

А. В. Дмитриев

ПАТОГЕННЫЕ СТРЕПТОКОККИ: ОТ ГЕНОМА ДО ПРОТЕОМА



Санкт-Петербург
2012

Российская академия медицинских наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение
Северо-Западное отделение
Российской академии медицинских наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины»
Северо-Западного отделения
Российской академии медицинских наук

А.В. Дмитриев

Патогенные стрептококки: от генома до протеома

Актовая речь
на заседании Ученого совета
Научно-исследовательского института
экспериментальной медицины
21 декабря 2012 г.

Санкт-Петербург
2012

Достижения современной науки неразрывно связаны с быстрыми темпами развития технологий и совершенствованием методических подходов. Еще 60 лет назад исследователи-микробиологи не могли мечтать о тех знаниях и инструментах, которыми владеют сегодня даже студенты. В первой половине XX века исследования в области микробиологии базировались в основном лишь на изучении фенотипических свойств микроорганизмов, которые можно было определять микробиологическими или биохимическими тестами.

Значительный прорыв в биологии произошел после того, как 25 апреля 1953 года в журнале Nature была опубликована статья молодых ученых – биолога Джеймса Уотсона и физика Френсиса Крика «Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты». Публикация занимала чуть больше одной странички, и в ней был один простой рисунок – предложенная модель пространственной структуры ДНК в виде двойной спирали. Впоследствии в биологии стали делаться открытия одно за другим – открытие генетического кода, обнаружение взаимосвязанных процессов репликации, транскрипции и трансляции, выявление механизмов этих процессов и др. Стали появляться и прочно заняли свое положение в науке и терминологии слова «геномика», «транскриптомика», «протеомика», «метабомика» и др.

Вполне естественно, что усовершенствование существующих и разработка новых методов и подходов стали находить свое применение в исследовании микро- и макроорганизмов. В ногу со временем шел и Императорский Институт экспериментальной медицины. Стоит напомнить, что еще в 1890 г. главной задачей Института являлось изучение причин возникновения различных инфекционных заболеваний и разработка способов рациональной борьбы с ними. И по сей день изучение причин и механизмов формирования инфекционных патологий, а также методов их диагностики, профилактики и лечения являются одним из основных направлений деятельности Института, о чем сделана официальная запись в Государственном задании ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН на 2012 г.

В Институте сегодня наиболее активно изучаемыми возбудителями инфекционных заболеваний человека являются

патогенные стрептококки и вирусы гриппа. Стрептококки – основной объект исследований в отделе молекулярной микробиологии, созданном академиком РАМН А. А. Тотоляном и руководимым в настоящее время проф. А. Н. Суворовым

Патогенные и условно-патогенные стрептококки группы А (*Streptococcus pyogenes*), группы В (*Streptococcus agalactiae*), групп С и G (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus constellatus*), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans* и др. являются распространенными возбудителями широкого спектра местных, генерализованных и системных заболеваний человека и обладают тропностью к большинству его органов и тканей. В частности, в США ежегодно до 1,8 млн. человек переносят стрептококковый фарингит, что приводит к социально-экономическому ущербу более 100 млн. долларов. Во всем мире 700 тыс. чел. ежегодно страдают от инвазивных форм стрептококковых заболеваний, при которых смертность может достигать 50%. *S. pyogenes* вызывает тонзилло-фарингит, скарлатину, импетиго, флегмоны, артрит, пост-стрептококковые осложнения (ревматический эндокардит, гломерулонефрит), некротизирующий фасциит, синдром токсического шока и др. *S. agalactiae* вызывает мастит, абсцессы, офтальмит, пневмофронт, эндокардит и др. При этом *S. agalactiae* наиболее актуален в патологии беременности и постнатальной инвазивной заболеваемости, приводит к сепсису, пневмонии и менингиту новорожденных. *S. pneumoniae* является одним из основных возбудителей менингита, среднего отита, синусита, пневмонии у детей и взрослых. *S. mutans* играет ключевую роль в развитии кариеса у людей самых разных возрастных групп. *S. anginosus*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. constellatus* являются этиологическими агентами инфекционных заболеваний кожи и мягких тканей, слизистых верхних дыхательных путей и ЛОР органов, эпителия кишечника и полового тракта, могут приводить к таким заболеваниям, как эндокардит, менингит, синдром токсического шока и др.

В отдельных регионах России экономический ущерб от стрептококковых заболеваний превышает таковой от кишечных инфекций, вирусных гепатитов и вируса иммунодефицита человека, вместе взятых, но до недавнего времени в нашей

стране стрептококковым инфекциям не уделялось должного внимания. Причиной этого была и продолжает оставаться слабая лабораторно-диагностическая база и отсутствие нормативных документов по диагностике, профилактике и лечению. Именно поэтому изучение патогенных стрептококков и вызываемых ими заболеваний является одной из актуальных задач медицинской науки и практического здравоохранения.

Резюмируя приведенное выше, хочется отметить, что для эффективной борьбы с любой инфекционной патологией необходимо уметь выявлять и идентифицировать источник инфекции (клон-возбудитель), что представляет собой первоочередную задачу эпидемиологии, а также детально понимать, какие ресурсы и какие возможности использует этот возбудитель при действии на организм человека.

Молекулярно-эпидемиологические подходы для идентификации клонов-возбудителей заболеваний

Не случайно Актовая речь имеет в своем названии слова «... от генома до протеома». Всегда и во всем представляется логичным отталкиваться от первичного, а что, как не наследственная информация, кодируемая геномом, является исходной точкой для любого анализа? Первые последовательности геномов патогенных стрептококков стали доступны лишь в 2001–2002 гг. Но задолго до этого сотрудниками отдела молекулярной микробиологии проводились эксперименты по изучению плазмид и бактериофагов *S. pyogenes* – внехромосомных факторов генетической наследственности, по построению первых в мире рестрикционных карт *S. pyogenes* и *S. agalactiae* с точной локализацией на них известных генов вирулентности. В частности, впервые была обнаружена выраженная гетерогенность рестрикционных и генетических карт штаммов *S. agalactiae*. Штаммы эти отличались как наличием генов вирулентности, о чем пойдет речь в соответствующем разделе, так и размером генома. Например, размеры геномов *S. agalactiae*, выделенных от человека, варьировали от 2030 т.п.н. до 2290 т.п.н., а *S. agalactiae*, выделенных от животных – от 2190 т.п.н. до 2460 т.п.н. Эти и многие другие

предварительные данные легли в основу многочисленных молекулярно-эпидемиологических подходов, разработанных в отделе молекулярной микробиологии

Уже почти 80 лет иммунологический подход продолжает оставаться основным для идентификации и классификации всех видов патогенных и условно-патогенных стрептококков. Однако хорошо известно, что многочисленные подходы, основанные на серодиагностике, обладают невысокой чувствительностью и специфичностью. Кроме того, совершенно очевидно, что реальное количество эпидемически значимых штаммов (клонов) существенно превышает число известных фаго-, био-, эко-, рибо- и серотипов микроорганизмов.

