

## НАПРАВЛЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ СТРЕПТОКОККОВ

ДМИТРИЕВ А. В., РОЖДЕСТВЕНСКАЯ А. С., ЗУТКИС А. А.,  
академик РАМН ТОТОЛЯН А. А.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»,  
Санкт-Петербург

**Дмитриев А. В., Рождественская А. С., Зуткис А. А., Тотолян А. А.** Направленная регуляция патогенных свойств стрептококков // Мед. акад. журн. 2009. Т. 9. № 4. С. 50–58. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Для изучения направленной регуляции патогенных свойств стрептококков были выбраны следующие модельные системы: ДНК-связывающий белок-регулятор транскрипции *Sak189 S. agalactiae* и ДНК-связывающие белки-регуляторы транскрипции *MutR* и *Rgg S. pyogenes*. В работе методом инсерционного мутагенеза созданы штаммы, мутантные по генам *mutR*, *rgg* и *sak189*. Показано, что инактивация генов регуляторов транскрипции приводит к изменениям в кинетике роста штаммов, их способности утилизировать отдельные компоненты питательных сред и размножаться в обогащенных и «минимальных» средах. У трех штаммов *S. pyogenes* выявлены регулоны, контролируемые белком *Rgg*. Обнаружены различия в экспрессии поверхностных и секретиремых белков у мутантных штаммов по сравнению со штаммами дикого типа. Продемонстрировано, что инактивация генов *sak189*, *mutR* и *rgg* приводит к изменениям в патогенных свойствах стрептококков *in vitro* и *in vivo*.

**Ключевые слова:** патогенные стрептококки, регуляторы транскрипции *Rgg*, *MutR* и *Sak189*, микрочиповый анализ, вирулентность, модельная инфекция.

**Dmitriev A. V., Rozhdestvenskaya A. S., Zutkis A. A., Totolian A. A.** Targeted regulation of pathogenic properties in streptococci // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 4. P. 50–58. Institute of Experimental Medicine of the NorthWest Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Saint-Petersburg.

For the study of targeted regulation of pathogenic properties in streptococci, the following biological models were selected: DNA-binding regulatory protein *Sak189* of *S. agalactiae*, and DNA-binding regulatory proteins *MutR* and *Rgg* of *S. pyogenes*. The *mutR*, *rgg*, and *sak189* isogenic mutants were generated. It was shown that inactivation of transcriptional regulatory genes resulted in the changes in growth kinetics, an ability of the strains to utilize substrates and to grow in the rich and chemically defined media. The *Rgg*-regulons were identified in three *S. pyogenes* strains. The certain differences in the expression of surface and secreted virulence proteins were found in mutant strains compared to the parental strains. Finally, it was demonstrated that inactivation of *sak189*, *mutR*, and *rgg* genes affected pathogenic properties of streptococci *in vitro* and *in vivo*.

**Key words:** pathogenic streptococci, transcriptional regulators *Rgg*, *MutR*, and *Sak189*, microarray analysis, virulence, experimental infection.

## ВВЕДЕНИЕ

*Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae* являются возбудителями широкого спектра местных, генерализованных и системных заболеваний человека и обладают тропностью к большинству его органов и тканей [7, 10]. Кроме того, *S. agalactiae* является актуальным патогеном в ветеринарии, приводя к маститу крупного рогатого скота [16]. Большое количество заболеваний, вызываемых этими микроорганизмами, подразумевает их быструю способность адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. В частности, в ответ на изменения условий окружающей среды стрептококки изменяют уровни транскрипции генов, что отражается на изменении фенотипических свойств.

К настоящему времени у *S. pyogenes* обнаружено 13 двухкомпонентных регуляторных систем и 40 белков-регуляторов транскрипции, в том числе гло-

бальные регуляторы транскрипции (*Mga*, *Rgg*, белки семейства RALP) [17]. У *S. agalactiae* выявлено более 20 двухкомпонентных регуляторных систем и несколько глобальных белков-регуляторов транскрипции [12, 27, 28]. У обоих видов совместное действие регуляторных молекул приводит к образованию и функционированию регуляторной «сети».

ДНК-связывающие белки *MutR* и *Rgg S. pyogenes*, согласно базе данных [www.tigr.org](http://www.tigr.org), относятся к семейству TIGR01716 регуляторов транскрипции, обнаруженных у ряда грамположительных микроорганизмов. По данным компьютерного моделирования, эти белки содержат участок «спираль-поворот-спираль», за счет которого они взаимодействуют с промоторными областями генов, в том числе генов вирулентности, расположенных в различных участках генома, влияя на уровни их транскрипции. Некоторые белки данного семейства, такие, как *Rgg*



*S. gordonii*, MutR *S. mutans*, GadR *L. Lactis*, были частично охарактеризованы [20, 22, 26], тогда как белок MutR *S. pyogenes* по-прежнему остается за пределами внимания исследователей. Что касается белка Rgg *S. pyogenes*, то ранее был опубликован ряд данных о его влиянии на экспрессию эритрогенного токсина В (SpeB), являющегося фактором патогенности *S. pyogenes*, адаптацию к условиям стресса и способность утилизировать аминокислоты [3, 4, 5].

