

# РОЛЬ ГЕНА *mutR* В МЕТАБОЛИЗМЕ И ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ГЕНОТИПА *emm12*

А.А. Зуткис, Б.Л. Мильман, А.В. Дмитриев

ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** В работе изучена функциональная роль гена белка-регулятора транскрипции *mutR* *Streptococcus pyogenes* (тип *emm12*). Ген *mutR* инактивирован в штаммах № 97 и № 152 методом инсерционного мутагенеза. Показано, что инактивация гена влияет на характер и динамику роста культур в жидких питательных средах. Обнаружено, что экспрессия секретируемых нуклеаз у мутантных штаммов существенно ниже по сравнению с исходными штаммами. Методами двумерного электрофореза и масс-спектрометрии выявлена разница в экспрессии ряда белков у мутантных штаммов по сравнению с исходными штаммами. Показано, что в результате инактивации гена *mutR* адгезивные свойства *S. pyogenes* к клеткам человеческого эпителия значительно снижаются. Анализ вирулентных свойств на мышинной модели выявил, что инактивация гена *mutR* привела к снижению вирулентных свойств штамма № 152 в 4,7 раза, а мутантный штамм № 97[*mutR*] оказался авирулентным по сравнению со штаммом № 97.

**Ключевые слова:** *Streptococcus pyogenes*, *mutR*, регуляция транскрипции, метаболизм, вирулентность.

## THE ROLE OF *mutR* GENE IN METABOLISM AND VIRULENCE OF *emm12* GENOTYPE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* STRAINS

Zutkis A.A., Milman B.L., Dmitriev A.V.

Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** In the present study the functional role of the *mutR* regulatory protein gene of *Streptococcus pyogenes* (*emm12*) was studied. The *mutR* gene was inactivated in the strains no. 97 and no. 152 by insertional mutagenesis. Inactivation of the *mutR* gene was found to affect the dynamic and characteristics of bacterial growth in liquid medium. Expression of secreted nucleases was significantly lower in the mutant strains compared to the wild-type strains. Two-dimensional electrophoresis and mass-spectrometry revealed differences in expression of number of the proteins in mutant strains compared to the wild-type strains. Inactivation of the *mutR* gene negatively affected capacity of *S. pyogenes* to adhere to human epithelial cells. Finally, the virulence properties of the no. 152[*mutR*] mutant strains were found to be 4,7-fold less compared to the strain no. 152, while the no. 97[*mutR*] mutant strain became avirulent compared to the strain no. 97 due to insertional inactivation of the *mutR* gene.

**Key words:** *Streptococcus pyogenes*, *mutR*, transcriptional regulation, metabolism, virulence.

---

**Адрес для переписки:**

Дмитриев Александр Валентинович  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12,  
ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН.  
Тел.: (812) 234-68-57. Факс: (812) 234-94-77.  
E-mail: admitriev10@yandex.ru

**Contacts:**

Alexander V. Dmitriev  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12,  
Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-68-57. Fax: +7 (812) 234-94-77.  
E-mail: admitriev10@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Зуткис А.А., Мильман Б.Л., Дмитриев А.В. Роль гена *mutR* в метаболизме и вирулентности штаммов *Streptococcus pyogenes* генотипа *emm12* // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 4. С. 339–346. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-339-346

**Citation:**

Zutkis A.A., Milman B.L., Dmitriev A.V. The role of *mutR* gene in metabolism and virulence of *emm12* genotype *Streptococcus pyogenes* strains // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 339–346. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-339-346

Работа поддержана грантом РФФИ, проект № 13-04-01864а, и грантом Правительства Санкт-Петербурга в области научной и научно-технической деятельности.

## Введение

*Streptococcus pyogenes* является одним из наиболее часто встречающихся возбудителей бактериальных инфекций человека. К заболеваниям, вызываемым *S. pyogenes*, относятся: тонзиллофарингит, скарлатина, рожистое воспаление, флегмоны, гломерулонефрит, некротизирующий фасцит, синдром токсического шока и др. [11].

Штаммы *S. pyogenes* способны быстро и эффективно адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды при помощи различных регуляторных механизмов [17]. Одним из таких механизмов является регуляция транскрипции генов при помощи белков-регуляторов. Такие белки содержат участок «спираль-поворот-спираль», за счет которого они взаимодействуют с промоторными областями отдельных генов, в том числе, генов патогенности, влияя на уровни их транскрипции, и, как следствие, на уровни экспрессии кодируемых ими белков [9, 19].