По этой причине в последние два десятилетия начали активно разрабатываться методы молекулярной эпидемиологии. К сожалению, пока они еще крайне редко используются при изучении эпидемиологии стрептококковых инфекций. Одной из основных причин этого является тот факт, что сам выбор метода анализа не регламентирован, полностью зависит от опыта и возможностей экспериментатора, а условия проведения исследований часто не стандартизованы. Все это отрицательно сказывается на результатах анализов и точности диагностического заключения.

Исходя из этого, очевидно, что разработка стандартизованных молекулярных методов на основе знаний об организации генома стрептококков и использование их в целях эпидемиологии, актуальны не только для фундаментальной науки, но и для практического здравоохранения.

Именно поэтому нами были детально проанализированы особенности строения геномов различных видов стрептококков. Кроме того, было изучено большое количество штаммов каждого из исследуемых видов/подвидов стрептококков. На основании полученных данных выбраны видоспецифические области генома, и с учетом этого разработаны различные методы ПЦР-диагностики:

1) предложен подход для экспресс-идентификации *S. pyogenes* и *S. agalactiae* на основе различий в структуре генов *scpA* и *scpB*;

2) на основании полиморфизма гена *cpn60* у различных стрептококковых видов дифференцированы штаммы *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, *S. agalactiae* и *S. uberis*, вызывающие мастит у коров и часто выделяемые из коровьего молока (Рис. 1);

3) на основании последовательности гена декстраназы *dexA* предложен специфический подход для ПЦР-идентификации *S. mutans* в материале соскоба со спинки языка, наддесневого и поддесневого зубного налета;

4) на основании полиморфизма гена *cpn60* разработан подход, позволяющий дифференцировать *S. dysgalactiae subsp. equisimilis*, *S. constellatus* и *S. anginosus*;

5) адаптирован метод *in situ* детекции *S. pneumoniae* в биоптатах легких у детей, умерших от пневмонии.

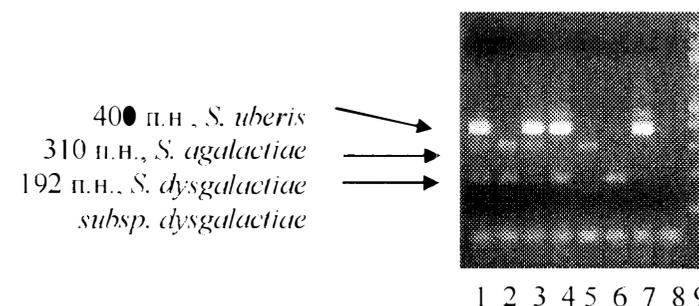


Рис. 1. Multiplex-ПЦР анализ препаратов, содержащих *S. agalactiae*, *S. uberis* и *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, с праймерами на ген *cpn60*.

Трек 1: препарат, содержащий ДНК *S. agalactiae*, *S. uberis* и *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*;

Трек 2: препарат, содержащий ДНК *S. agalactiae* и *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*;

Трек 3: препарат, содержащий ДНК *S. agalactiae* и *S. uberis*;

Трек 4: препарат, содержащий ДНК *S. uberis* и *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*;

Трек 5: препарат, содержащий ДНК только *S. agalactiae*;

Трек 6: препарат, содержащий ДНК только *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*;

Трек 7: препарат, содержащий ДНК только *S. uberis*;

Трек 8: отрицательный контроль;

Трек 9: маркер молекулярного веса (100 bp ladder).

Хорошо известно, что геном любого микроорганизма представлен двумя составляющими – «core»-геномом и «sub»-геномом. «Core»-геном – это неизменная часть генома, присутствующая у всех штаммов данного вида, тогда как «sub»-геном – это переменная часть генома, образующаяся вследствие разнообразных мутационных процессов, происходящих независимо в каждом конкретном штамме. И если особенности состава «core»-генома используются для видовой идентификации микроорганизма, о чем сказано выше, то «sub»-геном представляет собой золотое дно для исследователей, ставящих перед собою цель эффективной внутривидовой дифференцировки штаммов.

В этом направлении нами были предложены многочисленные подходы, и ряд из них уже используется в лабораторной практике.

1) Адаптирован метод RAPD (метод ПЦР с «рассеянными» праймерами). Многими исследователями этот метод не признается в силу «невысокой воспроизводимости» результатов. Нами были обнаружены причины этого и найдены решения, позволяющие рекомендовать метод RAPD для использования в лабораторных исследованиях. Более того, учитывая сам принцип метода, мы предположили, что RAPD может быть использован для анализа «sub»-генома, в частности, для выявления различных генетических мигрирующих элементов. И это предположение нашло свое подтверждение, когда с использованием RAPD мы впервые у *S. pyogenes* обнаружили транспозон, обеспечивающий стрептококкам устойчивость к тетрациклину, о чем пойдет речь в соответствующем разделе.

2) Нами показано, что метод электрофореза в пульсирующем электрическом поле позволяет выявить различные генетические линии стрептококков. В частности, мы впервые выявили генетическую линию штаммов *S. agalactiae*, содержащих ген *bac*. Именно эта находка положила начало широкомасштабным исследованиям, которые привели к обнаружению нового «островка» патогенности, идентификации

и выявлению функциональных свойств новой двух-компонентной регуляторной системы BgrR/BgrS, что подробно будет представлено в соответствующем разделе.

3) Обнаружена значительная гетерогенность *Sma*I рестрикционных фрагментов генома *S. agalactiae* в области от 42 т.п.н до 100 т.п.н. что позволило дифференцировать даже близкородственные штаммы (Рис. 2). Эти данные, несомненно, заслуживают внимания, поскольку ранее фрагменты в этой области во внимание не принимались, и их значимость для внутривидовой дифференцировки штаммов не признавалась.

