

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* центральноазиатского подвида

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

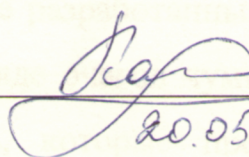
биологического факультета

Морозова Олега Алексеевича

Научный руководитель:

Ассистент кафедры биохимии

и биофизики, к.б.н.

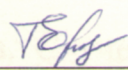

20.05.18

М.В. Каневский

Научный консультант:

г.н.с. ФКУЗ РосНИПЧИ

«Микроб» Роспотребнадзора, д.б.н.


19.05.2018

Г.А. Ерошенко

Зав. кафедрой биохимии и

биофизики, д.б.н., профессор


20.05.2018

С.А. Коннова

Саратов 2018

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности проблемы.

Исторически для штаммов *Y. pestis* был разработан ряд классификаций, основанных на отличиях в фенотипических свойствах и районах происхождения. В Российской Федерации и других странах СНГ широкое распространение получила подвидовая классификация, которая делит штаммы на основании отличий в биохимической активности, вирулентности и месте происхождения. Подвидовая классификация выделяет пять подвидов – основной subspecies (ssp.) *pestis* и 4 неосновных подвида – кавказский, ssp. *caucasica* (Кавказ: Россия, Грузия, Армения, Азербайджан); алтайский, ssp. *altaica* (Горный Алтай: Россия, Монголия); гиссарский, ssp. *hissarica* (Памиро-Алай: Таджикистан); улегейский, ssp. *ulegeica* (Монголия). Штаммы основного подвида высоковирулентны, широко распространены в очагах чумы на разных континентах. Эти штаммы вызвали три разрушительные пандемии чумы, оставившие глубокий след в истории человечества. В отличие от штаммов основного подвида неосновные подвиды, вирулентны, в основном, для мелких грызунов, хотя большинство из них все же могут вызывать отдельные случаи заболевания у людей [1].

В последнее время с помощью молекулярно-генетических методов и полногеномного секвенирования выявлены новые популяции штаммов *Y. pestis*, которые не были учтены в ранее разработанных классификациях возбудителя чумы. Так установлено, что в ряде очагов чумы в Китае также циркулируют штаммы неосновных подвидов, которые предложено выделить в новые подвиды или биовары. Обнаружен единственный известный для Африки штамм неосновного подвида – Ангола. С учетом молекулярно-генетических данных была разработана номенклатура филогенетических ветвей и популяций, которая основана на генетических характеристиках штаммов *Y. pestis*. В эту номенклатуру включены ветви 0.ANT – 4.ANT, 2.MED, 1.ORI, которые соответствуют основному подвиду по подвидовой классификации, и ветви 0.PE2 – 0.PE7, которые соответствуют неосновным подвидам [2]. Однако эта

номенклатура лишь частично учитывает штаммы из многочисленных природных очагов чумы стран СНГ, поскольку сведения о них до недавнего времени были мало представлены в литературе. На основе полученных данных молекулярно-генетического анализа и полногеномного секвенирования штаммов из очагов чумы стран СНГ и сопредельных государств были расширены сведения о глобальном генетическом разнообразии штаммов возбудителя чумы и определена современная популяционная структура вида *Y. pestis*. На ее основе было предложено усовершенствование подвидовой классификации возбудителя чумы с выделением шести подвидов: основной, *ssp. pestis* (природные очаги чумы Евразии, Африки, Америки); тибетский, *ssp. tibetica* (Тибет, Китай); кавказский, *ssp. caucasica* (Кавказ); ангольский, *ssp. angolica* (Африка); центральноазиатский, *central asiatica* (Центральная Азия, Китай); улегейский, *ssp. ulegeica* (Монголия). При этом подвид *ssp. pestis* включает штаммы филогенетических ветвей 0.ANT, 1.ANT, 2.ANT, 3.ANT, 4.ANT, 2.MED и 1.ORI, кавказский подвид соответствует филогенетической ветви 0.PE2, ангольский (штамм Ангола) – 0.PE3, центральноазиатский – 0.PE4, тибетский – 0.PE7, улегейский – 0.PE9 [3].

