

Мол. Генет.Микробиол.Вирусол. 2008. №1: 8-14

**Д.С. Юров, В.И. Пушкарева, С.А. Ермолаева**

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ *LISTERIA MONOCYTOGENES*, С ПОМОЩЬЮ БИОИНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА**

**ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.**

**Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва**

**Для корреспонденции Светлана Александровна Ермолаева, (499) 190-43-75**

Постгеномный период развития биотехнологии позволяет использовать биоинформационные подходы для выявления новых факторов, участвующих в различных процессах жизнедеятельности организмов. В данной работе биоинформационные подходы были использованы для выявления ранее неописанных белков, влияющих на вирулентность грам-положительной бактерии *Listeria monocytogenes*. На основе разработанных критериев были отобраны несколько кандидатных открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих пептидазы. Влияние кодируемых этими ОРС белков на вирулентность *L. monocytogenes* было доказано экспериментально, путем внутривенного заражения мышей сконструированными штаммами, несущими сайт-специфические инсерционные мутации в исследуемых генах. Полученные штаммы были охарактеризованы по скорости роста, морфологии и продукции поверхностных белков.

## Введение

Постгеномный этап развития биотехнологии предоставляет расширенные возможности для выявления новых бактериальных факторов патогенности. Доступность баз данных, содержащих расшифрованные последовательности бактериальных геномов, а также значительное число специализированных программных продуктов позволяют найти гомологию исследуемого объекта с другими структурами, предсказать пространственную конфигурацию и функции биомолекул, что в целом дает возможность экспериментатору значительно сузить круг возможных мишеней для дальнейшего исследования. В представляемой работе в базе данных, содержащих последовательность генома *L. monocytogenes*, был проведен биоинформационный поиск открытых рамок считывания, кодирующих полипептиды, имеющие высокий уровень гомологии к пептидазам на уровне первичной последовательности.

Термин пептидазы по рекомендации Международного Союза Биохимии и Молекулярной Биологии используется для обозначения белков, гидролизующих пептидные связи. Согласно данным, полученным при анализе расшифрованных бактериальных геномов, гены, кодирующие пептидазы составляют до 2 % всех открытых рамок считывания (ОРС) ([http://merops.sanger.ac.uk/about/about\\_frm.htm](http://merops.sanger.ac.uk/about/about_frm.htm)). Пептидазы играют важную роль в жизнедеятельности всех живых организмов. У патогенных бактерий пептидазы часто вносят существенный вклад в вирулентность.

Функционально важные для вирулентности пептидазы патогенных бактерий могут либо сами являться токсинами, либо участвовать в процессинге других факторов патогенности, либо быть задействованы в перестройке метаболизма бактерий во время инфекции. Существенная и явная роль в патологии человека протеолитических токсинов, таких, как летальный фактор (металлопротеаза) *Bacillus anthracis* или нейротоксины А-С *Clostridium botulinum* и столбнячный токсин *C. tetani* (цинкметаллопротеазы)

(Супотницкий и др., 2000; Езепчук, 1985), явилась основанием глубокого и тщательного изучения строения и метаболической активности этих ферментов. В то же время нельзя недооценивать роль пептидаз, вовлеченных в процессинг других факторов патогенности и участвующих в перестройках общего метаболизма бактериальной клетки, отсутствие которых может коренным образом влиять на вирулентность бактерий.

Целью нашей работы была идентификация пептидаз, важных для вирулентности грам-положительной бактерии *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* – факультативный внутриклеточный паразит, являющийся возбудителем тяжелого заболевания человека и животных – листериоза. В группу риска по листериозу входят пожилые люди, беременные женщины и новорожденные, люди с иммунодефицитными состояниями. Важность листериозной инфекции определяется тяжестью клинических проявлений и высокой смертностью (до 20-25 %) среди заболевших (Тартаковский и др., 2002).

Интенсивное изучение биологии *L. monocytogenes* начиная с 1990-х гг., позволило выявить основные факторы патогенности, необходимые бактерии для проникновения в клетку, внутриклеточного размножения и межклеточного перемещения (Vazquez-Boland et al., 2001; Тартаковский и др. 2002). Ни один из этих факторов не обладает протеолитической активностью. Однако для одного из основных факторов патогенности, лецитиназы, была описана металлопротеаза (Mpl), вовлеченная в ее процессинг (Marquis et al., 2000). Отсутствие Mpl уменьшает вирулентность *L. monocytogenes* аналогично отсутствию самой лецитиназы. Нарушение функции сигнальных пептидаз I типа, участвующих в процессе секреции основных факторов патогенности, значительно уменьшает вирулентность бактерии (Reglier-Puppet et al., 2003; Bonnemain et al., 2004). Освобождение с бактериальной поверхности важного фактора патогенности *L. monocytogenes*, белка ActA, является результатом активности неидентифицированной пептидазы (Сапенко, 2006). Все сказанное свидетельствует о важности пептидаз в вирулентности листерий. Однако до настоящего времени систематического изучения

пептидаз *L. monocytogenes* проведено не было. Данная работа частично заполняет этот пробел.

## **Материалы и методы**

### **Биоинформационный анализ**

Пептидазы рода *Staphylococcus* (последовательности которых были получены на сайте NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> по результатам ввода текстового запроса «*Staphylococcus peptidase*») были взяты за основу для поиска предполагаемых пептидаз *L. monocytogenes*. Определение гомологии между найденными пептидазами *Staphylococcus* и ОРС *L. monocytogenes* штамма EGD<sub>e</sub>, содержащимися в базе данных генома *L. monocytogenes* ListiList института Пастера (<http://www.pasteur.fr>), проводилось с использованием программы BLAST. Отбирались только те ОРС *L. monocytogenes*, для которых оценка гомологии с белками рода *Staphylococcus* была не более  $10^{-3}$  (e-value  $\leq 10^{-3}$ ). Ранее описанные в литературе ОРС, имеющие собственные наименования в базе данных ListiList, из дальнейшего анализа были исключены.