Ген *mutR* *S. pyogenes* кодирует белок-регулятор транскрипции MutR. Этот ген лишь один из многочисленных генов-регуляторов *S. pyogenes*, контролирующих транскрипцию генов, которые вовлечены в разнообразные процессы, происходящие в *S. pyogenes*. К числу генов-регуляторов, изучаемых в настоящее время в ведущих лабораториях мира, относятся гены *mga* [15, 16, 20], *rivR* [21, 25], *ralp3* [18, 22, 23], *srv* [10], *rgg* [5, 7], *mtsR* [24] и ряд других, и схема исследования подобных генов является стандартной — выбор конкретного гена-регулятора, что полностью зависит от желания и интуиции экспериментатора, инактивация гена в исходном штамме и сравнение свойств исходного и мутантного штаммов. В большинстве случаев полученные результаты носят фундаментальный характер и доказывают роль каждого из изучаемых генов в конкретном физиологическом процессе — адаптации к условиям окружающей среды [8, 12], способности формировать биопленки [7], способности использовать различные субстраты для размножения и роста [8], способности активировать или репрессировать транскрипцию генов вирулентности [6, 13, 14, 19, 25] и др. При этом многие из изучаемых белков-регуляторов *S. pyogenes* являются негативными регуляторами вирулентных свойств, то есть при инактивации гена-регулятора штаммы становятся высоковирулентными [19, 26].

Недавно нами было показано, что белок-регулятор MutR существенно отличается по своей функциональной роли от других ре-

гуляторов *S. pyogenes*. На модели штамма SF370 (генотип *emm1*) было продемонстрировано, что инактивация гена *mutR* приводит к полной потере вирулентных свойств при моделировании стрептококковой инфекции на лабораторных животных; мутантный по гену *mutR* штамм эффективно подвергается фагоцитозу в цельной человеческой крови в отличие от штамма SF370; и мутантный штамм характеризуется существенно меньшей адгезивной способностью к эпителиальным клеткам человека [1, 27].

Целью данного исследования является инактивация гена *mutR* у штаммов одного из наиболее часто встречающихся генотипов *S. pyogenes* (*emm12*) и дальнейшее изучение его функциональной роли в метаболизме и вирулентности стрептококков.

## Материалы и методы

В исследовании использовали 30 штаммов *S. pyogenes* генотипа *emm12* из коллекции ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, выделенных от детей младшего школьного возраста: 18 штаммов были выделены в Санкт-Петербурге в 2007–2008 гг., и 12 штаммов — в Пекине в 2006–2009 гг. Все штаммы были выделены как от здоровых носителей, так и от детей с клиническими проявлениями различных стрептококковых инфекций, таких как гнойный синусит, скарлатина, острый и хронический тонзиллит. Штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  использовали для получения препаративных количеств плазмидной ДНК.

Культивирование штаммов *S. pyogenes* осуществляли в жидкой среде Todd-Hewitt Broth (HiMedia Laboratories, Индия) и на 1,5% агаризованных средах на основе Todd-Hewitt Broth с добавлением человеческой эритроцитарной массы до конечной концентрации 5% при температуре 37°C без перемешивания. Штамм *E. coli* культивировали в бульоне ВНИ (Gibco, США) при температуре 37°C и перемешивании на качалке роторного типа Sky Line (ELMI, Латвия) или на 1,5% агаризованной среде на основе Luria-Bertani (HiMedia). Питательные среды готовили в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями. Концентрация эритромицина при культивировании рекомбинантных штаммов *S. pyogenes* и *E. coli* составила 2,5 и 200 мкг/мл соответственно.

Генно-инженерные манипуляции (рестрикция, лигирование, трансформация *E. coli* лигазной смесью, электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле) проводили в соответствии с руководством [2]. Выделение

хромосомной ДНК осуществляли методом фенол/хлороформенной экстракции. Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью коммерческого набора «АхуPrep DNA Gel Extraction Kit» (Ахуgen, США) согласно инструкции производителя. Плазмидные ДНК выделяли с использованием АхуPrep™ Plasmid Midiprep Kit (Ахуgen).

Трансформацию микроорганизмов осуществляли методом электропорации на приборе Gene Pulser Xcell по методике, рекомендованной производителем (Bio-Rad Laboratories, США).

Для амплификации гена *mutR* проводили ПЦР с праймерами MutR-1 (5'-CAT GAC TGT CTC CTT TCT GAT TTT C -3') и MutR+1 (5'-CCG TTA TTT AAA GGA CAG CTA GAC C -3'). Секвенирование использовали для определения последовательности гена *mutR* и подтверждения того, что в результате инсерционного мутагенеза рекомбинантная плазида встроилась в ожидаемую область структурной части гена *mutR*. Секвенирование ДНК проводили на секвенаторе Beckman Coulter CEQ™ 8000 (США) согласно инструкции производителя.

