

14. Clarke M.B., Hughes D.T., Zhu C. et al. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006, 103: 10420-10425.
15. Durham-Colleran M.W., Verhoeven A.B., van Hoek M.L. Francisella novicida forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator. *Microb Ecol*. 2010, 59 (3): 457-465.
16. Jones B.D., Faron M., Rasmussen J.A., Fletcher J.R. Uncovering the components of the Francisella tularensis virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2014, 4: 1-10. doi: 10.3389/fcimb.2014.00032.
17. Margolis J.J., El-Etr S., Joubert L.-M. et al. Contributions of Francisella tularensis subsp. novicida chitinases and secretion system to biofilm formation on chitin. *Appl. Environ. Microbiol*. 2010, 76 (2): 596-608.
18. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol*. 1998, 28 (3): 449-461.
19. Van Hoek M.L. Biofilms. An advancement in our understanding of Francisella species. *Virulence*. 2013, 4 (8): 833-846. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.27023>.

Поступила 15.01.16

Контактная информация: Ключева Светлана Николаевна, к.б.н., 410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)51-52-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

А.А. Бывалов^{1,2}, Л.Г. Дудина¹, С.Г. Литвинец¹, Е.А. Мартинсон¹

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕЦЕПЦИИ БАКТЕРИОФАГА ЧУМНОГО ПОКРОВСКОЙ

¹Вятский государственный университет, Киров; ²Институт физиологии, Сыктывкар

Цель. Исследование механизма рецепции бактериофага чумного Покровской к клеткам *Yersinia pestis* с использованием панели моноклональных антител. **Материалы и методы.** С помощью метода конкурентного ингибирования оценена способность моноклональных антител к антигенным эпитопам наружной мембраны бактерий рода *Yersinia* ингибировать адгезию исследуемого бактериофага к клеткам *Y. pestis* штамм EV. **Результаты.** Подтверждена ключевая роль структуры углеводной природы в рецепции бактериофага Покровской. Установлено, что из пяти линий моноклональных антител к белковым эпитопам две вызывают существенную инактивацию адгезии бактериофага к бактериальным клеткам. **Заключение.** Высказано предположение о возможности участия в рецепции бактериофага Покровской клетками чумного микроба структуры полипептидной природы.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 16–21

Ключевые слова: бактериофаг, *Yersinia pestis*; моноклональные антитела, адгезия

А.А. Byvalov^{1,2}, L.G. Dudina¹, S.G. Litvinets¹, E.A. Martinson¹

IMMUNOCHEMICAL STUDY OF RECEPTION OF PLAGUE BACTERIOPHAGE POKROVSKY

¹Vyatsky State University, Kirov; ²Institute of Physiology, Syktyvkar, Russia

Aim. Study of mechanism of reception of plague bacteriophage Pokrovsky to cells of *Yersinia pestis* using a panel of monoclonal antibodies. **Materials and methods.** Using a method of competitive inhibition, the ability of monoclonal antibodies against antigenic epitopes of outer membrane of *Yersinia* genus bacteria to inhibit adhesion of the studied bacteriophage to cells of *Y. pestis* EV strain, was evaluated. **Results.** A key role of structure of carbohydrate nature in reception of Pokrovsky

bacteriophage was confirmed. Among 5 lines of monoclonal antibodies against protein epitopes 2 were established to cause significant inactivation of bacteriophage adhesion to bacterial cells. *Conclusion.* An assumption is proposed regarding participation of a structure of polypeptide nature in reception of Pokrovsky bacteriophage by cells of plague microbe.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 16–21

Key words: bacteriophage, *Yersinia pestis*, monoclonal antibodies, adhesion

ВВЕДЕНИЕ

Yersinia pestis — один из трех видов бактерий рода *Yersinia*, патогенных для человека. Эволюционно это самый «молодой» представитель вирулентных иерсиний [6], резко отличающийся от своих филогенетических предшественников — энтеропатогенов по эпидемиологическим и патогенетическим особенностям. Вызываемое *Y. pestis* заболевание — самая тяжелая в истории человечества бактериальная инфекция, три пандемии которой унесли жизни более 200 млн людей. Сохранение природных очагов чумы, ежегодно регистрируемые вспышки заболевания вызывают необходимость не только поддержания на существующем уровне, но и совершенствования всей системы противочумных мероприятий. Последнее приобретает особую актуальность в связи с широким распространением явления антибиотикорезистентности возбудителей многих инфекционных заболеваний, в том числе и чумы [13].