Предсказание трансмембранных доменов и расположения молекулы белка относительно плазматической мембраны определяли с помощью web-приложения PredictProtein (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>). Наличие регуляторной области, характерной для генов, кодирующих факторы патогенности *L. monocytogenes* (PrfA-box) определяли по таблице «Предполагаемые PrfA-box в геноме *L. monocytogenes* EGD-e» (Glaser et al., 2001).

### **Бактериальные штаммы и условия выращивания**

Для работы были использованы штаммы *L. monocytogenes* EGD<sub>e</sub> (штамм любезно предоставлен Prof. J.A. Vazquez-Boland, Университет г. Бристоля, Великобритания) и его производные GIM0028, GIM0961, GIM1493, GIM2077, полученные в данной работе (см. ниже), в качестве промежуточного хозяина был использован штамм JM109 *Escherichia coli*. *L. monocytogenes* выращивали в среде Brain-Heart Infusion (BHI, BD, США), *E. coli* – в среде LB (BD, США). Бактерии рутинно культивировали при 37°C с шутелированием.

Рекомбинантные штаммы культивировали в присутствии эритромицина (300 мкг/мл для *E. coli* и 10 мкг/мл для *L. monocytogenes*).

#### *Сайт-специфический мутагенез*

Схема сайт-специфического мутагенеза показана на рисунке 1.

Аmplификацию внутренних фрагментов выбранных генов проводили с использованием ПЦР на хромосомной ДНК *L. monocytogenes*, выделенной с помощью набора Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, США) с праймерами lmo0028F: ATTTGTTGTTCTGATGGTCGG; lmo0028R: TCCTCCAATAACTTCGCCACC, lmo0961F: TTGGTGGACAGGCTTTCGGAC; lmo0961R: CGACAACCTCTGCGCACAACCG; lmo1493F: ATGTTTCGGAGTGGGATGTTC; lmo1493R: TTGAAAACCTGCCTGGCGACC; lmo2077F: AATGAGGGTGTCTGTTATCGGC; lmo2077R: CCGCTACCAAGGACTTCCG; в буфере, содержащем 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50мкМ dNTP, по 15 пМ каждого праймера, 0,2 ед фермента Taq-полимеразы (Бионем, Россия) по следующей программе: 1й цикл - 94°C, 2 мин, 2-ой цикл - 94°C, 55°C, 72°C, по 5 сек, 3-ий цикл - 94°C, 55°C, 72°C, по 1 сек, 4-ый цикл - 94°C и 55°C по 20 сек, 72°C – 10 мин.

Продукты ПЦР клонировали в промежуточном векторе, входящим в коммерческий набор pGEM®-T Easy Vector System («Promega», США), а затем переклонировали в вектор pLSV<sub>1</sub> по сайтам EcoRI и SalI. Челночный вектор pLSV<sub>1</sub> имеет два сайта начала репликации: для грам-отрицательных и грам-положительных бактерий, - причем начало репликации в грам-положительных бактериях термочувствительное, что позволяет стабильно поддерживать плазмиду в бактериальных клетках только при температуре не выше 30°C (Wuenschel et al., 1991). Трансформацию рекомбинантных плазмид проводили методом электропорации на аппарате GenPulser (BioRad). В *E. coli* трансформировали как описано в инструкции к прибору, в *L. monocytogenes* – как описано в (Park et al., 1990).

Эритромицин-устойчивые колонии *L. monocytogenes*, содержащие плазмиду pLSV<sub>1</sub>::вставка, отобрали при 30°C. Отбор инсерционных мутантов проводили путем

выращивания плазмидо-содержащих бактерий при непермиссивной температуре (42°C) на среде, содержащей эритромицин.

Наличие инсерции подтверждали с помощью ПЦП с праймерами: lmo0028Fin: AACAGCTTGGGCAGTAACTTG; lmo0028Rin: CACATATGAGGCAAGCTTCG; lmo0961Fin: CGGATGATGTGAAATAGGGGG; lmo0961Rin: CCACGGCACGGCGATATACG; lmo1493Fin: GCGGCTCTGAAGAATTACAAC; lmo1493Rin: GCGACTGTACCTGGAGCCC; lmo2077Fin: GTGAGCGTGGTTGAATGGGC; lmo2077 Rin: CCATTTACTCTCCGCTTCTGC, участки связывания для которых расположены за пределами фрагмента, встроенного в вектор pLSV<sub>1</sub>, и фланкируют предполагаемые вставки. Наличие вставки поддерживали культивированием бактерий в присутствии эритромицина.

#### *Измерение скорости роста бактерий*

Выращенную в течение ночи культуру *L. monocytogenes* разводили в 100 раз в свежей среде ВНИ. Скорость роста определяли по изменению оптической плотности, которую определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-26 («ЛОМО») при длине волны 600 нм. Измерения проводили каждый час.

#### *Определение вирулентности штаммов *L. monocytogenes**

Вирулентность мутантных штаммов изучали на мышах линии balbC (♀, 14-16 грамм). Для инфекции использовали бактериальную культуру в экспоненциальной фазе. Группам из пяти животных вводили через хвостовую вену 100 мкл бактериальной суспензии в физиологическом растворе с концентрацией приблизительно 10<sup>5</sup> КОЕ/мл. Точная доза была определена высевами соответствующих разведений и составила КОЕ/мл: EGDe (дикий тип) – 6,5x10<sup>4</sup>; GIM0028 – 9,12x10<sup>4</sup>; GIM0961 – 1,1x10<sup>5</sup>; GIM1493 – 1,2x10<sup>5</sup>; GIM2077 – 8,1x10<sup>4</sup>. Забой и вскрытие производили на 3-й день после заражения.