ДНК-связывающий белок Sak189 *S. agalactiae* входит в состав двухкомпонентной регуляторной системы Sak188/Sak189 [9, 28]. Гены этой двухкомпонентной системы, кодирующие гистидинкиназу (*sak188*) и ДНК-связывающий белок-регулятор (*sak189*), находятся в пределах обнаруженного нами «островка» патогенности размером 8992 п.н. Кроме генов *sak188* и *sak189* данный «островок» патогенности содержит ген *bac* и ряд генов гипотетических белков. Ранее было показано, что ген *bac* кодирует белок Вас, связывающий IgA человека, фактор Н системы комплемента [2, 13] и играющий существенную роль в вирулентности *S. agalactiae* [18]. Учитывая, что, кроме генов, расположенных в различных участках генома, двухкомпонентные системы часто регулируют смежно расположенные гены [3, 6, 21, 23-25], логично было предположить, что двухкомпонентная система Sak188/189 будет регулировать транскрипцию гена вирулентности *bac* и, возможно, ряда других генов.

Таким образом, целью данной работы явилось изучение роли ДНК-связывающих белков MutR и Rgg *S. pyogenes* и ДНК-связывающего белка Sak189 *S. agalactiae* в регуляции транскрипции генов, экспрессии факторов патогенности и проявлении стрептококками патогенных свойств.

## МЕТОДИКА

В работе были использованы штаммы *S. pyogenes* NZ131 (серотип M49), CS101 (M49), SF370 (M1), 5005 (M1) и штамм *S. agalactiae* 168/00. Штаммы выращивали в течение ночи при 37 °С в бульоне Todd-Hewitt Broth (HiMedia Laboratories, Индия) или на агаризованных средах, содержащих 5% бараньих эритроцитов.

Большинство рутинных генно-инженерных процедур (выделение хромосомной и плазмидных ДНК, рестрикция, электрофорез ДНК, клонирование и др.) осуществляли в соответствии с руководством [1]. Секвенирование ДНК проводили на секвенаторе ABI Prism 377 Perkin-Elmer Sequencer (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя.

В работе инактивировали гены *sak189* (*S. agalactiae*), *mutR* (*S. pyogenes*; штаммы SF370, NZ131) и

*rgg* (*S. pyogenes*; штаммы SF370, 5005, CS101). Для инактивации генов белков-регуляторов применяли метод инсерционного мутагенеза. С этой целью фрагменты соответствующих генов клонировали в вектор pVA891-2, содержащий ген устойчивости к эритромицину и неспособный к репликации в грамположительных кокках. Последующая электропорация стрептококков рекомбинантными плазмидами приводила к их интеграции в гены белков-регуляторов и к нарушению их функциональных активностей. Селекцию и культивирование мутантных штаммов осуществляли на питательных средах, содержащих эритромицин (2,5 мкг/мл). Нарушения открытых рамок считывания *rgg*, *mutR*, *sak189* контролировали методами ПЦР и секвенирования ДНК.

Динамику роста штаммов оценивали по изменению оптической плотности при длине волны 600 нм в обогащенной среде Todd-Hewitt Broth и в «минимальных» средах определенного состава [8], содержащих в качестве источников углерода глюкозу, фруктозу или сахарозу.

Экспрессию SpeB определяли по наличию зоны протеолиза вокруг колонии, посеянной уколом на агаризованную среду с добавлением 10% обезжиренного молока и выращенной в течение ночи согласно [15].

Для определения ДНКазной активности штаммы пересеивали уколом на агаризованную среду, содержащую метиленовый зеленый, и выращивали в течение ночи. Зона просветления вокруг колонии свидетельствовала о наличии у штамма секретируемых ДНКаз, об уровне экспрессии которых можно было судить по диаметру зоны просветления.

Анализ клеточных и секретируемых белков осуществляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и Western-блоттинга. Для приготовления лизатов осадки клеток суспендировали в физиологическом растворе, смешивали с равным объемом буферного раствора, содержащего 10% β-меркаптоэтанола, и кипятили в течение 10 мин. Секретируемые белки предварительно осаждали из культуральной жидкости добавлением 2-кратного объема охлажденного ацетона с последующим диализом осадка против физиологического раствора в течение ночи.

Полногеномные транскрипционные профили определяли для штаммов *S. pyogenes* дикого типа SF370, CS101, 5005 и их мутантов по гену *rgg* посредством микрочиповой технологии. С этой целью из 40 мл культур, выращенных до постлогарифмической фазы, выделяли тотальную РНК согласно протоколу RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США). Для микрочипового анализа использовали препараты фирмы «Affymetrix», созданные на основе полноразмерной пос-



ледовательности штамма SF370 [11]. Синтез кДНК и гибридизацию кДНК с микрочипами проводили согласно протоколу фирмы «Invitrogen». Различия в уровнях транскрипции генов у разных штаммов рассчитывали по программе ArrayStar (Nimblegen, США) как отношение интенсивностей сопоставимых ячеек микрочипов и двукратную (и более) разницу в экспрессии генов ( $P < 0,05$ ) принимали в качестве достоверно значимой.

Количественную ПЦР (ПЦР в режиме реального времени) с обратной транскриптазой проводили на оборудовании ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) с использованием набора Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Уровни транскрипции каждого из анализируемых генов нормализовали по отношению к уровням транскрипции гена *gyrA*.