По данным генетического анализа сложную популяционную структуру имеет вновь выделенный центральноазиатский подвид (филогенетическая ветвь 0.PE4), который объединяет штаммы, ранее отнесенные к алтайскому и гиссарскому подвидам, штаммы из Таласского высокогорного очага в Кыргызстане, штаммы *microtus* из двух очагов в Китае, а также штаммы из провинции Цинхай (Qinghai) в Китае. Однако структура центральноазиатского подвида и свойства входящих в него штаммов нуждаются в дальнейших исследованиях.

Цель и задачи исследования. Целью нашего исследования был анализ популяционной структуры и генетических особенностей штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида на основе изучения штаммов из очагов стран СНГ, а также геномов штаммов филогенетической ветви 0.PE4 из генетических

баз данных и разработка способа дифференциации штаммов центральноазиатского подвида от других штаммов *Y. pestis*.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Анализ популяционной структуры штаммов центральноазиатского подвида возбудителя чумы по данным полногеномного секвенирования.
2. Поиск ДНК мишеней, маркерных для центральноазиатского подвида *Y. pestis*, оценка специфичности, расчет последовательностей олигонуклеотидных праймеров и зонда.
3. Подбор оптимальных условий проведения реакции ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ.
4. Анализ эффективности разработанного способа дифференциации штаммов центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ на коллекции ДНК штаммов *Y. pestis* разных подвидов и биоваров.
5. Анализ уровня экспрессии генов *CC3T* у *Y. pestis* методом ОТ-ПЦР-РВ (оптимизация методики для возбудителя чумы).

Научная новизна. Впервые определена современная популяционная структура центральноазиатского подвида *Y. pestis* и выявлено наличие в ней 4 кластеров родственных штаммов. Впервые разработан способ для проведения внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида на основе методов ПЦР с электрофоретическим (ПЦР-ЭФ) и гибридизационно-флуоресцентным (ПЦР-РВ) учетом результатов.

Научная значимость. Полученные в работе результаты перспективны как с практической точки зрения, так и для проведения дальнейших фундаментальных исследований возбудителя чумы. Разработанный способ обеспечивает быстрое и эффективное разделение штаммов центральноазиатского от штаммов других подвидов *Y. pestis*.

Положения, выносимые на защиту:

1. На основе данных полногеномного SNP анализа определена современная популяционная структура штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 0.РЕ4, обозначенной как центральноазиатский подвид. В его составе

выделено 4 отдельные популяции штаммов алтайского (0.РЕ4а), *microtus* (0.РЕ4m), гиссарского (0.РЕ4h) и таласского (0.РЕ4t) биоваров.

2. Впервые найдена маркерная *indel* мутация – делеция в 509 п.н. в гене YPO207, содержащаяся в геноме штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида.

3. Разработан способ дифференциации штаммов *Y. pestis ssp. central asiatica* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени и ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. Его эффективность подтверждена для штаммов всех четырех биоваров (алтайский, *microtus*, гиссарский и улегейский) центральноазиатского подвида.

Структура и объем работы. Работа изложена на 74 странице, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 8 рисунками и 4 таблицами. Список использованных источников включает 120 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Представлен анализ литературных данных о возбудителе чумы, организации генома, внутривидовой классификации *Y. pestis*, центральноазиатском подвиде возбудителя чумы, использовании полимеразной цепной реакции для дифференциации *Y. pestis* разных подвидов.

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования проводились на базе Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), в период с 2016 по 2018 год (таблица 1).