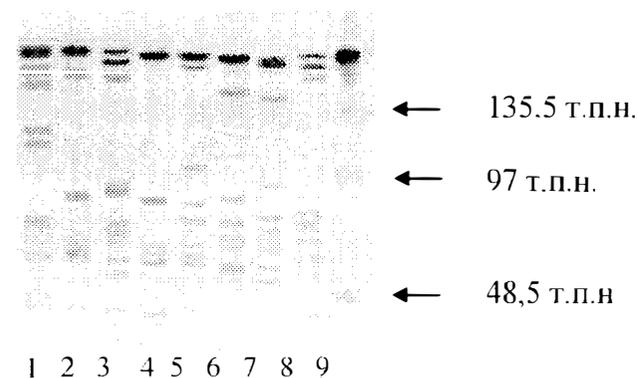


Рис. 2. Гетерогенность *Sma*I рестрикционных паттернов ДНК различных штаммов *S. agalactiae* в области от 42 т.п.н. до 100 т.п.н. при анализе методом электрофореза в пульсирующем электрическом поле.

Треки 1–8: *Sma*I рестрикционные паттерны ДНК различных штаммов; Трек 9: маркер молекулярного веса.

4) Известно, что IS элементы являются мигрирующими генетическими элементами, интеграция которых в различные области генома может приводить к значительным изменениям свойств микроорганизмов, в частности, изменениям вирулентных свойств. Впервые для *S. agalactiae* нами разработан метод IS-типирования, который заключается в

гидролизе хромосомной ДНК и гибридизации полученных фрагментов с зондом на тот или иной IS элемент (Рис. 3). Это позволило не только разработать стратегию для установления степени генетического родства штаммов, выявить отдельные генетические линии, но и успешно дифференцировать даже близкородственные штаммы стрептококков. При этом, в случае использования нескольких IS элементов в качестве маркеров, ценность метода IS-типирования увеличивается многократно.

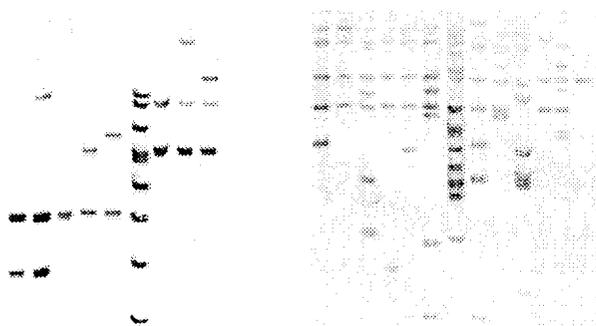
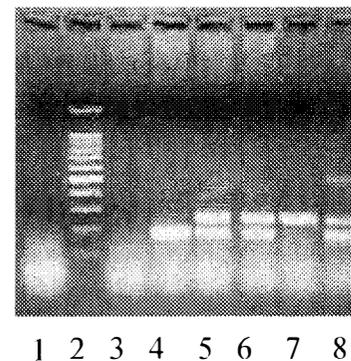


Рис. 3. Различные паттерны гибридизации гидролизатов хромосомных ДНК *S. agalactiae* с зондами на соответствующие IS элементы IS861 (слева) и ISSa4 (справа).

5) С учетом обнаруженной гетерогенности штаммов по наличию IS элементов и генов вирулентности, разработаны multiplex-ПЦР методы для экспресс-дифференцировки штаммов, вызывающих заболевания человека и животных (Рис. 4) Нами показано, что multiplex-ПЦР является недорогим, специфическим, чувствительным и перспективным экспресс-методом для эпидемиологических исследований с целью идентификации и точной характеристики клонов-возбудителей заболеваний



530 п.н. (ген *bac*)
255 п.н. (ген *scpB*)
184 п.н. (ген *bca*)

564 п.н. (IS*Sa4*)
447 п.н. (IS*861*)
320 п.н. (IS*1381*)
217 п.н. (IS*1548*)

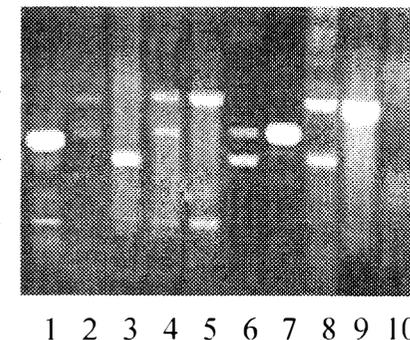


Рис. 4. Multiplex-ПЦР анализ штаммов *S. agalactiae* с праймерами на гены вирулентности (вверху) и с праймерами на IS элементы IS861, IS1548, ISSa4 и IS1381 (внизу).

Вверху
Трек 1: отрицательный контроль;
Трек 2: маркер молекулярного веса (100 bp ladder);
Треки 3–5: штаммы *S. agalactiae*, выделенные от животных;
Треки 6–8: штаммы *S. agalactiae*, выделенные от человека.

Внизу
Треки 1–10: различные комбинации IS элементов у штаммов *S. agalactiae*.

6) Предложен новый метод дифференцировки штаммов *S. agalactiae*. Он основан на обнаруженном полиморфизме гена гипотетического белка *sak0192*, который содержит варьирующее количество правильно чередующихся прямых повторов размерами 16 п.н. и спейсерных областей размерами 44 п.н. Последовательности прямых повторов, в основном, идентичны, тогда как спейсеры характеризуются выраженной гетерогенностью (Рис. 5). Показана возможность использования полиморфизма гена *sak0192* в качестве нового генетического маркера как для диагностики, так и дифференцировки штаммов *S. agalactiae*, в том числе, штаммов, выделенных от разных хозяев.