#### *Изучение морфологии клеток*

Морфологию бактериальных клеток изучали методом микроскопирования (увеличение 12x100) окрашенных по Граму мазков.

### *Определение цитотоксичности L. monocytogenes.*

Цитотоксичность определяли по влиянию стационарной культуры *L. monocytogenes* на вегетативные клетки реснитчатого простейшего *Tetrahymena pyriformis* как описано в работе (Пушкарева, 1994).

### *Электрофорез поверхностных белков*

*L. monocytogenes* выращивали в среде ВНИ. Поверхностные белки получали и разделяли на 10% SDS-PAGE гель-электрофорезе как описано (Ермолаева и др., 2000)

## **Результаты**

### *Результаты биоинформационного поиска*

В результате биоинформационного поиска, проведенного, как описано в Материалах и методах, в геноме *L. monocytogenes* было выявлено 59 ОРС, кодирующих полипептиды, имеющие гомологию с пептидазами стафилококка.

Нашей следующей задачей было выбрать среди них те, продукты которых могли бы быть вовлечены в процесс инфекции или процессинг факторов патогенности. Исходя из имеющихся на сегодняшний день знаний о факторах патогенности *L. monocytogenes*, а также представлений о процессинге факторов патогенности бактерий, мы предположили, что пептидазы, участвующие в этих процессах либо секретируются, либо представлены на поверхности бактериальной клетки. Вполне возможно, что экспрессия генов этих пептидаз контролируется теми же регуляторными факторами, что и экспрессия генов факторов патогенности. На основании этих предположений, с целью выявления вовлеченных в патогенность пептидаз из 59 найденных, были составлены и применены следующие критерии отбора: во-первых, наличие трансмембранного домена и/или лидерного пептида; во-вторых, наличие регуляторных областей, характерных для генов патогенности; данный критерий мы рассматривали как необязательный, поскольку пептидаза, участвующая в процессинге факторов патогенности, не обязательно является специфической и может быть задействована в других процессах бактериальной клетки; и,



наконец, расположение активного центра пептидазы на поверхности бактерии; критерий, необходимый для тех пептидаз, которые участвуют в «созревании» поверхностных факторов патогенности бактерии. ОРС была отобрана как кандидатная в случае соответствия как минимум двум из трех критериев, причем обязательным являлся первый. При предсказании трансмембранных доменов и топологии активного центра принимались во внимание структуры с наличием хотя бы одного трансмембранного домена и наружной или однозначно неопределенной топологией активного центра.

В результате были отобраны 10 кандидатных ОРС, представленных в таблице 1. Результаты поиска были сравнены с данными биоинформационного анализа последовательностей, представленными в базе данных MEROPS – специальной базе данных, содержащей информацию по пептидазам ряда организмов (<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>). Все идентифицированные нами кандидатные ОРС содержались также в MEROPS (таблица 1).

*Получение и фенотипическая характеристика штаммов *L. monocytogenes*, имеющих сайт-специфические мутации*

Для оценки вклада кандидатных пептидаз в вирулентность *L. monocytogenes* необходимо было сконструировать штаммы с инактивированными генами, представленными в таблице 1. В силу большой трудоемкости изучения одновременно всех кандидатов из них случайным образом было выбрано четыре: *lmo0028*, *lmo0961*, *lmo1493*, *lmo2077*. Методом сайт-специфического мутагенеза (см. Материалы и методы) на основе штамма EGDe было получены мутантные штаммы, несущие инсерции в данных генах. Штаммы были обозначены GIM0028, GIM0961, GIM1493, GIM2077 в соответствии с генами, имеющими инсерционные мутации.

Местоположение инсерций в ОРС были выбраны таким образом, чтобы инактивировать активный центр гипотетических пептидаз. Для *lmo0028* инсерцией были отделены два аминокислотных остатка, входящих в активный центр (Glu200 и His286),

для *lmo1493* – Glu390, аминокислота активного сайта, и три металлсвязывающих остатка (His389, His393 и Glu416) (Рис. 2А, В). Поскольку для *lmo0961* и *lmo2077* отсутствуют данные о структуре их гипотетических активных центров, то место инсерции было выбрано таким образом, чтобы максимально уменьшить участок экспрессирующегося гена после введения вставки (Рис. 2Б, Г).

В ходе получения клонов с инсерциями было отмечено значительное снижение скорости роста бактерий с мутацией в гене *lmo 2077*. Так, при росте гомологичных рекомбинантов на питательном агаре отсутствовал (какой-либо видимый глазу) рост культуры через 16 – 18 часов после засева. Штамм GIM2077 был изолирован после увеличения времени культивирования рекомбинантов до 48 часов. Мы предположили, что продукт гена *lmo2077* может влиять на скорость роста *L. monocytogenes* в определенных условиях. Действительно, определение скорости роста полученных мутантных штаммов выявило значительное отставание в скорости роста штамма с мутацией в гене *lmo2077*. Низкая скорость роста штамма сохранялась в разных средах, в том числе LB и Brain Heart Infusion (BHI), а также в присутствии 0,025 М глюкозы (рис. 3). Мутации в других генах не влияли или влияли незначительно на скорость роста.