Для оценки вирулентности изучаемых штаммов применяли внутрибрюшинное заражение лабораторных мышей и метод прямого бактерицидного теста. В качестве лабораторных животных использовали беспородных мышей (самцы, 10–12 нед, масса 14–16 г). Для моделирования стрептококковой инфекции штаммы выращивали при 37 °С в 40 мл бульона Todd-Hewitt Broth в течение ночи, клетки центрифугировали и отмывали физиологическим раствором. Отмытые клетки ресуспендировали в физиологическом растворе и готовили ряд 10-кратных разведений. Животным вводили внутрибрюшинно по 0,5 мл микробной суспензии с различными концентрациями возбудителя (в диапазоне от  $10^6$  до  $5 \times 10^8$  КОЕ/животное), в зависимости от использованного штамма. Для каждой конкретной дозы заражения использовали по 15 мышей. Наблюдение вели в течение 10 дней. Для подтверждения гибели животных от стрептококковой инфекции делали счетные высевы из селезенок. Достоверность результатов определяли с использованием критерия распределения Стьюдента.

Для проведения прямого бактерицидного теста ночную культуру *S. pyogenes* с концентрацией микроорганизмов  $3 \times 10^2$  КОЕ в 100 мкл физиологического раствора смешивали с 300 мкл цельной человеческой крови и инкубировали при 37 °С, встряхивая каждые 20 мин. Пробы отбирали каждый час в течение 6 ч. Количество жизнеспособных стрептококковых КОЕ определяли с помощью счетных высевов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Ростовые характеристики штаммов дикого типа и их мутантов.** В результате анализа кривых роста штаммов было установлено, что инактивация гена *sak189* приводила к незначительным изменени-

ям в динамике роста *S. agalactiae* во время логарифмической фазы роста, тогда как инактивация гена *mutR* существенно влияла на ростовые характеристики штаммов *S. pyogenes* SF370 и NZ131 на всех фазах роста (рис. 1А, 1Б). Кроме того, инактивация гена *rgg* у штамма *S. pyogenes* SF370 значительно влияла на динамику роста штамма SF370 как в обогащенной среде, так и в минимальных средах, содержащих в качестве единственных источников углерода глюкозу, фруктозу или сахарозу (рис. 1В, 1Г), но не оказала какого-либо влияния на рост штаммов 5005 и CS101 (данные не приведены).

**Влияние инактивации генов *sak189*, *mutR*, *rgg* на экспрессию поверхностных и секретуемых белков.** Сравнительный анализ штаммов дикого типа и мутантных штаммов выявил значительные различия в экспрессии ряда секретуемых и поверхностных белков, участвующих в формировании вирулентного фенотипа стрептококков. Так, например, экспрессия секретуемых нуклеаз оказалась значительно выше у штамма NZ131, мутантного по гену *mutR*, по сравнению с исходным штаммом (рис. 2). Инактивация гена *rgg* приводила к инактивации экспрессии эритрогенного токсина В (SpeB) у всех анализируемых штаммов *S. pyogenes* (данные не приведены).

Анализ штамма *S. pyogenes* SF370 и штамма, мутантного по гену *mutR*, с помощью SDS-PAGE показал различия в составе/количестве секретуемых белков. В частности, как видно из электрофореграммы (рис. 3А), только у мутантного штамма присутствует фрагмент размером 74 кДа. Кроме того, фрагмент размером 34 кДа присутствует у *mutR* мутантного штамма в гораздо большем количестве, чем у штамма SF370. Анализ фрагментов размерами 34 кДа у обоих штаммов методом масс-спектрометрии показал, что эти белковые бенды соответствуют белку Sic, причем количество его существенно выше у мутантного штамма, что подтверждает данные SDS-PAGE.

Анализ клеточных лизатов штамма *S. agalactiae* 168/00 и штамма, мутантного по гену *sak189*, с помощью SDS-PAGE и Western-блоттинга показал, что мутантный штамм не способен экспрессировать IgA-связывающий белок, белок Вас, и, соответственно, связывать IgA человека (рис. 3Б, 3В).

**Влияние ДНК-связывающих белков на транскрипцию генов.** Полногеномные транскрипционные профили были изучены для штаммов 5005, CS101, SF370 и их *rgg*-мутантов на постлогарифмической фазе роста. Сравнительный анализ показал, что инактивация гена *rgg* привела к изменению уровней транскрипции 3, 13 и 45 генов, соответственно (таблица). Сравнительный анализ транскрипционных



Изменения в уровнях транскрипции генов (двукратная разница и более) на постлогарифмической фазе роста культуры вследствие инактивации гена *rgg*