Указанная проблема чрезвычайно значима для чумной инфекции вследствие способности возбудителя передаваться воздушно-капельным путем, а также быстрого развития болезни в постинкубационный период, что может привести к невозможности своевременно выбрать и применить эффективную схему лекарственной терапии. В этой связи, в последние годы возобновился интерес исследователей и врачей-инфекционистов к возможности применения специфических фагов для лечения чумы [7], что предлагалось уже вскоре после выделения первых специфических чумных бактериофагов [14]. Однако в последующие десятилетия эта идея должного развития не получила. Вместе с тем, практика клинического применения бактериофагов для лечения людей от некоторых инфекционных заболеваний насчитывает без малого 100 лет [10].

Внедрение в современную лечебную практику новых средств, в том числе и бактериофагов, предполагает проведение широких исследований, включающих изучение механизмов и условий адгезии частиц бактериофага на микробной клетке. Общий механизм защиты бактерии основан на предотвращении адсорбции фага и/или инъекции его генома в клетку путем выключения экспрессии соответствующего рецептора, секреции внеклеточных полисахаридов, ограничивающих доступ фага к рецептору, биосинтеза мембранных белков, препятствующих инъекции генетического материала фага в клетку и др. В свою очередь, бактериофаги располагают арсеналом способов преодоления иммунитета прокариотической клетки. Так, для повышения эффективности адгезии они могут использовать различные рецепторы на поверхности микроба, продуцировать ферменты, деградирующие внеклеточные полисахариды [11]. Механизмы взаимодействия специфических бактериофагов с клетками возбудителя чумы, в первую очередь, с использованием иммунохимических и биофизических методов, исследованы недостаточно. Вместе с тем, в последнее десятилетие секвенирован геном пяти чумных бактериофагов, наиболее востребованных в диагностической практике [15]. Идентифицированы рецепторы шести бактериофагов, локализованные на различных участках молекулы

липополисахарида (ЛПС) *Y. pestis* [9]. В предшествующих исследованиях нами был получен набор гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к ряду неидентичных антигенных эпитопов наружной мембраны иерсиний углеводной и белковой природы [2, 3].

Цель настоящей работы состояла в изучении способности к конкурентному ингибированию названными моноклональными антителами рецепции клетками штамма EV *Y. pestis* бактериофага Покровской.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *Y. pestis* EV, бактериофаг чумной Покровской и поликлональную лошадиную агглютинирующую сыворотку к цельным клеткам *Y. pestis* (ПЧС), полученные из коллекции Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», а также моноклональные антитела девяти линий (МКАт 1 — 9) к поверхностным антигенам бактерий рода *Yersinia*, полученные нами ранее [2, 3]. Культуру *Y. pestis* выращивали в течение 2 сут при температуре 27°C на плотной питательной среде — БТН-агаре (Биотехновация, Россия), затем инактивировали 0,3% формальдегидом.

Для обработки бактерий протеиназой К («Serva», США) 1 мл убитой культуры (~2·10⁹ микробов/мл) осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 1 мл фосфатного буферного раствора (ЗФР) pH 7,3, содержащего протеиназу К в концентрации 0,2 мг/мл. Обработку ферментом проводили в течение трех часов при температуре 37°C. В контрольной пробирке клетки выдерживали в ЗФР без добавления протеиназы К при температуре 37°C.

При обработке периодатом натрия («Acros Organics», США) 1 мл исследуемой бактериальной культуры (~2·10⁹ микробов/мл) осаждали центрифугированием, и осадок ресуспендировали в 1 мл 50 мМ ацетатного буферного раствора (АБР) pH 5,2 со 100 (или 10) мМ NaIO₄. Контролем служили клетки, ресуспендированные в ацетатном буфере без добавления периодата натрия. Препараты выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре в защищенном от света месте. Общим контролем служил препарат убитых клеток, ресуспендированных в ЗФР и не подвергавшихся нагреванию при температуре 37°C.