Изучение морфологии бактериальных клеток выявило, что мутации в генах *lmo0028* и *lmo1493* повлияли на форму клеток бактерий (рис. 4). Клетки выглядели более вытянутыми, с заметными поперечными перетяжками. Изменение морфологии более ярко было выражено у штамма GIM0028, и в меньшей степени – у штамма GIM1493. По сравнению со штаммом дикого типа мутации в генах *lmo0961* и *lmo2077* значимых изменений в морфологию бактериальных клеток не внесли.

*Определение вирулентности штаммов L. monocytogenes с инсерционными мутациями.*

Вирулентность штаммов GIM0028, GIM0961, GIM1493, GIM 2077 была изучена на модели внутривенного заражения мышей линии balbC. Осмотр органов брюшной полости,

печени и селезенки, на третьи сутки после заражения показал, что у животных, зараженных штаммами GIM0961 и GIM2077, наблюдались выраженные гепато- и спленомегалия, обширные зоны некроза в печени и селезенке. Степень поражения внутренних органов у мышей, зараженных этими штаммами, превышала изменения, наблюдаемые у животных, зараженных штаммом дикого типа EGDe (рис. 5). У мышей, зараженных штаммами GIM0028 и GIM1493, зон некроза в печени и селезенке практически не наблюдалось, хотя и наблюдалась гиперплазия тканей селезенки и печени.

Повышенная вирулентность штаммов GIM0961 и GIM2077 могла быть следствием увеличенной продукции факторов патогенности. Ранее нами было установлено, что увеличение уровня продукции факторов патогенности *L. monocytogenes* приводит к характерным изменениям в спектрах поверхностных и секретируемых белков (Ермолаева и др., 2000). Однако сравнение спектров поверхностных белков штамма дикого типа EGDe и мутантных штаммов не выявило различий между ними (Рис. 6).

Другим, более чувствительным способом определения изменения продукции факторов патогенности, является определение цитотоксичности бактерий для эукариотических клеток. В частности, цитотоксичность *L. monocytogenes* для свободноживущего простейшего *Tetrahymena pyriformis* определяется продукцией факторов патогенности листериолизина O и лецитиназы. В присутствии бактериальной культуры с повышенной цитотоксичностью вегетативные клетки *T. pyriformis* теряют подвижность, изменяют форму и подвергаются разрушению и/или инцистированию (Пушкарева, 1994). При изучении цитотоксичности дикого штамма EGDe и мутантных штаммов GIM0961 и GIM2077 на модели *T. pyriformis* отличий между ними выявлено не было. Таким образом, увеличение вирулентности этих штаммов, по-видимому, не связано с увеличением продукции цитотоксических факторов патогенности. В настоящий момент проводятся дальнейшие исследования для определения механизмов, приводящих к увеличению вирулентности, вызванному мутациями в генах *lmo2077* и *lmo0961*.

## Обсуждение

Настоящая работа была посвящена применению биоинформационного подхода для выявления ранее не идентифицированных факторов патогенности *L. monocytogenes*.

Биоинформационные подходы были использованы для выявления поверхностных белков, имеющих гомологию с пептидазами. Выбор пептидаз в качестве мишени биоинформационного анализа объясняется, во-первых, наблюдениями, что ряд факторов патогенности *L. monocytogenes* подвергается пострансляционной модификации, включающей гидролитическое расщепление (Marquis et al., 2000; Сапенко, 2006); во-вторых, высокой степенью изученности структурных особенностей данного класса белков; в-третьих, значительным числом пептидаз в бактериальном геноме.

В результате биоинформационного поиска в геноме *L. monocytogenes* было идентифицировано 59 ранее не описанных в литературе открытых рамок считывания ОРС, кодирующих полипептиды, имеющие высокую степень гомологии с ранее описанными пептидазами грам-положительных бактерий. Отбор только не описанных ранее ОРС исключил из дальнейшего анализа сигнальные пептидазы I и II типа, роль которых в вирулентности *L. monocytogenes* была показана ранее (Reglier-Puppet et al., 2003; Bonnemain et al., 2004). Среди отобранных ОРС были выбраны те, продукты которых предположительно находятся на бактериальной поверхности и, таким образом, могут участвовать в процессинге секретируемых и поверхностных факторов патогенности. Из десяти кандидатных ОРС четыре были подвергнуты сайт-специфическому мутагенезу, в результате чего были получены мутантные штаммы *L. monocytogenes* с инсерциями в изучаемых генах. Анализ полученных штаммов на модели экспериментального заражения лабораторных мышей выявил изменения в вирулентности всех четырех мутантных штаммов.

Два штамма, GIM0028 и GIM1493, с мутациями в генах *lmo0028* и *lmo1493*, демонстрировали снижение вирулентности. Изучение морфологии этих штаммов выявило

изменение формы бактериальных клеток в сторону существенного удлинения. По наличию поперечных перетяжек можно предположить, что данные мутации привели к нарушениям в расхождении бактериальных клеток после деления. Аналогичную форму клеток наблюдали у мутантов *L. monocytogenes*, дефектных по гену *iap*, кодирующему поверхностный белок Р60. Уменьшение вирулентности штаммов, дефектных по гену *iap*, связано с нарушениями внутриклеточной подвижности не разошедшихся после деления бактерий (Pilgrim et al., 2003). Возможно, уменьшение вирулентности штаммов, дефектных по *lmo0028* и *lmo1493* вызвано аналогичным механизмом.