Анализ активности секретируемых ДНКаз осуществляли методом пересева штаммов уколом на плотную среду с метиленовым зеленым и выращиванием их в течение ночи. Зона вокруг колонии свидетельствовала о наличии у штамма секретируемых ДНКаз, об уровне экспрессии которых судили по диаметру зоны просветления [14].

Для оценки адгезивных свойств штаммы выращивали при 37°C в 40 мл бульона Todd-Hewitt Broth в течение ночи, клетки центрифугировали и отмывали физиологическим раствором. Отмытые клетки ресуспендировали в физиологическом растворе, и  $10^7$  КОЕ *S. pyogenes* инкубировали с  $10^5$  эпителиальных клеток при температуре 37°C в течение 30 мин. Число адгезировавших клеток стрептококков оценивали при помощи микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems).

Анализ клеточных лизатов осуществляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и двумерного гель-электрофореза. Для приготовления лизатов осадки клеток суспендировали в физиологическом растворе, смешивали с равным объемом буферного раствора, содержащего 10% β-меркаптоэтанола, и кипятили в течение 10 мин. Двумерный электрофорез проводили, как описано ранее [8]. Анализируемые белки, разделенные методами SDS-PAGE и двумерного гель-электрофореза, подвергали трипсинолизу в геле по стандартной методике.

Масс-спектрометрию проводили на приборах масс-спектрометр Ultraflex™ и хромато-масс-спектрометр Maxis 4G (Bruker, Германия). Триптические пептиды определяли методом масс-спектрометрии MALDI LIFT ToF/ToF. Для каждого белка регистрировали масс-спектр (МС<sup>1</sup>) суммы пептидов, содержащий пики их ионов [M+H]<sup>+</sup>. Для 8–12 наиболее интенсивных пиков регистрировали масс-спектры фрагментных ионов в режиме LIFT (МС<sup>2</sup>). Соответствующие белки идентифицировали по совпадению масс ионов пептидов (спектры МС<sup>1</sup>) и их фрагментов (спектры МС<sup>2</sup>) с использованием программы Mascot и баз данных аминокислотных последовательностей SwissProt и NCBI nr.

В качестве лабораторных животных использовали беспородных мышей (самцы, 10–12 нед., вес 14–16 г, питомник лабораторных животных «Рапполово»). Для моделирования стрептококковой инфекции штаммы выращивали при 37°C в 40 мл бульона Todd-Hewitt Broth в течение ночи, клетки центрифугировали и отмывали физиологическим раствором. Отмытые клетки ресуспендировали в физиологическом растворе. Животным вводили внутрибрюшно по 0,5 мл микробной суспензии с различными концентрациями возбудителя ( $3,5 \times 10^8$  —  $4 \times 10^8$  КОЕ/животное), в зависимости от штамма микроорганизма. Для каждой дозы заражения использовали по 15 мышей. Наблюдение вели в течение 10 дней. Для подтверждения гибели животных от стрептококковой инфекции делали счетные высевы микроорганизмов из селезенок.

Статистическую достоверность различий в вирулентности штаммов при внутрибрюшном заражении лабораторных мышей определяли с использованием кривых выживаемости Каплана–Мейера, логарифмического рангового критерия и программного обеспечения «GraphPad Prism».

## Результаты

### Конструирование штаммов *S. pyogenes*, мутантных по гену *mutR*

Все 30 штаммов *S. pyogenes* генотипа *emm12*, использованные в работе, были проанализированы на наличие гена *mutR* методом ПЦР. В результате было обнаружено, что все штаммы содержали данный ген. Ранее было показано, что в штамме SF370 (генотип *emm1*) ген *mutR* контролирует вирулентные свойства [27]. Исходя из этого, с использованием модели внутрибрюшного заражения лабораторных мышей были отобраны два наиболее вирулент-