Sp у а	Ген	Кодируемый белок (функция)	Разница в уровнях транскрипции b		
			SF370	CS101	5005
<i>Гены, чьи уровни транскрипции выше у мутантного штамма по гену rgg</i>					
25		фосфорибозилформилглицинамидинсинтаза II	6	–	–
26	<i>purF</i>	фосфорибозилпирофосфатамидотрансфераза	5	–	–
27	<i>purM</i>	фосфорибозилформилглицинамидциклолигаза	6	–	–
28	<i>purN</i>	фосфорибозилглицинамидформилтрансфераза	7	–	–
32	<i>purD</i>	фосфорибозиламинглицилинлигаза	3	–	–
34	<i>purK</i>	фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилаза II	4	–	–
35	<i>abiR</i>	предполагаемый белок устойчивости к фагам	2	–	–
36	<i>purB</i>	аденилсукцинатлиаза	2	–	–
37		гипотетический белок	3	–	–
39		тирозинфосфатаза	2	–	–
663		гипотетический белок	2	–	–
670		гипотетический белок	2	–	–
673		гипотетический белок	2	–	–
728		гипотетический белок	–	2	–
732		гипотетический белок	3	–	–
733		гипотетический белок	2	–	–
738	<i>sagA</i>	стрептолизин S	2	–	–
739	<i>sagB</i>	белок стрептолизин S-оперона	4	–	–
742		гипотетический белок	4	–	–
744		ABC транспортер	3	–	–
746		пермеаза транспортной системы типа ABC-2	3	–	–
1037	<i>ybbR</i>	гипотетический белок	–	3	–
1125		GTP пирофосфокиназа	–	3	–
1126		гипотетический белок	–	3	–
1154		гипотетический белок	–	2	–
1243	<i>pstC</i>	ABC транспортер	–	3	–
1267	<i>pcrA</i>	АТР-зависимая ДНК хеликаза	3	–	–
1326		гипотетический белок	–	2	–
1600		гиалуронидаза	2	–	–
1718		эстераза	2	–	–
1793		ABC транспортер	–	–	2
1815	<i>scrA</i>	специфичная в отношении сахарозы PTS пермеаза, II	2	–	–
1858	<i>pepXP</i>	X-Pro дипептидилпептидаза IV	–	3	–
1884		белок, сходный с эукариотическими белками	2	–	–
1916	<i>lacG</i>	фосфо-β-D-галактозидаза	2	–	–
2032		АТФ-связывающий транспортер	–	3	–
2107		оксидоредуктаза	2	–	–
2148	<i>mutS</i>	белок коррекции ДНК	2	–	–
<i>Гены, чьи уровни транскрипции ниже у мутантного штамма по гену rgg</i>					
246	<i>gnpA</i>	рибонуклеаза Р	–3	–	–
600		гипотетический белок	–4	–	–
609	<i>ftsW</i>	белок, участвующий в делении клеток	–2	–	–
627	<i>regR</i>	регулятор транскрипции (семейство LacI)	–2	2	–
1016		гипотетический белок	–3	–	–
1017		гипотетический белок	–3	–	–
1140	<i>tdk2</i>	тимидинкиназа	–3	–	–
1141	<i>prfA</i>	фактор I высвобождения пептидных цепочек	–2	–	–
1201	<i>ylxM</i>	ДНК-связывающий белок	–3	–	–
1202		регулятор транскрипции (семейство GntR)	–4	–	–
1210		гипотетический белок	–3	–	–
1233	<i>coaA</i>	пантотенаткиназа	–2	–	–
1632	<i>gmk</i>	гуанилаткиназа	–2	–	–
1741		гипотетический белок	–3	–	–
2037	<i>prsA</i>	пептидилпролизомераза	–	–11	–
2039	<i>speB</i>	эритрогенный токсин В	–37	–71	–35
2040		гипотетический белок	–146	–335	–69
2207	<i>trsA</i>	триптофантил-тРНК-синтетаза	–3	–	–

<sup>a</sup> Номера Sp у обозначают гены/открытые рамки считывания, согласно аннотации к геному штамма SF370 *S. pyogenes* [11].

<sup>b</sup> Изменения в уровнях транскрипции генов у *rgg* мутантных штаммов по отношению к исходным штаммам.