После обработки бактерий протеиназой К и периодатом натрия все препараты (опытные и контрольные) отмывали один раз в ЗФР и ресуспендировали в ЗФР до оптической плотности 1,2 при длине волны 600 нм. Смешивали 500 мкл суспензии бактериальных клеток и 100 мкл раствора бактериофага, содержащего 8·10⁵ БОЕ.

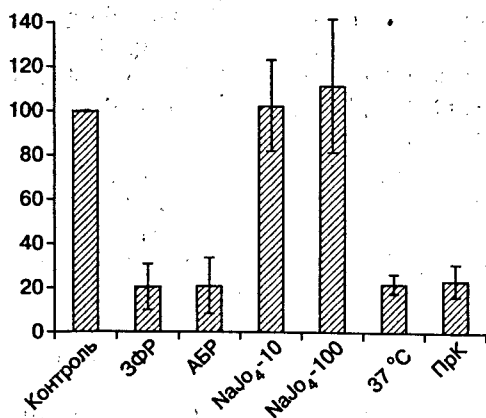


Рис. 1. Влияние обработки клеток *Y. pestis* штамм EV периодатом натрия и протеиназой К на адгезию бактериофага Покровской.

По оси абсцисс — препараты бактериофага: контроль — без микробных клеток; ЗФР — с клетками в ЗФР при комнатной температуре; АБР — с клетками в АБР; NaIO₄-10 и NaIO₄-100 с клетками, обработанными периодатом натрия в концентрации 10 и 100 мкг/мл соответственно; 37°C — с клетками в ЗФР 37°C; ПрК — с клетками, обработанными протеиназой К. По оси ординат — остаточное кол-во бактериофага в надосадочной жидкости (%) (здесь и на рис. 2).

Растворы инкубировали в течение 1,5 часов при температуре 37°C на термощейкере, после чего бактериальные клетки осаждали центрифугированием. Концентрацию оставшихся в надосадочной жидкости частиц бактериофага определяли по методу Грациа [4], результаты учитывали через 17 — 20 час.

Для оценки возможности конкуренции МКАт и бактериофага за сайты связывания на поверхности клеток *Y.pestis* суспензию инактивированных бактерий в ЗФР в концентрации $(2 - 3) \cdot 10^9$ микробов/мл инкубировали с МКАт (в виде асцитной жидкости) в разведении 1:100 для МКАт 1, 2, 5 — 7, 9 и 1:50 для МКАт 3, 4, 8 или с ПЧС в разведении 1:100 в течение 1,5 часов при температуре 37°C в термощейкере. После центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в ЗФР до оптической плотности 1,2 при длине волны 600 нм. Адсорбцию бактериофага на микробные клетки и определение концентрации бактериофага проводили по вышеописанной методике.

На рис. 1 и 2 представлены результаты в виде средних арифметических с доверительным интервалом для $p=0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Учитывая то, что использованные в работе МКАт комплементарны как углеводным (МКАт 1 — 4), так и полипептидным (МКАт 5 — 9) эпитопам наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, предварительно представлялось целесообразным с помощью указанных выше методических подходов определить химическую природу рецепторов бактериофага Покровской. Полученные результаты (рис. 1) согласуются с данными Филиппова А.А. и др. [9], показавших с использованием мутантов штамма CO92 *Y. pestis*, что рецептор бактериофага Покровской ассоциирован с областью Нер II/ Нер III на внутренней части кора ЛПС. Обработка клеток протеиназой К не оказывала влияния на уровень адгезии бактериофага, в то же время, предварительная инкубация бактериальной суспензии с периодатом натрия даже в минимальной из использованных концентраций (10 мМ) полностью отменяла способность клеток адгезировать бактериофаг (рис. 1). Эти данные указывают на углеводную природу рецептора бактериофага Покровской.