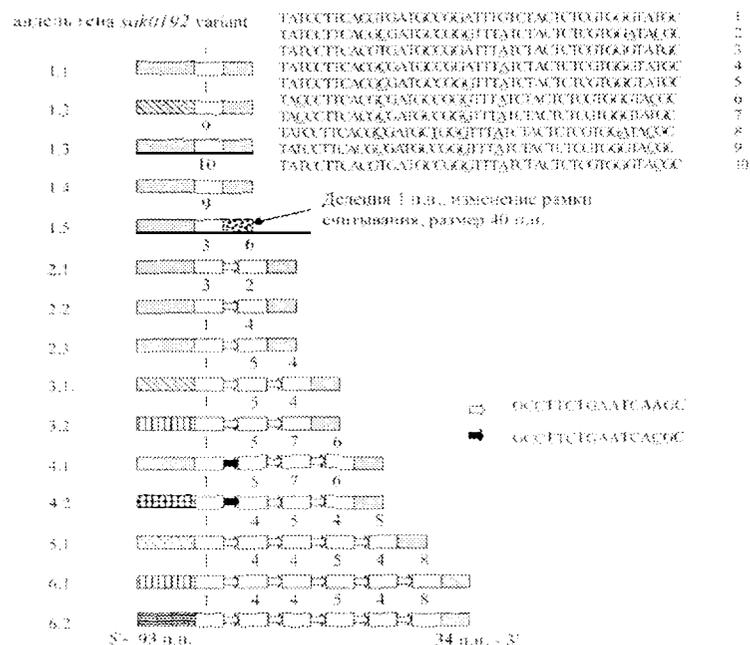


Рис. 5. Некоторые аллели гена *sak0192*. Только три аллели гена (1.1., 1.3., 3.1) встречаются у штаммов *S. agalactiae*, выделенных как от человека, так и от животных.

7) *S. agalactiae* длительное время считался возбудителем мастита у коров и гнойничковых поражений кожи у доярок, и лишь в последние десятилетия было убедительно доказано, что он также может приводить к патологическим процессам у людей. В частности, *S. agalactiae* приводит к патологиям беременности и вызывает тяжелые инвазивные заболевания новорожденных. Учитывая данное обстоятельство, крайне интересными представлялись исследования, касающиеся распространенности генов вирулентности среди штаммов, выделенных от человека, и штаммов, выделенных от животных. Нам удалось собрать большую коллекцию штаммов, выделенных от человека и животных, и изучить распространенность потенциальных генов вирулентности *hca*, *hac*, *scpB*, *lmb*, *cyl*, *hylB*, *cfb*, *scaB* и *glnA*. Данные гены кодируют α и β антигены, С5а пептидазу, белок, связывающий ламинин, гемолизин, гиалуронидазу, cAMP фактор, фактор адгезии и глутаминсинтетазу, соответственно.

В результате анализа пять потенциальных генов вирулентности (*glnA*, *cyl*, *hylB*, *scaB* и *cfb*) были обнаружены у всех штаммов *S. agalactiae*. Однако гены *hca*, *hac*, *scpB*, *lmb* были обнаружены лишь у части штаммов. Так, например, ген *hca* был выявлен у 69% штаммов, выделенных от человека, и у 51% штаммов, выделенных от животных. Ген *hac*, выявленный у 38% штаммов, выделенных от человека, был обнаружен лишь у 3% штаммов, выделенных от животных. Гены *scpB* и *lmb*, присутствующие у всех штаммов, выделенных у человека, были обнаружены лишь у 21% штаммов, выделенных от животных.

В результате сравнительного анализа штаммы, выделенные от человека, значительно отличались от штаммов, выделенных от животных. При этом, лишь одна из возможных комбинаций генов вирулентности (*hca* *scpB* *hylB* *lmb* *glnA* *scaB* *cfb* *cyl*) была обнаружена среди штаммов, выделенных от обоих хозяев. Логично предположить, что лишь отдельные штаммы *S. agalactiae*, принадлежащие определенной генетической линии, способны инфицировать и устойчиво персистировать в организмах обоих хозяев. Наиболее вероятно, что для развития инфекционных заболеваний различных хозяев, вызываемых одним и тем же видом *S. agalactiae*, требуются определенные гены вирулентности.

Роль мигрирующих генетических элементов в патогенности стрептококков

Развитие тяжелых инфекционных заболеваний человека бактериальной природы во многом связано с наличием у возбудителей целого ряда факторов патогенности, некоторые из которых кодируются генами, входящими в состав мобильных генетических элементов. Кроме этого, в составе мобильных элементов часто встречаются гены, обуславливающие устойчивость микроорганизмов к антибактериальным препаратам, что существенно осложняет лечение заболевания.

Патогенные стрептококки не являются исключением. Наиболее ярким примером является наличие в геноме *S. pyogenes* многочисленных генов токсинов, которые входят в состав умеренных бактериофагов

При изучении генома стрептококков нами впервые были обнаружены три мигрирующих генетических элемента. Одним из них является транспозон, найденный у *S. pyogenes*, но характерный для *S. pneumoniae*. Обнаружен он был при анализе результатов метода RAPD. В пяти штаммах присутствовал фрагмент необычного размера, не характерный для стрептококков (Рис. 6). В результате секвенирования было показано, что нуклеотидная последовательность маркерного фрагмента ДНК на 98-100% гомологична фрагментам двух генов транспозона (SPT_1915 и SPT_1916), характерного для штаммов *S. pneumoniae*, и не описанного ранее для *S. pyogenes*. Дальнейшие исследования позволили выявить у *S. pyogenes* полноразмерный транспозон, по-видимому, приобретенный посредством межвидового горизонтального переноса генов от штаммов *S. pneumoniae*. При этом одним из генов транспозона явился ген *telM*, обеспечивший штаммам *S. pyogenes*, содержащих этот транспозон, устойчивость к тетрацилину. Интересно, что данный транспозон локализован у разных штаммов *S. pyogenes* в различных участках генома, что могло привести к изменениям свойств *S. pyogenes* штаммо-специфичным образом

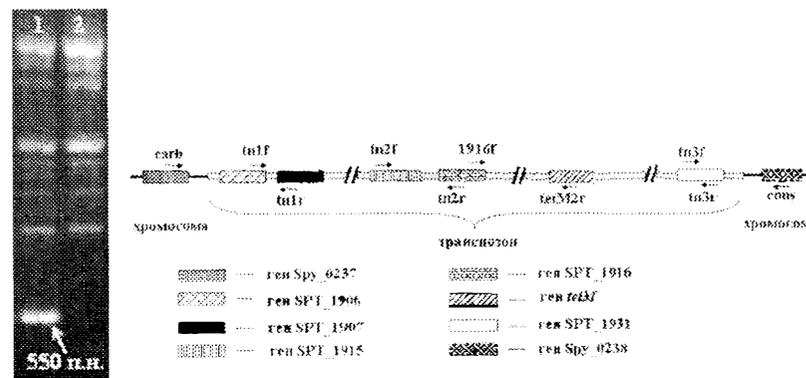


Рис. 6. Паттерн RAPD, содержащий маркерный фрагмент ДНК размером 550 п.н. и паттерн RAPD, не содержащий этот фрагмент (слева), и локализация генов транспозона на хромосомной ДНК *S. pyogenes* (справа).