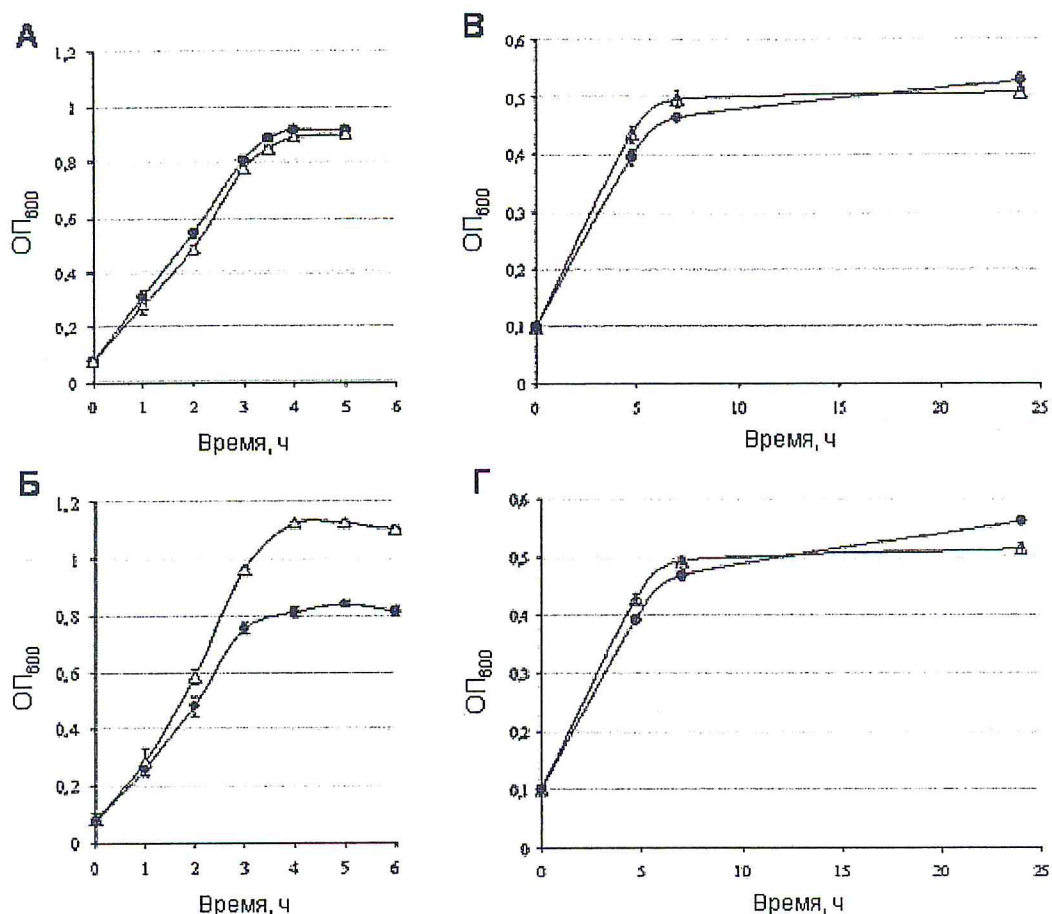


Рис. 1. Кривые роста штаммов дикого типа (●) и мутантных штаммов (Δ) при росте в обогащенной среде ТНВ (А, В) и в минимальных средах с добавлением 2% фруктозы (В) и 2% сахарозы (Г): А – штамм *S. agalactiae* 168/00 и штамм, мутантный по гену *sak189*; Б – штамм *S. pyogenes* SF370 и штамм, мутантный по гену *mutR*; В, Г – штамм *S. pyogenes* SF370 и штамм, мутантный по гену *rgg*

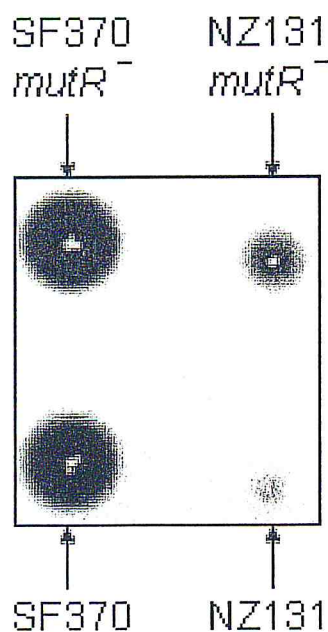


Рис. 2. ДНКазная активность штаммов *S. pyogenes*

профилей обнаружил, что транскрипция лишь двух генов (гена вирулентности *speB* и смежного с ним гена *spy2040*) регулировалась в одинаковой мере, а именно: репрессировалась, вследствие инактивации гена *rgg*, доказывая существование у *S. pyogenes* "core" Rgg-регулона. Большинство остальных генов регулировалось белком Rgg штаммоспецифическим образом и представляли собой «ub» Rgg-регулоны. Результаты микрочиповой технологии были подтверждены результатами ПЦР в режиме реального времени с коэффициентом корреляции  $R^2 = 0,94$ .

Анализ экспрессии гена вирулентности *bac* *S. agalactiae* методом ПЦР в режиме реального времени выявил, что инактивация гена белка-регулятора *sak189* приводила к 16-кратному уменьшению транскрипции гена *bac* (данные не приведены), доказывая регуляцию экспрессии белка *Bac* на уровне транскрипции.

**Изменение вирулентных свойств штаммов вследствие инактивации генов белков-регуляторов.** Инактивация гена *sak189* у штамма *S. agalactiae*

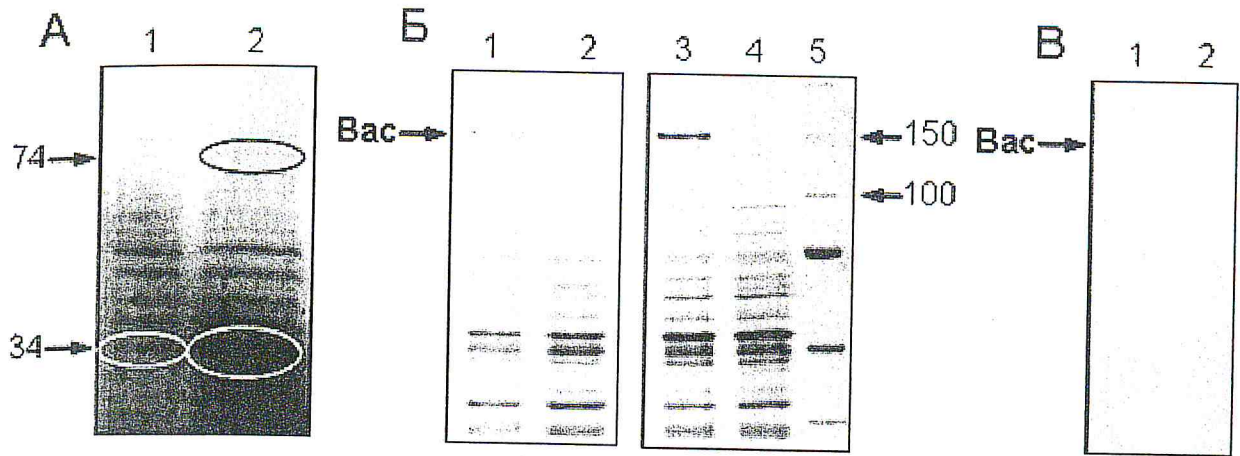


Рис. 3. Анализ белков с помощью SDS-PAGE (А, Б) и Western-блоттинга (В): А – секретируемые белки штамма *S. pyogenes* SF370 (дор. 1) и штамма, мутантного по гену *mutR* (дор. 2); Б – клеточные лизаты штамма *S. agalactiae* 168/00 (дор. 1 и 3) и штамма, мутантного по гену *sak189* (дор. 2 и 4), выращенных до середины логарифмической фазы роста (дор. 1 и 2) и постлогарифмической фазы роста (дор. 3 и 4). Маркер молекулярных весов приведен на дор. 5; В – Western-блоттинг клеточных лизатов штамма *S. agalactiae* 168/00 (дор. 1) и штамма, мутантного по гену *sak189* (дор. 2), с IgA человека