Результаты оценки конкурентного ингибирования рецепции бактериофага предшествующей обработкой препаратами, содержащими антитела различной специфичности, показали, что ни один из них не предотвращал полностью адгезию бактериофага (рис. 2). Так, ПЧС, содержащая поликлональные антитела к жи-

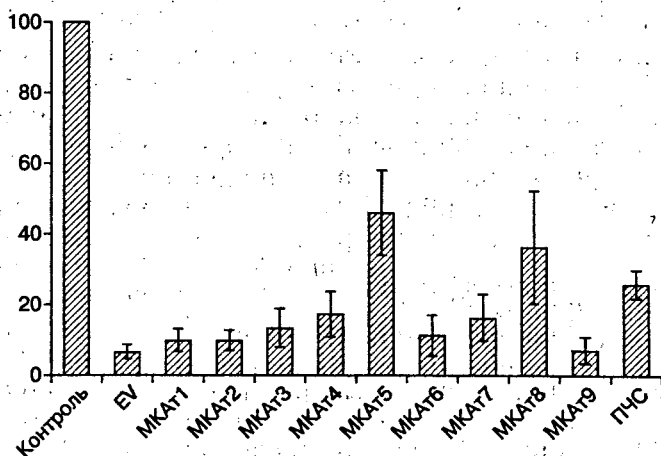


Рис. 2. Конкуренция антител и бактериофага Покровской за сайты связывания на поверхности клеток *Y. pestis* штамм EV.

По оси абсцисс — препараты бактериофага: контроль — без микробных клеток; EV — с интактными клетками, МКАт 1 — 9, ПЧС — с клетками, обработанными соответствующими антителами.

неспособным клеткам *Y. pestis*, лишь в 4 раза повышает количество неприсоединившихся к бактериальным клеткам частиц бактериофага (в среднем с 6,5 до 25,7%). МКАт 1 — 4, как и ожидалось, не оказали выраженного влияния на адгезию бактериофага. Вместе с тем, следует отметить тенденцию к неспецифическому ингибированию связывания с микробной клеткой бактериофага препаратами МКАт (во всяком случае, МКАт 3, 4), комплементарных эпитопам О-боковых цепей *Y. pseudotuberculosis*, не экспрессируемых клетками *Y. pestis* (рис. 2).

Среди МКАт 5 — 9, выявляющих белковые антигенные детерминанты наружной мембраны *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* [3], МКАт 5 и МКАт 8 вызывали подавление рецепции бактериофага.

ОБСУЖДЕНИЕ

Некоторое снижение адгезивности бактериофага к клеткам штамма EV после их обработки моноклональными антителами к О-боковым цепям ЛПС *Y. pseudotuberculosis* (МКАт 3, 4) может происходить за счет Fc-фрагментов антител либо иных компонентов асцитной жидкости. Эти данные подтверждают известную способность нескольких поверхностных белков бактерий *Y. pseudotuberculosis*, например, шаперона Skp, неспецифически связывать иммуноглобулины G [5] или белка рН 6,0 *Y. pestis* — иммуноглобулины подклассов G 1 — 3 и аполипопротеин B100 из неиммунных сывороток человека и животных [1].

Существенное подавление рецепции бактериофага путем обработки клеток МКАт 5, 8 объясняется, по-видимому, стерическим экранированием антителами, провзаимодействовавшими со своими специфическими белковыми эпитопами, пространственно соседствующими с коровой областью ЛПС, включающей рецепторную структуру бактериофага.

Иное и, возможно, менее вероятное толкование частичного ингибирования рецепции бактериофага с использованием вышеуказанных МКАт может состоять в том, что бактериофаг Покровской обладает способностью адгезировать к бактерии посредством распознавания не только упомянутого рецептора углеводной природы (и связывания с ним), но и иного, глубже расположенного белкового участка наружной мембраны. Так, показано, что в акте адгезии чумного бактериофага Yер-phi к микробной клетке участвуют не только ЛПС, но и идентифицированные структуры белков наружной мембраны Ail и OmpF [15]. Правда, в отличие от представленных нами данных, такой вывод сделан авторами, в том числе, и на основании результатов опытов, в которых адгезия бактериофага подавлялась предварительной обработкой бактерий как протеиназой K, так и периодатом натрия.