Вторым мигрирующим генетическим элементом, впервые обнаруженным у стрептококков, был «островок» патогенности *S. agalactiae* размером 8992 п.н. Этот фрагмент ДНК обладал всеми признаками «островков» патогенности и состоял из 7 генов (Рис. 7). Характерной особенностью «островка» патогенности явилось наличие в нем гена вирулентности *bac*, кодирующего β антиген, и генов двухкомпонентной системы, аннотированных нами как ген *hgrR* (ген ДНК-связывающего белка-регулятора) и ген *hgrS* (ген сенсорной гистидинкиназы), ранее не обнаруженные у *S. agalactiae*. Происхождение этого «островка» патогенности у *S. agalactiae* до сих пор остается неизвестным. Тем не менее, учитывая, что этот «островок» присутствует примерно у 30% штаммов *S. agalactiae*, очевидно, что его приобретение придало определенные селективные преимущества *S. agalactiae*, и позволило клону-реципиенту быстро распространиться по всему миру. Как показали наши исследования, штаммы с геном *bac* принадлежат особой генетической линии *S. agalactiae* и характеризуются сходными

серотипами, риботипами, сходством в наличии IS элементов и генов вирулентности, сходными рестрикционными паттернами и др. Учитывая, что β антиген обладает способностью связывать иммуноглобулины А человека и фактора Н комплемента, логично заключить, что именно эти свойства и являются селективными преимуществами, обеспечившими дополнительные средства защиты *S. agalactiae* от иммунной системы человека. Дальнейшие наши исследования показали, что именно двухкомпонентная система, кодируемая генами *bgrR* и *bgrS*, является функционально значимой для регуляции экспрессии гена вирулентности *bac* и синтеза соответствующего β антигена.

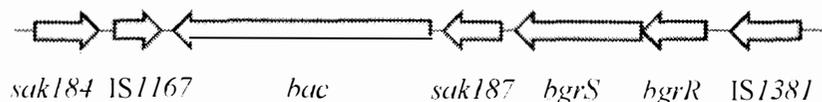


Рис. 7. «Островок» патогенности *S. agalactiae*, содержащий ген *bac* и гены двухкомпонентной регуляторной системы *bgrR* и *bgrS*.

Третьим мигрирующим элементом стрептококков, впервые обнаруженным нами, явился «островок» патогенности *S. agalactiae*, содержащий гены вирулентности *scpB* и *lmb*. Его обнаружению предшествовал комплексный анализ штаммов, выделенных из молока коров одной конкретной фермы. В результате анализа мы обнаружили ряд штаммов, характеризующихся одинаковыми серотипами, риботипами, фенотипическими свойствами и др. Отличались эти штаммы лишь *SmaI* рестрикционными паттернами, а именно, подвижностью лишь одного из фрагментов (Рис 8) При этом у штамма, содержащего фрагмент размером 158 т.п.н., присутствовали гены *scpB* и *lmb*, и гибридизационный анализ выявил их локализацию в этом фрагменте, а у штамма размером 147 т.п.н. эти гены отсутствовали.

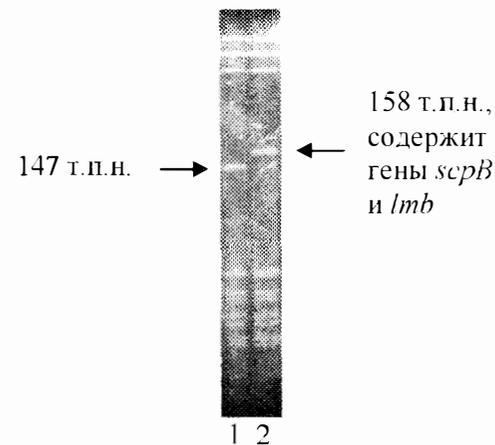


Рис. 8. *SmaI* рестрикционные паттерны штаммов *S. agalactiae*.

Трек 1: штамм, не содержащий генов *scpB* и *lmb*;
Трек 2: штамм, содержащий гены *scpB* и *lmb* на фрагменте размером 158 т.п.н.

Лишь через несколько лет после нашего исследования были опубликованы полногеномные последовательности *S. agalactiae*, подтвердившие сцепленность генов *scpB* и *lmb* и их нахождение в пределах «островка» патогенности. Интересно отметить, что эти гены присутствуют у всех штаммов *S. agalactiae*, выделенных от человека, и лишь у 21% штаммов выделенных от животных. При этом мы обнаружили 3 типа организации *scpB-lmb* межгенной области, в пределах которой могли находиться интрон GBSi1 и IS элемент IS1548, что свидетельствует о высокой подверженности «островка» патогенности генетическим рекомбинациям.

Существование штаммов *S. agalactiae*, лишенных генов *scpB* и *lmb*, и преимущественно выделяемых от животных, заставляет иначе взглянуть на проблему стрептококковой инфекции. Представляется вполне возможным, что, во-первых, данный «островок» патогенности является балластом для штаммов, паразитирующих в организме животных, и штаммы избавляются от него, и, во-вторых, штаммы *S. agalactiae* без

генов *scpB* и *lmb* не способны вызывать инфекционные процессы у людей. Эти предположения открывают широкие перспективы для дальнейших исследований с целью изучения биологической значимости генов вирулентности *scpB* и *lmb* для стрептококков, и для расшифровки специфических механизмов взаимодействия патогена и хозяина.

Регуляция транскрипции у патогенных стрептококков

Начиная с 1961 г., когда Jacob и Monod описали Лас оперон *Escherichia coli*, ставший классическим примером контроля транскрипции генов в биологических системах, начались интенсивные исследования регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции. В течение последних десятилетий пристальное внимание было обращено на регуляцию транскрипции генов у патогенных стрептококков. Взаимодействие их с организмом хозяина является сложным и многофакторным процессом. Способность стрептококков вызывать инфекционные процессы и поражать практически любые органы и ткани человека определяется не только наличием факторов патогенности, способствующих адгезии микроорганизма, его колонизации, проникновению в организм хозяина и уклонению от его иммунного ответа. Крайне важна способность патогенных стрептококков быстро адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды и регулировать экспрессию генов, в том числе, генов вирулентности.