Таблица 1 – Штаммы *Y. pestis*, полногеномные последовательности которых использованные в исследовании

Штамм <i>Y. pestis</i>	Подвид по новой классификации*/ ранее использовавшееся обозначение	Филогенетическая ветвь	Номер доступа нуклеотидной последовательности в NCBI GenBank
1	2	3	4
Pestoides F	кавказский / кавказский	0.РЕ2	NC_009381.1

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Pestoides A	центральноазиатский/ алтайский	0.PE4a	NZ_ACNT00000000.1
Pestoides B	центральноазиатский / алтайский	0.PE4a	NZ_CP010023.1
SCPM-O-B-7812	центральноазиатский / алтайский	0.PE4a	NZ_LIYV00000000.1
SCPM-O-B-7075	центральноазиатский / алтайский	0.PE4a	NZ_LIZA00000000.1
A-1815	центральноазиатский / таласский	0.PE4t	LPTY00000000.1
SCPM-O-B-7019	центральноазиатский / таласский	0.PE4t	NZ_LIYW00000000.1
SCPM-O-B-7074	центральноазиатский / таласский	0.PE4t	NZ_LIYT00000000.1
SCPM-O-B-6304	центральноазиатский /гиссарский	0.PE4h	NZ_LIYS00000000.1
91001	центральноазиатский / microtus	0.PE4m	NC_005810.1
SCPM-O-B-6216	центральноазиатский / microtus	0.PE4m	NZ_LIYR00000000.1
M0000002	центральноазиатский / microtus	0.PE4m	NZ_ADST00000000.1
CMCC18019	центральноазиатский / microtus	0.PE4m	NZ_ADQO00000000.1
CMCC91090	центральноазиатский / microtus	0.PE4m	NZ_ADRJ00000000.1
CMCC93014	центральноазиатский / microtus	0.PE4m	NZ_ADRM00000000.1
CMCCN010025	центральноазиатский / microtus	0.PE4m	NZ_ADRT00000000.1
9	цинхайский / –	0.PE10	NZ_ADPT00000000.1
12	цинхайский / –	0.PE10	NZ_ADOV00000000.1
Angola	ангольский / –	0.PE3	NC_010159.1
620024	тибетский / –	0.PE7	NZ_ADPM00000000.1
Antiqua	основной / основной	1.ANT	NC_008150.1
UG05-0454	основной /основной	1.ANT	NZ_AAYR00000000.1
Nepal516	основной/ основной	2.ANT	NC_008149.1
MGJZ3	основной /основной	3.ANT	NZ_ADSW00000000.1
MGJZ7	основной /основной	3.ANT	NZ_ADSY00000000.1
MGJZ12	основной /основной	4.ANT	NZ_ADSV00000000.1
2501	основной /основной	2.MED1	NZ_AKVQ00000000.1
2504	основной /основной	2.MED1	NZ_ADOZ00000000.1
KIM10	основной /основной	2.MED1	NC_004088.1
SHAN12	основной /основной	2.MED3	NZ_ADTB00000000.1
CO92	основной / основной	1.ORI	NC_003143.1
A-1122	основной /основной	1.ORI	NC_017168.1
PY-01	основной /основной	1.ORI	NZ_AKRM00000000.1

* Классификация по [3]

Полногеномный SNP анализ и поиск маркерных SNPs осуществляли при помощи программы Wombac 2.0 (<https://github.com/tseemann/wombac>) с использованием полногеномных последовательностей 33 штаммов *Y. pestis* (таблица 1).

Дендрограмму Maximum Likelihood строили с помощью программы PhyML 3.1 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>) на основе модели HKY85. Визуализацию полученной дендрограммы выполняли в программе FigTree 1.4.3 (<http://influenza.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Дендрограмму Maximum Parsimony строили в программе Bionumerics 7.6 (<http://www.applied-maths.com/bionumerics>). Бутстреп анализ для обоих алгоритмов выполняли с использованием 500 случайных выборок.

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов вирулентности проводили с помощью программы Mega 5.0 и алгоритма BLAST.

Поиск ДНК мишеней – indel мутаций, специфичных для штаммов центральноазиатского подвида, осуществляли с применением программ Mauve 2.3.1 (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>) и Mega 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>) путем сравнения полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* разных подвидов и групп (таблица 1). Оценку специфичности найденных ДНК мишеней проводили с использованием алгоритма BLAST по базе данных полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI GenBank. Расчет праймеров и зонда выполняли помощью программы Vector NTI 10 (<http://www.thermofisher.com>) и интернет-ресурса <https://www.genscript.com>. Зонд конструировали в формате TaqMan с использованием флуоресцентного красителя FAM и гасителя флуоресценции RTQ1.