Наиболее интересной нам показалась мутация в гене *lmo2077*, которая вызывала резкое замедление скорости роста бактерий *in vitro*, в то время как вирулентность штамма повышалась. Увеличение вирулентности не было связано с увеличением продукции факторов патогенности и цитотоксичности. Мы предположили, что данная мутация затрагивает перестройки общего метаболизма бактерии, делая ее более приспособленной для роста в макроорганизме. Предварительные результаты свидетельствуют, что нарушение функции *lmo2077* приводило к снижению скорости роста бактерий в аэробных условиях и улучшение в условиях минимального присутствия O<sub>2</sub> и повышенного CO<sub>2</sub>. В настоящее время проводится работа по установлению механизмов, лежащих в основе наблюдаемого фенотипа штамма с мутацией в этом гене.

## Список литературы

1. Езепчук Ю.В., Патогенность как функция биомолекул. – М., 1985.
2. Ермолаева С.А., Белый Ю., Тартаковский И.С. ЖМЭИ. 2000. № 5, с. 3-6
3. Пушкарева В.И. Патогенные бактерии в почвенных и водных сообществах. Дис. докт. биол. наук. М.: НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 1994, 210 с.
4. Сапенко Т.П. Механизмы и роль освобождения поверхностного белка ActA во взаимодействии *Listeria monocytogenes* с эпителиальными клетками. М.: НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 2006, 102 с.
5. Супотницкий М.В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии. – М: Вузовская книга ., 2000.
6. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А., Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. – М: Медицина для всех, 2002: (8 – 15).
7. Bonnemain C, Raynaud C, Reglier-Poupet H, Dubail I, Frehel C, Lety MA, Berche P, Charbit A. Mol Microbiol. 2004, 51(5):1251-66.
8. Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, K., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchad, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez-N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kupkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.-C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J., and P. Cossart. 2001. Science. 294:849-852
9. Marquis H., Hager E. J.. Mol Microbiol. 2000, 35(2): 289–298.
10. Park, S. F., and G. S. A. B. Stewart. Gene. 1990, 94:129–132.
11. Pilgrim S, Kolb-Maurer A, Gentschev I, Goebel W, Kuhn M. Infect Immun. 2003, 71(6):3473-84.
12. Reglier-Poupet H, Frehel C, Dubail I, Beretti JL, Berche P, Charbit A, Raynaud C. J Biol Chem. 2003, 278(49):49469-77.
13. Vázquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J., Clin Microbiol Rev. 2001; 14(3): 584–640
14. Wuenscher MD, Kohler S, Goebel W, Chakraborty T. Mol Gen Genet. 1991, 228(1-2):177-82.

## **Резюме**

Постгеномный период развития биотехнологии позволяет использовать биоинформационные подходы для выявления новых факторов, участвующих в различных процессах жизнедеятельности организмов. В данной работе биоинформационные подходы были использованы для выявления ранее неописанных белков, влияющих на вирулентность грам-положительной бактерии *Listeria monocytogenes*. На основе разработанных критериев были отобраны несколько кандидатных открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих пептидазы. Влияние кодируемых этими ОРС белков на вирулентность *L. monocytogenes* было доказано экспериментально, путем внутривенного заражения мышей сконструированными штаммами, несущими сайт-специфические инсерционные мутации в исследуемых генах. Полученные штаммы были охарактеризованы по скорости роста, морфологии и продукции поверхностных белков.

## **Resume**

Yurov D.S., Ermolaeva S.A., Pushkareva V.I.

Gamaleya Research Institute of epidemiology and microbiology RAMS

The postgenomic stage of biotechnology allows using of bioinformatic approaches to reveal previously unknown factors involved in different processes. In this work, bioinformatic approaches were applied to analysis of factors involved in *L. monocytogenes* virulence. Several open reading frames (ORFs) were identified in *L. monocytogenes* genome, which encode proteins with high level homology to bacterial peptidases and which match to developed criteria. The influence of the ORFs on virulence was demonstrated by infection of mice with *L. monocytogenes* strains mutated in the studied genes. Obtained strains were characterized by growth rates, morphology and production of surface proteins.



Таблица 1. Кандидатные пептидазы

№	Идентификатор в базе данных ListiList <sup>1</sup>	Идентификатор в базе данных Merops	Принадлежность к структурному семейству по Merops	Тип каталитической активности
1	lmo0028	MER16200	S66	сериновая пептидаза
2	lmo0493	MER59721	S15	сериновая пептидаза
3	lmo0961	MER16038	U32	неизвестный тип каталитической активности
4	lmo1217	MER16027	M42	Металлопротеаза
5	lmo1375	MER15992	M20B	Металлопротеаза
6	lmo1493	MER16012	M3B	Металлопротеаза
7	lmo1611	MER16028	M42	Металлопротеаза
8	lmo1916	MER16000	S12	сериновая пептидаза
9	lmo2077	MER16002	M22	Металлопротеаза
10	lmo2504	MER16022	M23	Металлопротеаза