С этой целью стрептококки способны воспринимать изменения в условиях окружающей среды как *in vitro*, так и *in vivo*, и корректировать уровни экспрессии собственных генов таким образом, чтобы адаптироваться и успешно переживать неблагоприятные условия. Именно такая способность стрептококков приводит к многочисленным патологическим процессам в организме хозяина, от бессимптомного носительства до тяжелых инвазивных поражений.

Процессы адаптации стрептококков обусловлены совместным действием определенных классов бактериальных белков, образующих так называемую регуляторную сеть. Одними из компонентов регуляторной сети являются двухкомпонентные системы, каждая из которых состоит из двух

белков – сенсорной гистидинкиназы и ДНК-связывающего белка-регулятора. Сенсорная гистидинкиназа обладает свойством воспринимать определенные сигналы из окружающей среды (изменения pH, температуры, концентрации субстратов и др.) и в ответ на эти сигналы приводит к фосфорилированию гистидина в молекуле гистидинкиназы. Следующими этапами в передаче сигнала являются перенос фосфата к родственной молекуле ДНК-связывающего белка-регулятора, его конформационные изменения и изменения ДНК-связывающей активности и, как следствие, активация или репрессия транскрипции определенных генов. Регуляция транскрипции генов обеспечивается за счет связывания промоторных областей генов с особым доменом белка-регулятора, называемого «спираль-поворот-спираль».

Другими компонентами регуляторной сети являются белки-регуляторы, называемые также транскрипционными факторами, которые не нуждаются в сенсорных гистидинкиназах. Тем не менее, эти белки-регуляторы должны иметь соответствующие им сенсорные молекулы, многие из которых до сих пор остаются неизвестными.

Геномами стрептококков кодируется большое количество двухкомпонентных регуляторных систем и белков-регуляторов. Например, у *S. pyogenes* обнаружено 13 двухкомпонентных регуляторных систем и более 40 белков-регуляторов транскрипции. У *S. agalactiae* выявлена 21 двухкомпонентная регуляторная система, в том числе, BgrR/BgrS, открытая сотрудниками отдела молекулярной микробиологии, и несколько десятков белков-регуляторов транскрипции.

Интенсивные исследования в области регуляции транскрипции генов стрептококков и активное участие в них сотрудников отдела молекулярной микробиологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН привели к созданию новой лаборатории – лаборатории функциональной геномики и протеомики микроорганизмов. Нами была разработана единая методологическая схема инактивации генов регуляторной сети и выяснения их функциональной роли в метаболизме патогенных микроорганизмов и проявлении ими вирулентных свойств, о чем будет сказано в соответствующих разделах.

Роль белка-регулятора Rgg в метаболизме и проявлении *S. pyogenes* вирулентных свойств

Белок-регулятор транскрипции Rgg, имеющий синонимичное название RopB, относится к семейству белков-регуляторов TIGR01716, присутствующих у грамположительных микроорганизмов (*S. agalactiae*, *S. gordonii*, *S. pyogenes*, *S. suis*, *S. pneumoniae* и др.), каждый из которых в той или иной мере контролирует экспрессию факторов патогенности и иногда проявление вирулентных свойств. По этой причине белок Rgg и был выбран в качестве объекта для изучения.

В результате исследований белка-регулятора Rgg было выяснено, что он является глобальным регулятором, влияет на транскрипцию большого числа генов у *S. pyogenes*, что в свою очередь отражается на фенотипических свойствах микроорганизма. Ген *rgg* был инактивирован у семи штаммов *S. pyogenes*, относящихся к различным серологическим типам – M1, M3, M18, M49. В результате изменились фенотипические свойства *S. pyogenes*, в частности:

- инактивация гена *rgg* оказала влияние на адаптацию *S. pyogenes* к условиям стресса;
- инактивация гена *rgg* повлияла на способность *S. pyogenes* использовать аминокислоты и углеводы для размножения и роста (Рис 9);
- инактивация гена *rgg* привела к изменениям ростовых характеристик штаммов;
- инактивация гена *rgg* повлияла на частоту индукции бактериофага NZ131.1.

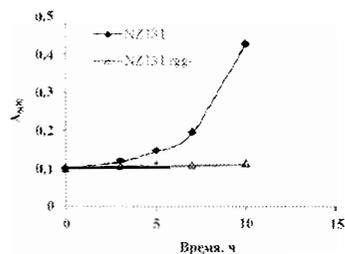


Рис. 9. Штамм *S. pyogenes* NZ131, в котором инактивирован ген *rgg*, не способен расти и размножаться в «минимальных» питательных средах, содержащих сахарозу в качестве источника энергии.

Но наиболее интересными для понимания формирования вирулентности *S. pyogenes* явились изменения в уровнях экспрессии факторов патогенности:

– мутантный штамм оказался неспособен синтезировать цистеиновую протеиназу SpeB, один из ключевых факторов патогенности;

– у мутантного штамма изменилась экспрессия таких факторов патогенности, как стрептолизин O, стрептолизин S, стрептокиназа, белок Mac, НАД-гликогидролаза, M-белок, митогенный фактор MF-I и др.;

– штамм, мутантный по гену *rgg*, стал более вирулентным по сравнению с исходным штаммом NZ131.

Таким образом, нарушения в регуляторной сети, опосредованные инактивацией гена *rgg*, привели к многочисленным изменениям фенотипических свойств. Следует подчеркнуть, что восстановление полноразмерного гена *rgg* в мутантном штамме методом комплементации также восстановило и фенотипические свойства, свидетельствуя о том, что обнаруженные изменения действительно вызваны инактивацией гена *rgg*.

Для того, чтобы выяснить, изменения в уровнях транскрипции каких генов отразились в изменениях свойств на уровне фенотипа, с использованием микрочиповой технологии изучена транскрипция генов штаммов *S. pyogenes* на различных фазах роста культуры – на середине логарифмической фазы и пост-логарифмической фазе. Оказалось, что белок Rgg может выполнять функции как активатора, так и репрессора транскрипции генов, расположенных в различных участках генома. В частности, в штамме NZ131 инактивация гена *rgg* привела к изменениям в уровнях транскрипции более 700 генов. Сравнительный анализ полногеномных транскрипционных профилей штаммов MGAS5005, CS101, SF370, NZ131 и их *rgg* мутантов показал, что инактивация гена *rgg* приводит к изменению уровней транскрипции 3, 13, 45 и 706 генов соответственно. При этом транскрипция лишь двух генов (*speB* и *spy2040*), регулируется белком Rgg у всех четырех штаммов,

доказывая существование у *S. pyogenes* «core» Rgg-регулона. Остальные гены регулируются белком Rgg штаммо-специфическим образом и представляют собой «sub» Rgg-регулоны.