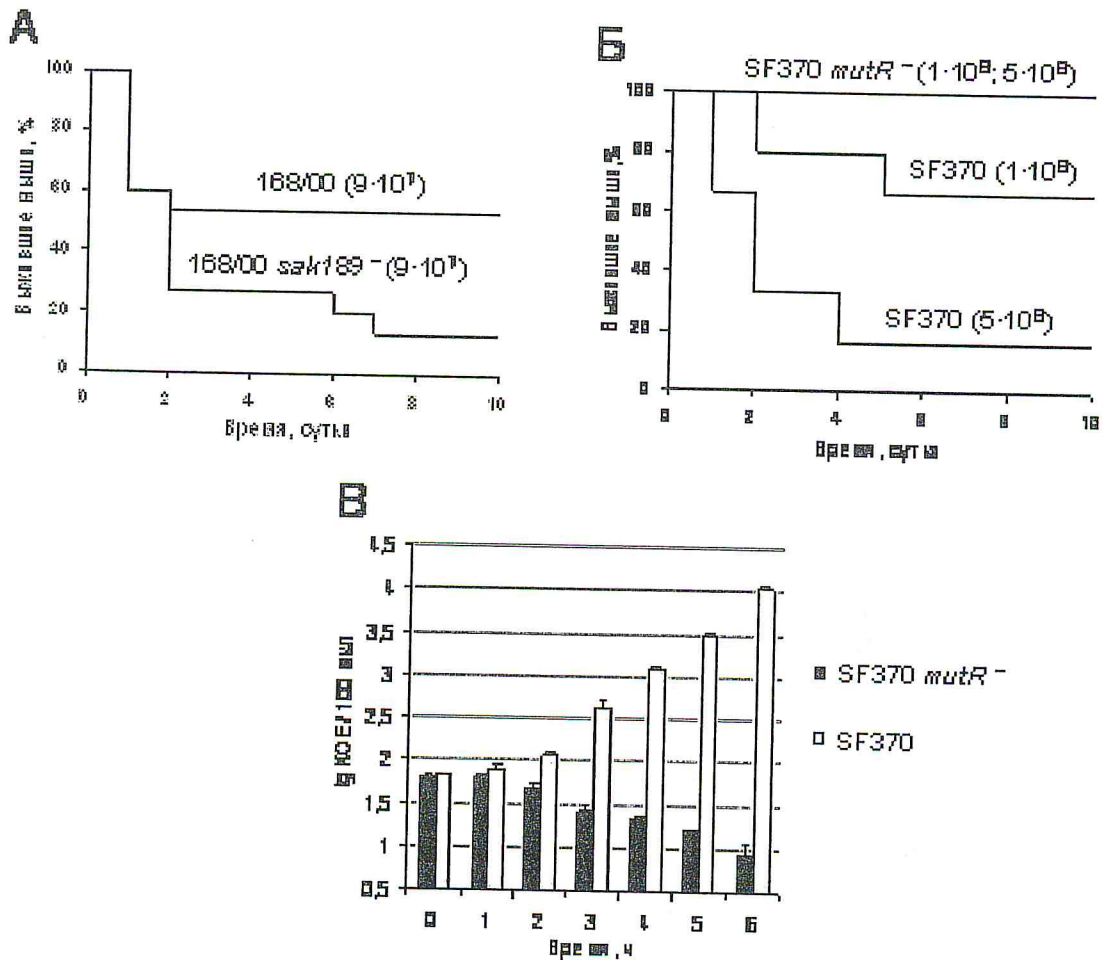


Рис. 4. Оценка вирулентных свойств стрептококков при моделировании внутрибрюшинной инфекции на лабораторных мышах (А – *S. agalactiae*, Б – *S. pyogenes*) и с помощью прямого бактерицидного теста (В – *S. pyogenes*). В скобках указана инфекционная доза (число колониеобразующих единиц, вводимых животному)



168/00 и гена *rgg* у штамма *S. pyogenes* NZ131 приводила к повышению вирулентности при моделировании внутрибрюшинной инфекции на лабораторных мышках. В частности, динамики гибели животных, зараженных штаммом *S. agalactiae* 168/00 и мутантным по гену *sak189* штаммом (рис. 4А), существенно различались ( $P = 0,0195$ ).