Культивирование штаммов проводили в соответствии с принятыми методами [4].

Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* проводили стандартным методом в соответствии с Методическими указаниями 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при

работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» с предварительным обеззараживанием культуры чумного микроба. Выделение генетического материала штаммов *Y. pestis* выполняли с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК AxyPrep (AXYGEN Biosciences, США) по прилагаемой методике. Полученный образец, содержащий ДНК чумного микроба, использовался для амплификации фрагментов генов в ПЦР.

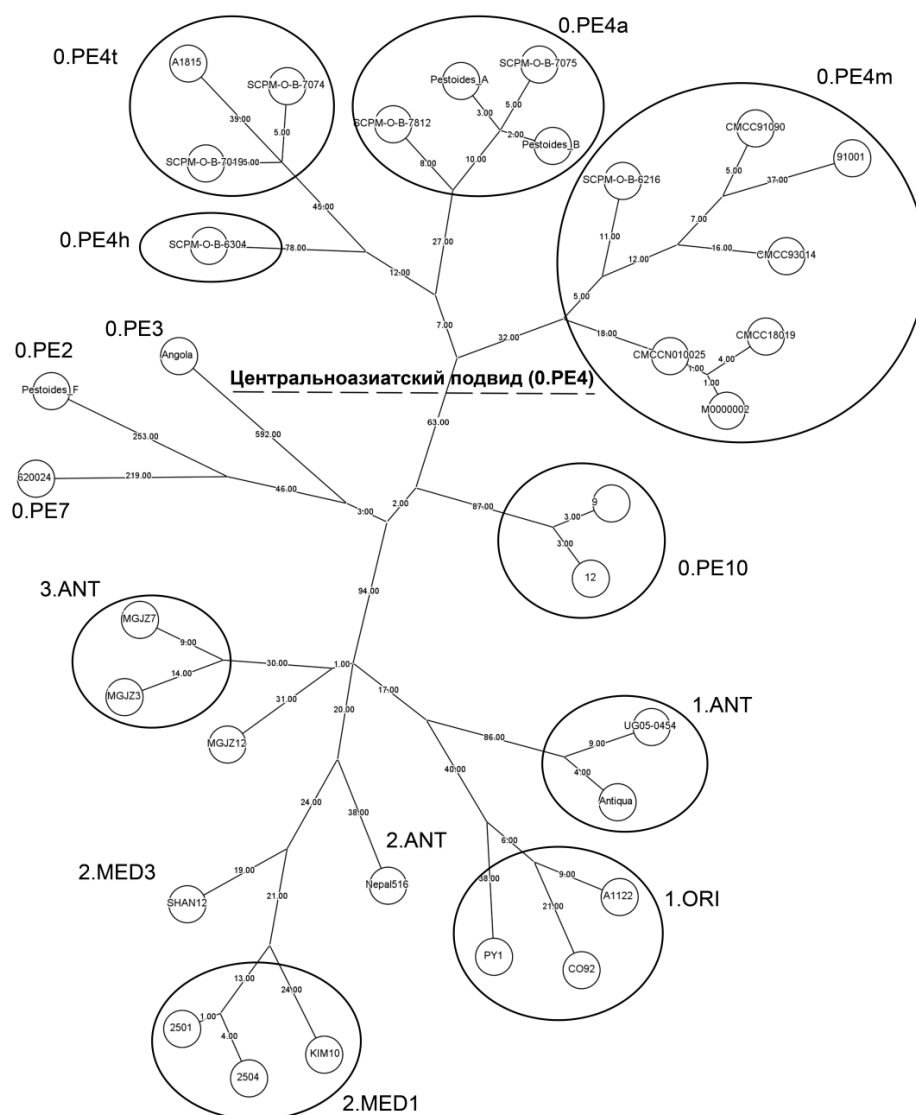
ПЦР-РВ выполняли в амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Все эксперименты, связанные с выявлением специфических ДНК мишеней методом ПЦР-РВ, проводили не менее трех раз.