Интересно отметить, что штаммо-специфически ген *rgg* оказывает влияние также и на большое количество генов-регуляторов и генов двухкомпонентных систем, что, по-видимому, и объясняет различия в «sub» Rgg-регулонах. Лишь ген *speB* является объектом прямого воздействия белка Rgg, а остальные гены – объектами опосредованного воздействия. Как и все ДНК-связывающие белки-регуляторы, Rgg имеет домен «спираль-поворот-спираль». Нами обнаружены многочисленные промоторные области генов в геноме *S. pyogenes*, связывающиеся с белком Rgg, в том числе, промоторная область гена *speB*. Интересно, что во время экспоненциальной фазы роста *S. pyogenes*, белок Rgg связывается с белком LacD.1 и, тем самым, оказывается неспособным активировать транскрипцию *speB*. Именно по этой причине эритрогенный токсин SpeB начинает экспрессироваться лишь во время пост-экспоненциальной фазы роста, когда Rgg высвобождается из комплекса с LacD.1.

Функциональные свойства белка Rgg зависят от аллели гена *rgg*. Некоторые аминокислоты в последовательности белка Rgg являются принципиально важными для проявления им функциональных свойств. Так, например, замена серина на пролин в положении 103 приводит к неспособности модифицированного белка Rgg активировать транскрипцию *speB*, но, тем не менее, у этого белка сохраняется способность влиять на транскрипцию других генов *S. pyogenes*. Для активации транскрипции *speB* важны также аргинин в положении 11 и триптофан в положении 142, а делеция 110 аминокислот с C-терминального конца молекулы Rgg приводит к неспособности активировать транскрипцию *speB*.

Роль белка-регулятора MutR в метаболизме и проявлении *S. pyogenes* вирулентных свойств

Еще 15 лет назад исследователи считали, что после расшифровки последовательности генома стрептококков станет

понятно, каким образом этот микроорганизм адаптируется к условиям различных экологических ниш. За счет каких механизмов он использует самые разнообразные биологические субстраты для размножения и роста и, наконец, каким именно образом он приводит к многочисленным патологическим процессам в организме человека, успешно противодействуя иммунной системе. Однако после расшифровки нуклеотидных последовательностей геномов *S. pyogenes* и *S. agalactiae* в 2001–2002 гг. эти вопросы не только не отпали, а наоборот, количество вопросов, на которые необходимо найти ответы, многократно возросло. В частности, биоинформационный анализ обнаружил в геноме стрептококков огромное количество неcodируемых областей и «предполагаемых» коротких открытых рамок считывания, функции которых даже невозможно предположить. Во-вторых, было выявлено много генов и фрагментов ДНК, по-видимому, приобретенных посредством горизонтального переноса от других бактерий, и биологическая значимость многих из таких приобретений для стрептококков остается невыясненной и до сих пор. В-третьих, аннотировано большое число генов, кодирующих «гипотетические» белки, обладающие определенной степенью гомологии с различными функциональными группами белков.

В результате предпринятого анализа полногеномной последовательности *S. pyogenes* мы обратили внимание на ген *spy0496* (*mutR*), аннотированный в базе данных как ген «возможного регулятора транскрипции». Проведенный нами компьютерный анализ выявил наличие у кодируемого этим геном белка MutR домена «спираль-поворот-спираль» и принадлежность белка MutR к семейству белков TIGR01716, к которому принадлежит и белок Rgg, исследуемый нами в течение ряда лет. Именно по этой причине ген *mutR* (белок MutR) и был выбран для исследования.

Инактивация гена *mutR* у четырех штаммов *S. pyogenes* (SF370, серотип M1, №97, серотип M12; №152, серотип M12; и NZ131, серотип M49) методом инсерционного мутагенеза привела к значительному изменению метаболизма, в частности, изменению скорости и характера роста штаммов в жидкой среде. С использованием микрочиповой технологии было показано, что на середине логарифмической фазы роста

инактивация гена влияет на транскрипцию 154 генов, в том числе генов факторов патогенности, таких как С5а-пептидаза, стрептолизин О, ДНКазы, НАД гликогидролаза и экзотоксин Н.

С использованием метода масс-спектрометрии и биохимических методов анализа удалось показать, что изменения в уровнях транскрипции генов отразились на уровнях экспрессии белков – секретируемого белка ингибитора комплемента Sic, секретируемых ДНКаз, факторов элонгации G, Tu, Ts, аминокпептидазы N, энлазы, фосфоглицераткиназы, пируваткиназы, орнитинкарбомоилтрансферазы. Как и в случае гена *rgg*, MutR-зависимая регуляция транскрипции характеризовались штаммовой специфичностью. Для того, чтобы подтвердить достоверность данных MutR-зависимой регуляции транскрипции у *S. pyogenes*, методами генетической инженерии были созданы рекомбинантные плазмиды, содержащие полноразмерный ген *mutR*, и экспрессия гена *mutR* была восстановлена в мутантном штамме методом комплементации. В результате комплементации восстановились исходные свойства штамма, свидетельствуя о том, что изменения фенотипических свойств в мутантном штамме явились следствием инактивации гена *mutR*, а не результатом вторичной мутации

Несмотря на штаммовую специфичность MutR-зависимой регуляции транскрипции, одно свойство регулируется белком MutR одинаково во всех четырех штаммах. И это свойство – вирулентность! Обнаружено, что ген *mutR* является критически важным для проявления штаммами *S. pyogenes* патогенных свойств *in vivo* и для устойчивости *S. pyogenes* к фагоцитозу. Инактивация гена *mutR* приводит к значительному снижению или полной потере вирулентных свойств *S. pyogenes* (Рис 10). В частности, в несколько раз снижаются адгезивные свойства *S. pyogenes* к эпителиальным клеткам человека. Штамм, лишенный гена *mutR*, неспособен выживать в цельной человеческой крови, в отличие от исходного штамма. Штаммы, лишенные гена *mutR*, становятся авирулентными при моделировании стрептококковой инфекции на лабораторных животных, при этом предварительная иммунизация животных *mutR* мутантным штаммом полностью защищает мышей от летальной стрептококковой инфекции.