В то же время инактивация гена *mutR* у штамма *S. pyogenes* SF370 приводила к снижению вирулентных свойств при внутрибрюшинном заражении мышей при двух разных дозах заражения, а именно:  $1 \times 10^8$  КОЕ ( $P = 0,0159$ ) и  $5 \times 10^8$  КОЕ ( $P = 0,0003$ ). При этом штамм, мутантный по гену *mutR*, оказался авирулентным, не привел к гибели ни одного животного (рис. 4Б). Дополнительно в прямом бактерицидном тесте показано, что штамм SF370 в цельной человеческой крови не погибает и через 6 ч количество его КОЕ увеличивается в 170 раз по сравнению с инокулятом. В отличие от штамма SF370, у штамма, мутантного по гену *mutR*, значение числа КОЕ при инкубировании в цельной человеческой крови неуклонно снижалось (рис. 4В).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие стрептококков с организмом хозяина является сложным и многофакторным процессом. Способность стрептококков вызывать инфекционные процессы и поражать многие органы и ткани человека во многом определяется наличием факторов патогенности, способствующих адгезии микроба, его колонизации, проникновению в организм хозяина и уклонению от иммунного ответа. Не менее важна способность патогенных микроорганизмов быстро адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды и регулировать экспрессию генов, в том числе генов вирулентности. Вот почему изучение известных, а также обнаружение новых путей регуляции генов, участвующих в проявлении микроорганизмами патогенных свойств, а также поиски возможностей влияния на них является актуальной проблемой современной науки.

В настоящей работе были охарактеризованы белки-регуляторы MutR и Rgg *S. pyogenes* и белок Sak189 *S. agalactiae* с целью выявить общие закономерности влияния белков-регуляторов транскрипции на метаболизм и вирулентные свойства патогенных стрептококков.

Как продемонстрировано в настоящей работе, инактивация лишь одного гена (*mutR*, *rgg* или *sak189*) из почти 2000 генов, кодируемых геномом стрептококка [11, 19, 28], способна оказать существенное влияние на самые разные аспекты жизнедеятельности микроорганизма. Так, инактивация этих генов в

той или иной мере влияет на ростовые характеристики штаммов (продолжительность лаг-фазы, скорость размножения и роста во время логарифмической фазы, оптическая плотность культуры, при которой достигается стационарная фаза и др.) в обогащенных и «минимальных» средах.

Несомненно, что такие изменения обусловлены нарушением экспрессии ряда ферментов гликолиза и/или других метаболических путей. Тем не менее даже сравнительный анализ полногеномных транскрипционных профилей штамма SF370 и его мутанта по гену *rgg*, с использованием 2-кратной разницы в транскрипции генов в качестве пороговой, не позволил предположить, какие конкретно гены приводят к нарушениям в показателях кинетики. Однако эти данные позволяют заключить, что порой незначительные нарушения в транскрипции отдельных генов (отличающиеся менее, чем в 2 раза) могут оказывать существенное влияние на поведение стрептококков.

С использованием микрочиповой технологии и ПЦР в режиме реального времени показано, что регуляция экспрессии генов белками-регуляторами происходит в первую очередь на уровне транскрипции и находит свое отражение в экспрессии белков, в частности факторов патогенности. Действительно, инактивация каждого из трех проанализированных генов регуляторов транскрипции (*mutR*, *rgg*, *sak189*) влияет на экспрессию факторов патогенности стрептококков. Например, регулятор Rgg является активатором цистеиновой протеиназы SpeB; регулятор Sak189 является активатором белка Vac; регулятор MutR влияет на экспрессию белка Sic и секретиремых ДНКаз. Исходя из того, что перечисленные белки (SpeB, Vac, Sic, ДНКазы) являются факторами патогенности [7, 18], логично предположить, что инактивация белков-регуляторов MutR, Rgg, Sak189 может приводить к тем или иным изменениям вирулентных свойств штаммов. Эта гипотеза была подтверждена результатами экспериментов по моделированию стрептококковой инфекции на лабораторных мышках: в той или иной мере вирулентные свойства штаммов были затронуты вследствие инактивации генов *rgg*, *mutR* и *sak189*. Наибольшие нарушения вирулентности были обнаружены в результате инактивации гена *mutR*. Штамм, мутантный по этому гену, оказался авирулентным как в опытах стрептококковой инфекции на лабораторных животных *in vivo*, так и в прямом бактерицидном тесте по выживанию в цельной человеческой крови *in vitro*.

Следует отметить, что ряд фенотипических признаков стрептококков может контролироваться белками-регуляторами штаммоспецифическим образом, что находит свое подтверждение и в других



ристри-  
торость  
ческой  
оторой  
енных

влены  
иколи-  
Тем не  
омных  
0 и его  
ратной  
орого-  
кретно  
с кинет-  
ть, что  
ипции  
2 раза)  
едение

ологии  
но, что  
горами  
искрип-  
белков,  
тельно,  
ванных  
*sak189*)  
г стреп-  
я акти-  
улятор  
улятор  
етиру-  
ленные  
актора-  
ть, что  
*Sak189*  
м виру-  
ла под-  
делиро-  
торных  
войства  
ивации  
ния ви-  
инакти-  
му гену,  
ококко-  
*in vivo*,  
иванию

ческих  
оваться  
ким об-  
других

работках [6, 14, 21]. Например, ДНКазная активность *S. pyogenes* зависит от MutR в штамме NZ131, но не в штамме SF370, а кинетика роста зависит от Rgg в штамме SF370, но не в штаммах CS101 и 5005. Данные обстоятельства доказывают, что метаболические функции и проявление вирулентных свойств микроорганизмом контролируются сложной регуляторной «сетью», в которую вовлечено большое количество межмолекулярных взаимодействий, нередко штаммоспецифического характера.