Для выяснения причин авирулентности штаммов центральноазиатского подвида и для оценки уровня экспрессии основного фактора вирулентности *Y. pestis* – системы секреции третьего типа нами оптимизирована методика ОТ-ПЦР-РВ для штаммов *Y. pestis*.

Результаты исследований. Изложен анализ популяционной структуры штаммов центральноазиатского подвида возбудителя чумы по данным полногеномного секвенирования. Филогенетический анализ и построение дендрограмм проводили на основе выявления коровых SNPs в полногеномных последовательностях штаммов *Y. pestis* (таблица 1). Всего найден 2221 коровый полиморфный нуклеотид, с использованием которого проведено построение дендрограмм Maximum Likelihood (рисунок 1). Как видно из рисунка 1, на полученной дендрограмме Maximum Likelihood штаммы филогенетической ветви 0.PE4 составили единый кластер, удаленный от кластеров штаммов других филогенетических ветвей. Внутри этого кластера штаммы разделились на два отдельных подкластера, первый из которых представлен двумя штаммами *Y. pestis* 9 и *Y. pestis* 12, выделенными от больных в 2004 г. в китайской провинции Цинхай (Qinghai). Мы обозначили штаммы этого подкластера как 0.PE4q. Второй большой подкластер включает три ветви: 1. алтайские штаммы (алтайский подвид по старой классификации), названные нами 0.PE4a; 2. гиссарские штаммы (гиссарский подвид по старой

классификации), 0.PE4h и штаммы из Таласского высокогорного очага в Кыргызстане – 0.PE4t; 3. штаммы *microtus* из Китая, 0.PE4m.



Дендрограмма Maximum Parsimony, программа BioNumerics 7.6

Рисунок 1 – Популяционная структура и положение штаммов *Y. pestis* subspecies *central asiatica* (филогенетическая ветвь 0.PE4) в мировой филогении *Y. pestis* по данным анализа 2221 корового SNPs в полногеномных последовательностях 33 штаммов разных филогенетических ветвей.

Из дендрограмм Maximum Parsimony следует, что штаммы – 0.PE4a, 0.PE4h, 0.PE4t и 0.PE4m относятся к одной ветви эволюции, имеют 73 общих SNPs. В пределах кластера центральноазиатского подвида штаммы 0.PE4a (алтайские штаммы из очагов Горного Алтая в России и пограничных районов Монголии) имеют 27 уникальных SNPs. Они представляют достаточно однородную группу штаммов, отличия между которыми составляют от 2 до 10

SNPs, что свидетельствует о близком генетическом родстве алтайских штаммов, отнесенных по новой классификации к алтайскому биовару центральноазиатского подвида. Штаммы из второго подкластера имеют двенадцать общих SNPs, но далее гиссарские штаммы (Гиссарский высокогорный очаг, Таджикистан) и таласские штаммы (Таласский высокогорный очаг, Кыргызстан) далеко расходятся друг от друга. Геномы гиссарских штаммов включают 78 индивидуальных SNPs, а геномы таласских штаммов 45 индивидуальных SNPs. Штаммы *microtus* 0.PE4m образуют третий подкластер, отличающийся от других подкластеров 0.PE4 32 уникальными SNPs, с отличиями между штаммами в пределах самого подкластера в 1 – 18 SNPs. Также стало очевидным, что таласские штаммы 0.PE4t, которые включены в гиссарский биовар центральноазиатского подвида должны быть отнесены к отдельному биовару этого подвида – таласскому. Расширенный анализ популяционной структуры центральноазиатского подвида дает основание для выделения в нем четырех биоваров – алтайского, гиссарского, таласского и *microtus*.

Эти данные подтверждают необходимость объединения штаммов ветви 0.PE4 в один подвид – центральноазиатский с выделением в нем 4 биоваров – алтайского (ветвь 0.PE4a), *microtus* (ветвь 0.PE4m), гиссарского (0.PE4h) и таласского (0.PE4t).