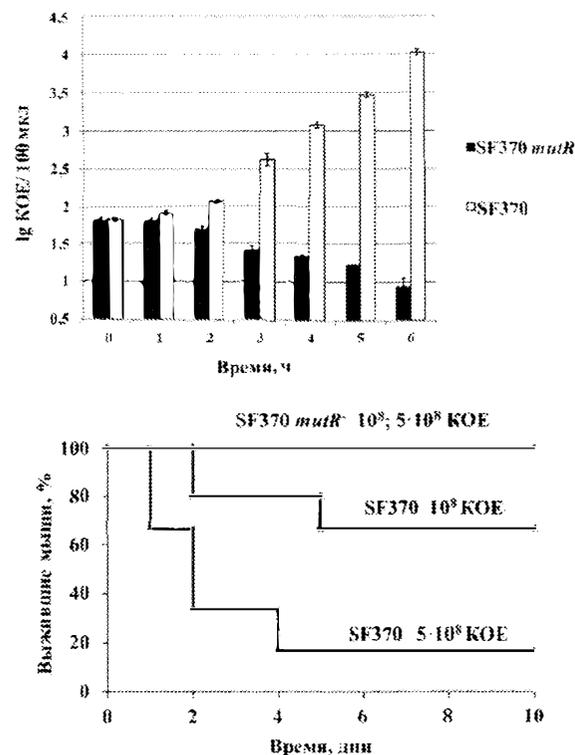


Рис. 10. Инактивация гена *mutR* влияет на способность *S. pyogenes* выживать в цельной человеческой крови (вверху) и приводит к гибели лабораторных животных (внизу).

Таким образом, было установлено, что белок-регулятор MutR является глобальным регулятором транскрипции и играет ключевую роль в проявлении *S. pyogenes* вирулентных свойств. Дальнейшее изучение роли гена-регулятора транскрипции *mutR* (белка MutR) является перспективным направлением исследований не только с целью выявления молекулярных механизмов, обеспечивающих адаптацию патогенных микроорганизмов к действию защитных систем организма человека и, как следствие, повышающих их вирулентность, но и с целью дальнейшей разработки нового класса

антибактериальных препаратов для профилактики и лечения стрептококковых заболеваний.

Роль двухкомпонентной регуляторной системы BgrR/BgrS в метаболизме и проявлении *S. agalactiae* вирулентных свойств

Как приведено выше, в результате исследований генома *S. agalactiae* был обнаружен «островок» патогенности размером 8992 п н В пределах этого «островка» была идентифицирована ранее не обнаруженная у стрептококков двухкомпонентная регуляторная система, состоящая из ДНК-связывающего белка-регулятора и сенсорной гистидинкиназы, которая названа нами BgrR/BgrS.

Учитывая, что ген вирулентности *bac* и гены двухкомпонентной системы *bgrR* и *bgrS* являются смежно-расположенными, было логично предположить, что именно эта система контролирует экспрессию гена *bac* и синтез кодируемого им β антигена. Если такая регуляция действительно существует, это могло бы объяснить имеющиеся литературные данные, что наличие гена *bac* не всегда коррелирует с наличием белка Bac.

В результате проведенных нами экспериментов у *S. agalactiae* методом инсерционного мутагенеза был инактивирован ген *bgrR*, а также два гена (*bgrR* и *bgrS*). В результате продемонстрировано, что регуляция синтеза β антигена происходит на уровне транскрипции: при инактивации гена *bgrR* в 17 раз уменьшается уровень транскрипции гена *bac*, практически до нуля уменьшается экспрессия кодируемого им β антигена. Было показано, что в регуляции транскрипции гена *bac* ключевую роль играет ДНК-связывающий белок BgrR, но не сенсорная гистидинкиназа BgrS, и выявлены неактивные природные аллели гена *bgrR*, неспособные активировать экспрессию β антигена (Рис. 11). Таким образом, не исключено, что для функционирования белка BgrR может быть задействована и другая гистидинкиназа, отличная от BgrS, поиск которой представляет определенный интерес.

Интересными оказались данные, свидетельствующие о том, что при инактивации двухкомпонентной системы BgrR/BgrS и, как следствие, инактивации гена вирулентности *bac*, существенно увеличиваются вирулентные свойства мутантного штамма в экспериментах на лабораторных животных. Может ли это свидетельствовать о том, что β антиген вовсе не является фактором патогенности, как принято считать, покажут дальнейшие исследования.



Рис. 11. Трехмерная структура функционально-активной молекулы белка-регулятора BgrR (слева) и молекулы-белка регулятора, кодируемого неактивной природной аллелью гена *bgrR* (справа).

Резюмируя полученные нами данные, хотелось бы отметить, что к числу наиболее интересных направлений исследований в области изучения регуляции транскрипции генов патогенных стрептококков можно отнести поиск тех регуляторных молекул, без которых стрептококки не способны размножиться и/или приводить к патологическим процессам в организме человека. Как следствие, перспективной может явиться разработка селективных ингибиторов с целью воздействия как на белок-регулятор, так и на его ген (например, в виде антисмысловых РНК), что может послужить основой для поиска и разработки антибактериальных препаратов нового поколения. Кроме того, штаммы, ставшие авирулентными в результате направленного нарушения регуляторной сети, могут расцениваться в перспективе в качестве живых вакцинных штаммов.

Завершая выступление, хотелось бы обобщить приведенные выше результаты 15-летних исследований:

1) получены многочисленные фундаментальные данные об организации генома стрептококков, и на основе этих данных обнаружены новые мигрирующие генетические элементы, несущие гены вирулентности, и выявлены различные генетические линии в пределах вида;

2) на основании данных об организации генома разработаны разнообразные методы и подходы для дифференцировки штаммов, выявлены генетические маркеры для идентификации клонов-возбудителей заболеваний;

3) изучена регуляция транскрипции генов и показана роль белков-регуляторов и двухкомпонентных регуляторных систем в метаболизме стрептококков и проявлении ими вирулентных свойств;

4) многие из разработанных методов и подходов были внедрены в лабораторную практику ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН и зарубежные научно-исследовательские и медицинские учреждения.

В заключение хочу выразить глубокую признательность всем сотрудникам отдела молекулярной микробиологии, и, в особенности, академику РАМН А. А. Тоголяну, профессору А. Н. Суворову, зарубежным коллегам (Prof. M. S. Chaussee, Prof. Y. H. Yang, Prof. I. Mikula), без поддержки которых была бы невозможна работа над теми проблемами, которые освещались в сегодняшнем докладе.