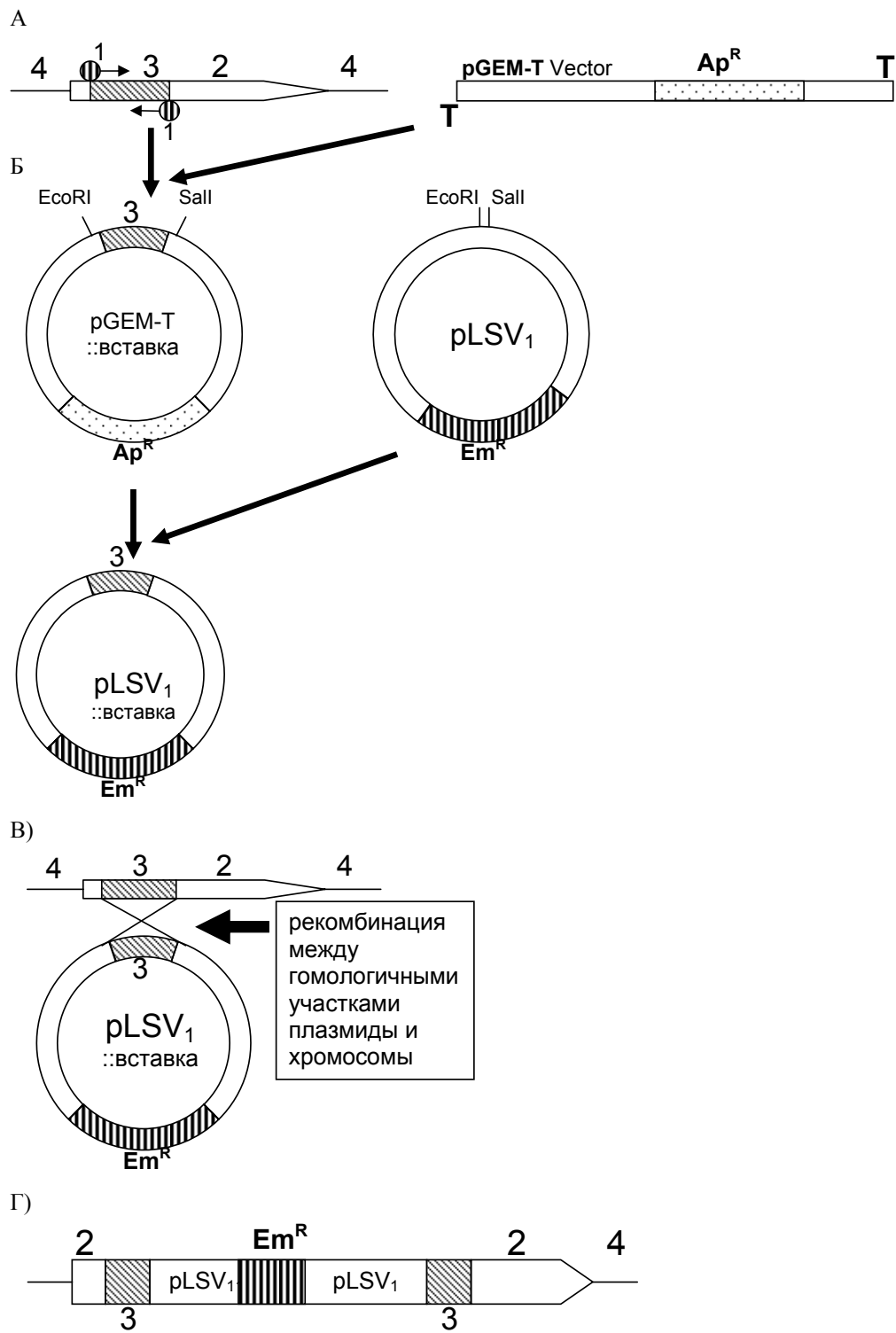
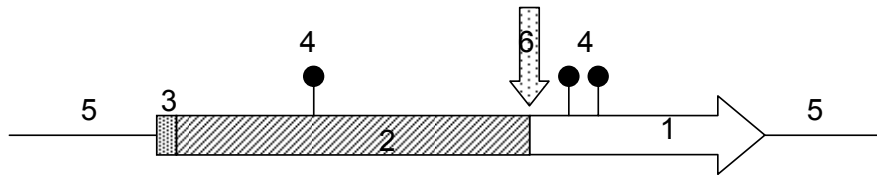
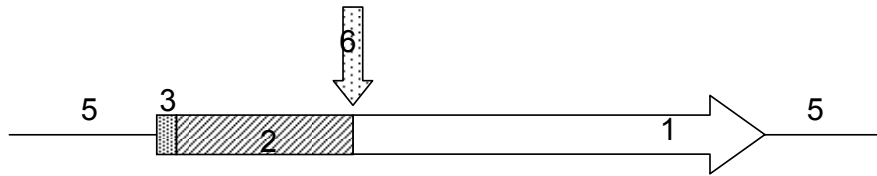


Рисунок 1

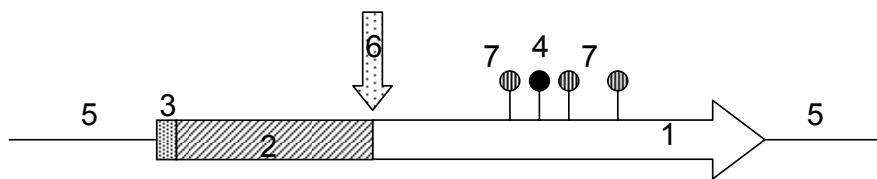
A)



Б)



В)



Г)