Довольно невысокую специфичность псевдотуберкулезного бактериофага R1-37, способного инфицировать бактерии *Yersinia similis* O:9 и *Yersinia enterocolitica* нескольких серотипов [8], авторы объясняют двояко. Во-первых, пространственным (но не химическим) сходством рецепторной структуры ЛПС в области наружного кора *Y. enterocolitica* YeO3-c-R1 и О-антигена *Y. similis* R708. Второе и более вероятное, по мнению авторов, объяснение состоит в том, что вышеуказанный бактериофаг экспрессирует несколько белков, способных связываться с различными участками ЛПС.

Более того, есть данные литературы, указывающие, в частности, на способность одного из бактериофагов семейства T4 с одинаковой эффективностью использовать в качестве рецептора OmpC или ЛПС *Escherichia coli* [12]. В связи с выше изложенным, отсутствие в наших опытах инактивации адсорб-

ции бактериофага после инкубации клеток с протеиназой К прямо не означает неучастия белковых структур наружной мембраны *Y. pestis* в рецепции специфического бактериофага. Частичное блокирование рецепции бактериофага МКАт 5 и МКАт 8, а также ПЧС может свидетельствовать об обратном. Во всяком случае, требуется проведение дальнейших специальных исследований механизма взаимодействия бактериофага Покровской с клеткой *Y. pestis* с использованием иных методических подходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Молекул. генетика. 2002, 3: 3-23.
2. Бывалов А.А., Дудина Л.Г., Литвинец С.Г., Новикова О. Д., Хоменко В. А., Портнягина О. Ю., Оводов Ю. С. Исследование поверхностных антигенных эпитопов *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью моноклональных антител. Прикладная биохимия и микробиология. 2014, 50 (2): 203-210.
3. Бывалов А. А., Дудина Л. Г., Чернядьев А. В., Кобышев И. В., Литвинец С. Г., Оводов Ю.С. Иммунохимическая активность Б-антигена *Yersinia pseudotuberculosis*. Молекул. генетика. 2015, 2: 32-38.
4. Лабинская А.С. Титрование бактериофага. В кн.: Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М., Медицина, 1978, с. 77-79.
5. Сидорин Е.В., Зиганшин Р.Х., Набережных Г.А., Лихацкая Г.Н., Трифонов Е.В., Анастюк С.Д., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. Белок шаперон Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать иммуноглобулины G. Биохимия. 2009, 74 (4): 501-514.
6. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96: 14043-14048.
7. Anisimov A.P., Amoako K.K. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics. J. Med. Microbiol. 2006, 55: 1461-1475.
8. Beczala A., Ovchinnikova O.G., Datta N. et al. Structure and genetic basis of *Yersinia similis* serotype O:9 O-specific polysaccharide. Innate Immunity. 2015, 21 (1): 3-16.
9. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y. et al. Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice. PLoS One. 2011, 6 (9): E25486.
10. Golkar Z., Bagasra O., Pace D.G. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. J. Infect. Dev. Ctries. 2014, 8 (2): 129-136.
11. Marraffini L.A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. Nature. 2015, 1; 526 (7571): 55-61.
12. Montag D., Hashemolhosseini S., Henning U. The receptor-recognition area of protein 37 of phage T4 Tula and Tulb. Receptor-recognition proteins of T-even type bacteriophages. J. Mol. Biol. 1990, 216 (2): 327-334.
13. Welch T.J., Fricke W.F., McDermott P.F. et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. PLoS One. 2007, 2 (3): E309.
14. Summers W.C. Bacteriophage therapy. Annu. Rev. Microbiol. 2001, 55: 437-453.
15. Zhao X., Cui Y., Yan Y. et al. Outer membrane proteins Ail and OmpF of *Yersinia pestis* are involved in the adsorption of T7-related bacteriophage Yep-phi. J. Virol. 2013, 87 (22): 12260-12269.

Поступила 23.02.16

Контактная информация: Бывалов Андрей Анатольевич, д.м.н., проф.,
610000, Киров, ул. Московская, 36, р.т. (8332)64-50-69