Таким образом, на примере ДНК-связывающих белков MutR *S. pyogenes*, Rgg *S. pyogenes* и Sak189 *S. agalactiae* нами продемонстрирована возможность изменения патогенных свойств стрептококков путем воздействия на молекулярные механизмы регуляции транскрипции генов. В качестве дальнейших экспериментов в этой области представляется перспективным изучение каждого из генов белков-регуляторов с целью понимания их межмолекулярного взаимодействия в микробной клетке и в конечном счете с целью расшифровки «тонких» механизмов экспрессии патогенных свойств.

#### Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., 1984.
2. Areschoug T., Stalhammar-Carlemalm M., Karlsson I. et al. Streptococcal  $\beta$  protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. № 15. P. 12642–12648.
3. Chaussee M.S., Ajdic D., Ferretti J.J. The *rgg* gene of *Streptococcus pyogenes* positively influences extracellular SPE B production // *Infect. Immunol.* 1999. Vol. 67. № 4. P. 1715–1722.
4. Chaussee M.A., Callegari E.A., Chaussee M.S. Rgg regulates growth phase-dependent expression of proteins associated with secondary metabolism and stress in *Streptococcus pyogenes* // *J. Bacteriol.* 2004. Vol. 186. № 21. P. 7091–7099.
5. Chaussee M.S., Somerville G.A., Reitzer L. et al. Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes* // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185. № 20. P. 6016–6024.
6. Cummings C.A., Bootsma H.J., Relman D.A. et al. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS // *J. Bacteriol.* 2006. Vol. 188. № 5. P. 1775–1785.
7. Cunningham M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections // *Clin. Microbiol. Rev.* 2000. Vol. 13. № 3. P. 470–511.
8. Dmitriev A.V., McDowell E.J., Kappeler K.V. et al. The Rgg regulator of *Streptococcus pyogenes* influences the utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction, and expression of the NAD-glycohydrolase virulence operon // *J. Bacteriol.* 2006. Vol. 188. № 20. P. 7230–7241.
9. Dmitriev A., Yang Y.N., Shen A.D. et al. Adjacent location of *bac* gene and two-component regulatory system genes within the putative *Streptococcus agalactiae* pathogenicity island // *Folia Microbiol.* 2006. Vol. 51. № 3. P. 229–235.
10. Facklam R.R., Washington J.A. Streptococcus and related catalase-negative gram-positive cocci // *Manual of Clinical Microbiology* / edited by A. Balows [et al.]. American Society for Microbiology. 1991. P. 238–239.
11. Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. № 8. P. 4658–4663.
12. Glaser P., Rusniok C., Buchrieser C. et al. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease // *Mol. Microbiol.* 2002. Vol. 45. № 6. P. 1499–1513.
13. Heden, L.-O., Frithz E., Lindahl G. Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity // *Eur. J. Immunol.* 1991. Vol. 21. № 6. P. 1481–1490.
14. Hendriksen W.T., Silva N., Bootsma H.J. Regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* by response regulator 09 is strain dependent // *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189. № 4. P. 1382–1389.
15. Hynes W.L., Tagg J.R. A simple plate assay for detection of group A streptococcus proteinase // *J. Microbiol. Methods.* 1985. Vol. 4. P. 25–31.
16. Keefe G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review // *Can. Vet. J.* 1997. Vol. 38. P. 429–437.
17. Kreikemeyer B., McIver K.S., Podbielski A. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions // *Trends Microbiol.* 2003. Vol. 11. № 5. P. 224–232.
18. Lindahl G., Stalhammar-Carlemalm M., Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens // *Clin. Microbiol. Rev.* 2005. Vol. 18. № 1. P. 102–127.
19. McShan W.M., Ferretti J.J., Karasawa T. Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes* // *J. Bacteriol.* 2008. Vol. 190. № 23. P. 7773–7785.
20. Qi F., Chen P., Caufield P. W. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66. № 8. P. 3221–3229.
21. Ribardo D.A., McIver K.S. Defining the Mga regulon: comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A



- streptococcus // Mol. Microbiol. 2006. Vol. 62. № 2. P. 491–508.
22. Sanders J.W., Leenhouts K., Burghoorn J. et al. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 27. № 2. P. 299–310.
23. Sitkiewicz I., Musser J.M. Expression microarray and mouse virulence analysis of four conserved two-component gene regulatory systems in group A streptococcus // Infect. Immunol. 2006. Vol. 74. № 2. P. 1339–1351.
24. Skaugen M., Andersen E.L., Christie V.H. et al. Identification, characterization, and expression of a second, bicistronic, operon involved in the production of lactocin S in *Lactobacillus sakei* L45 // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. № 2. P. 720–727.
25. Standish A.J., Stroehner U.H., Paton J.C. The pneumococcal two-component signal transduction system RR/ HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms // J. Bacteriol. 2007. Vol. 189. № 15. P. 5591–5600.
26. Sulavik M.C., Tardif G., Clewell D.B. Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis // J. Bacteriol. 1992. Vol. 174. № 11. P. 3577–3586.
27. Tettelin H., Massignani V., Cieslewicz M.J. et al. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. № 19. P. 12391–12396.
28. Tettelin H., Massignani V., Cieslewicz M.J. et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial «pan-genome» // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. № 39. P. 13950–13955.