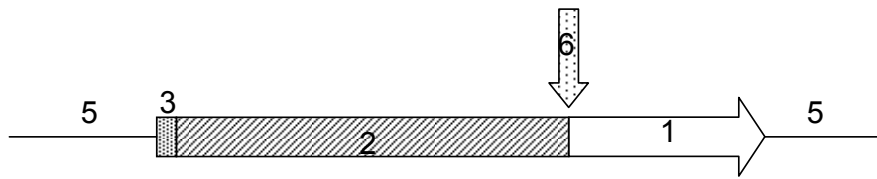
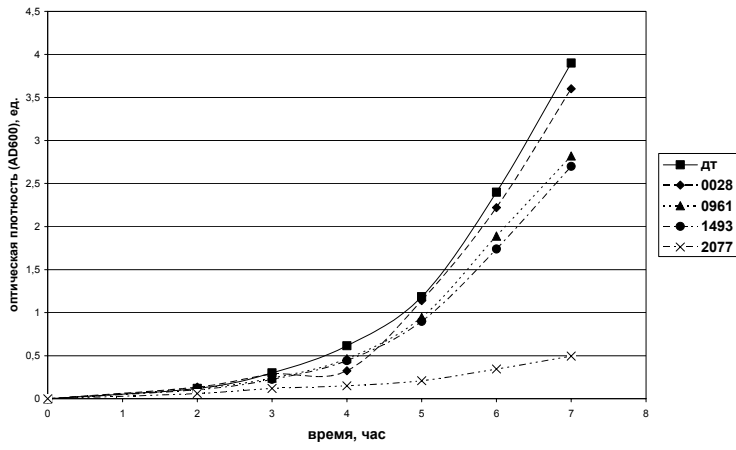
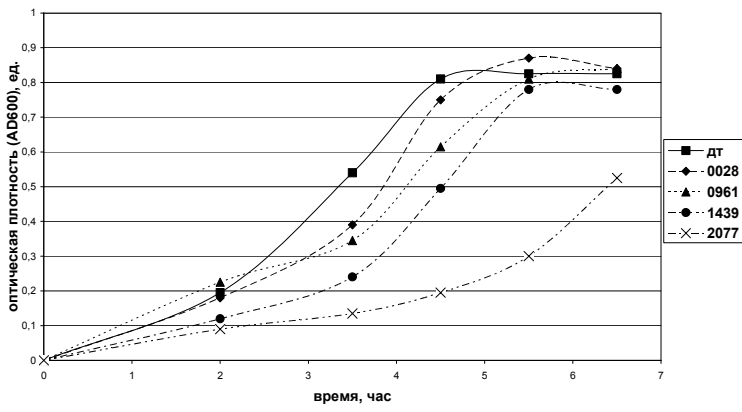


Рисунок 2.

А)



Б)



В)

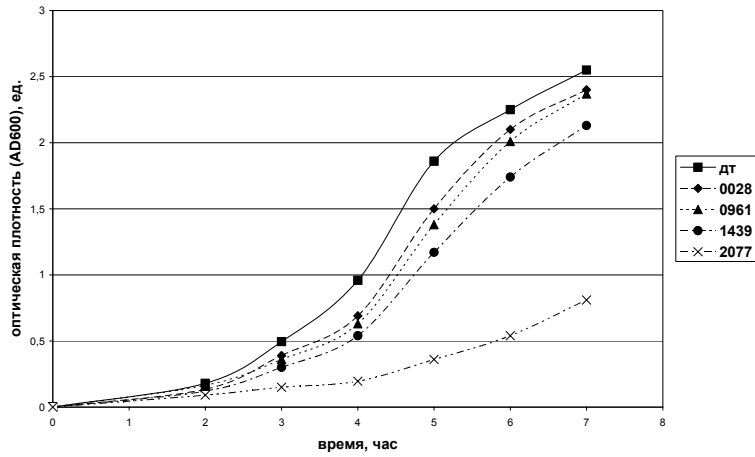
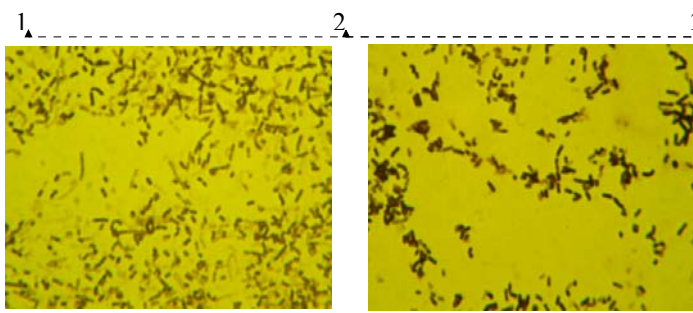
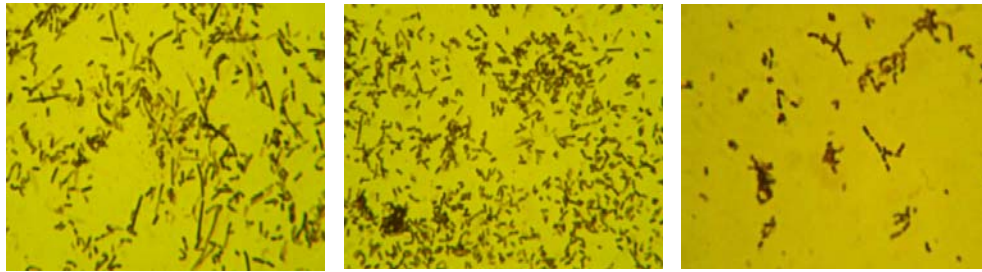


Рисунок 3.



Отформатировано: Шрифт: (по умолчанию) Times New Roman, 12 пт, не полужирный

Отформатировано: Шрифт: (по умолчанию) Times New Roman, 12 пт, не полужирный

Отформатировано: Шрифт: (по умолчанию) Times New Roman, 12 пт, не полужирный

Отформатировано: Шрифт: (по умолчанию) Times New Roman, 12 пт, не полужирный

Отформатировано: Шрифт: (по умолчанию) Times New Roman, 12 пт, не полужирный

Рисунок 4.

