123098, Moscow, Gamaleya str., 18*

³ *Institute of Protein Research RAS
142290, Pushchino, Institutskaya str., 4*

⁴ *State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Minzdrav of Russia
142279, Moscow reg., Serpukhov district, village Obolensk*

The materials on isolation and purification of the cytotoxic necrotizing factor of *Y. pseudotuberculosis*, its identification by mass spectrometry, a molecular genetic characterization of two domains of its toxin gene, including functionally significant, in strains of bacteria isolated from patients, small rodents and the environment in the Russian Federation have been introduced in the article.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, strain, cytotoxic necrotizing factor, protein, gene.

Persiyanova E.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of ecology of pathogenic bacteria, e-mail: Helen-pers@yandex.ru

Adgamon R.R. – junior researcher of the laboratory of ecology of pathogens, e-mail: bacter@yandex.ru

Surin A.K. – candidate of physical- mathematical sciences, researcher of the laboratory of protein physics, e-mail: alexey_surin@mail.ru

Psareva E.K. – junior researcher of the laboratory molecular bases of pathogenicity of bacteria, e-mail: katehok_84@mail.ru

Ermolaeva S.A. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of ecology of pathogens, e-mail: sveta@ermolaeva.msk.su

Timchenko N.F. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory molecular bases of pathogenicity of bacteria, e-mail: ntimch@mail.ru