Описан поиск ДНК мишеней и разработка способа дифференциации штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ. Для разработки способа дифференциации штаммов центральноазиатского подвида нами проведен поиск специфических indel мутаций, которые могли быть использованы в качестве маркерных для этих штаммов. В гене YPO2071 (позиция гена 2350433-2352337 от начала генома штамма CO92), кодирующем предположительно DEAD-бокс-хеликазу, в геноме всех штаммов центральноазиатского подвида из NCBI GenBank обнаружена делеция размером 509 п.н. с координатами 2351984-2351475. Эта делеция отсутствует у штаммов других подвидов возбудителя чумы (рисунок 2). На найденный вариабельный

участок в гене YPO2071 были рассчитаны олигонуклеотидные праймеры и зонд в формате TaqMan, которые позволили проводить разделение штаммов центральноазиатского подвида от других подвидов *Y.pestis*. Поиск ДНК мишеней проводили таким образом, чтобы на них можно было сконструировать универсальные праймеры, пригодные для их использования как в ПЦР-РВ, так и в ПЦР-ЭФ.

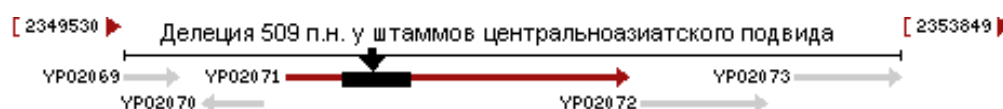


Рисунок 2 – Расположение гена YPO2071, кодирующего предположительно DEAD-бокс-хеликазу, в геноме штамма *Y.pestis* C092 из NCBI GenBank, с указанием локализации маркерной для центральноазиатского подвида делеции в 509 п.н.

Эффективность рассчитанных праймеров и зонда на ДНК мишень СА(-509) была проверена на 55 штаммах *Y. pestis* из природных очагов России, стран ближнего и дальнего зарубежья. Среди них исследовано 19 штаммов основного, 9 штаммов кавказского и 7 штаммов улегейского подвидов, а также 20 штаммов центральноазиатского подвида, включающих 6 алтайских, 6 гиссарских, 7 таласских штаммов и 2 штамма *microtus* из Монголии.

Выводы

1. Анализ популяционной структуры штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 0.РЕ4 и установленная общность фенотипических и генетических характеристик доказывают необходимость объединения этих штаммов в один (центральноазиатский) подвид. В состав центральноазиатского подвида входят 4 отдельные, но родственные популяции штаммов – алтайского (0.РЕ4а), *microtus* (0.РЕ4м), гиссарского (0.РЕ4h) и таласского (0.РЕ4t) биоваров.

2. Найдена ДНК мишень, эффективная для дифференциации штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида. Это делеция в гене YPO2071 протяжённостью в 509 п.н.

3. Рассчитаны олигонуклеотидные примеры и зонд, определены оптимальные условия ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР-РВ.

4. Эффективность разработанного способа дифференциации штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида доказана при анализе 55 штаммов *Y. pestis* разных подвидов и биоваров, в том числе 20 штаммов этого подвида.

5. Оптимизирована для штаммов *Y. pestis* методика анализа экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР-РВ.

В перспективе будут продолжены исследование по разработке способов дифференциации штаммов центральноазиатского подвида и входящих в него штаммов алтайского, гиссарского, таласского и *microtus* биоваров методом SNP-ПЦР-РВ типирования. Будут продолжены исследования по сравнительному анализу генов вирулентности и уровня их экспрессии у штаммов центральноазиатского подвида для выяснения причин их авирулентности для людей. Полученные данные будут способствовать повышению эффективности мониторинга чумы в природных очагах на территории Российской Федерации и сопредельных государств.

Список использованных источников

1. Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago / S. Rasmussen [et al.] // Cell. 2015. N. 163(3). P. 571-582.

2. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* / M. Achtman [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 1999. V. 96(24). P. 14043-14048.

3. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств / Г. А. Ерошенко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2015. № 4. С. 58-64.

4. Онищенко, Г. Г. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Г. Г. Онищенко, В. В. Кутырева М. : Медицина, 2009. 472 с.