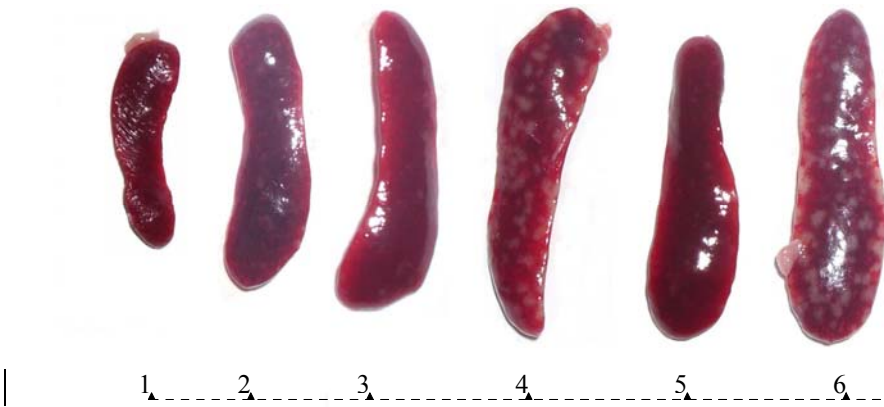


Рисунок 5.

- Отформатировано: русский (Россия)
- Отформатировано: русский (Россия)
- Отформатировано: русский (Россия)
- Отформатировано: русский (Россия)
- Отформатировано: русский (Россия)
- Отформатировано: русский (Россия)

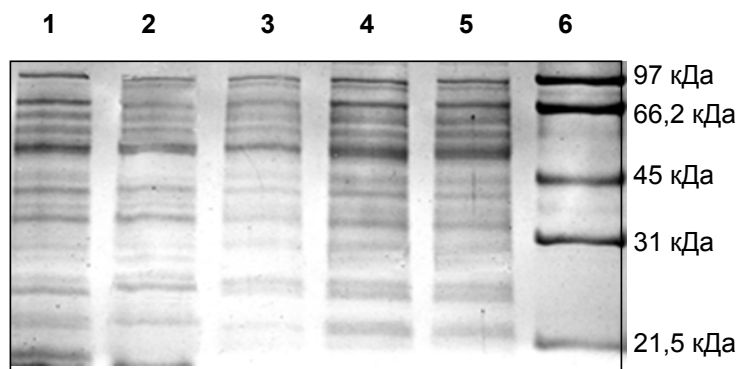


Рисунок 6.

## Подписи к рисункам

Рисунок 1. Схема введения инсерционных мутаций в изучаемые гены методом сайт-специфического мутагенеза. А – амплификация фрагмента хромосомного гена *L. monocytogenes* методом ПЦР и клонирование продукта ПЦР в промежуточный вектор, pGEM-T, полученная плаزمида pGEM-T::вставка поддерживается в промежуточном хозяине *E. coli*; Б – переклонирование фрагмента из промежуточного вектора в челночный вектор pLSV<sub>1</sub> по сайтам EcoRI и SalI, отбор плазмиды, содержащей вставку, производится в промежуточном хозяине *E. coli*; полученная плаزمида pLSV<sub>1</sub>::вставка вводится в клетки *L. monocytogenes*, где может поддерживаться при условии выращивания культуры при перmissive температуре (30 °C); В – гомологичная рекомбинация между плазмидной и хромосомной копиями фрагмента гена; Г – в результате гомологичной рекомбинации происходит инсерция плазмиды в изучаемый ген, отбор клонов *L. monocytogenes* с инсерцией производится путем выращивания культуры при неpermissive температуре (42 °C) в присутствии антибиотика (Em). Цифрами обозначены: 1 – праймеры, 2 – ген-мишень, 3 – амплифицируемый участок гена, 4 – фланкирующий участок хромосомы. pGEM-T – pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (промежуточный вектор), Ap<sup>R</sup> – ген, ответственный за устойчивость к ампициллину, pLSV<sub>1</sub> – челночный вектор pLSV<sub>1</sub>, Em<sup>R</sup> - ген, ответственный за устойчивость к эритромицину.

Рисунок 2. Схема введения мутаций в гены: А) lmo0028, Б) lmo0961, В) lmo1493, Г) lmo2077. Длинная горизонтальная стрелка включая заштрихованные области – ОРС гена, 1 – неэкспрессируемый после инсерции участок гена, 2 – экспрессируемый участок гена, 3 – область, кодирующая лидерный пептид, 4 – триплет, кодирующий аминокислотные остатки активного центра, 5 – фланкирующая последовательность, 6 – место введения инсерции, 7 – триплет, кодирующий аминокислотные остатки металлосвязывающего центра.



Рисунок 3. Скорость роста дикого и мутантных бактериальных штаммов на различных питательных средах: А) в ВНІ, Б) в LB, В) в LB+25mM глюкозы. дт – штамм *L.monocytogenes* дикого типа EGDe, 0028 –штамм GIM0028, 0961 –штамм GIM0961, 1493 – штамм GIM1493, 2077 – штамм GIM2077.

Рисунок 4. Влияние мутаций в соответствующих генах *L.monocytogenes* на морфологию бактериальной клетки. На рисунке изображены фотографии мазков окрашенных по Граму бактерий. Увеличение в 1200 раз. 1 – штамм GIM0028, 2 – штамм *L.monocytogenes* дикого типа EGDe, 3 – штамм GIM0961, 4 – штамм GIM1493, 5 – штамм GIM2077.

Рисунок 5. Селезенки мышей, зараженных диким и мутантными штаммами *L.monocytogenes*. 1 – незараженной мыши, 2 – зараженной штаммом GIM0028, 3 – зараженной штаммом GIM0961, 4 – зараженной штаммом GIM1493, 5 – зараженной штаммом GIM2077.

Рисунок 6. Электрофореграмма поверхностных белков дикого и мутантных штаммов *L. monocytogenes*. Справа обозначены размеры белковых молекул. 1 –штамм GIM0028, 2 – штамм GIM0961, 3 – штамм GIM2077, 4 – штамм GIM1493, 5 – маркерная смесь белков