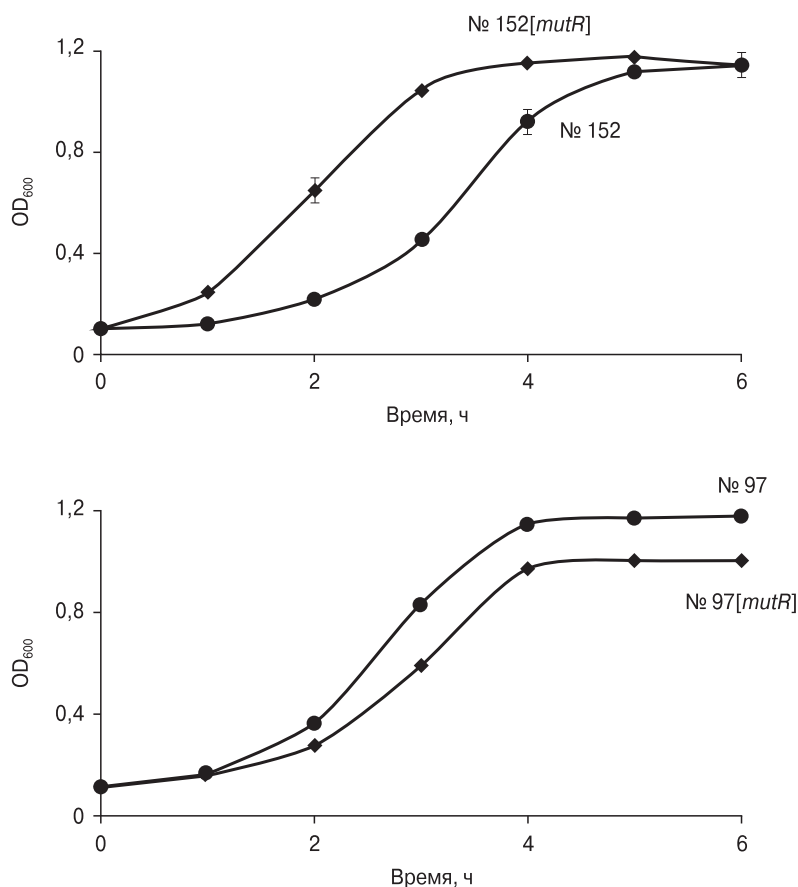
ных штамма генотипа *emm12* — штамм № 97 (острый тонзиллит, Россия) и штамм № 152 (бессимптомное носительство, Россия).

В штаммах *S. pyogenes* № 97 и № 152 ген *mutR* был инактивирован методом инсерционного мутагенеза с использованием ранее сконструированной плазмиды pVA891[*mutR*] [1]. Инсерционный мутагенез должен был привести к встраиванию плазмиды pVA891[*mutR*] в ген белка-регулятора *mutR* и нарушению структурной области гена. В результате электропорации штаммов *S. pyogenes* № 97 и № 152 были получены клоны, устойчивые к действию эритромицина, а полученные мутантные штаммы были названы № 97[*mutR*] и № 152[*mutR*] соответственно. Секвенирование подтвердило ожидаемое встраивание плазмиды pVA891[*mutR*] в структурную часть ген *mutR* (данные не приведены).

### Сравнительный анализ метаболизма штаммов

При росте штаммов в жидкой питательной среде Todd-Hewitt Broth были отмечены существенные различия. Так, например, штаммы

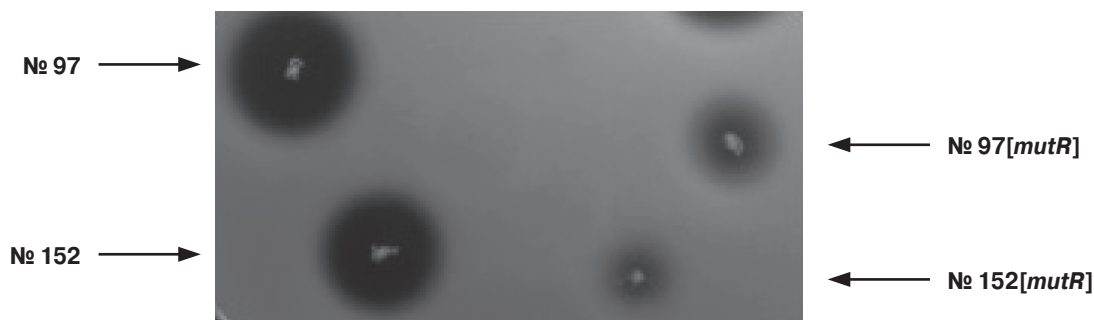
№ 97 и № 152 имели характерный придонный рост, а штаммы № 97[*mutR*] и № 152[*mutR*] росли во всем объеме среды, и только к середине стационарной фазы их рост становился придонным и сходным с таковым у исходных штаммов (данные не приведены), подтверждая существенную роль гена *mutR* в метаболизме *S. pyogenes*. При этом инактивация гена *mutR* привела к значительным изменениям в скорости роста штаммов. Так, у штамма № 152 инактивация гена *mutR* привела к значительному уменьшению продолжительности лаг-фазы и лог-фазы роста, при этом стационарной фазы роста мутантный штамм № 152[*mutR*] достиг уже через 4 ч, тогда как исходный штамм — через 6 ч (рис. 1). В то же время, в штамме № 97 инактивация гена *mutR* привела к совершенно другим результатам — продолжительность лаг-фазы у мутантного штамма № 97[*mutR*] немного увеличилась. При этом оптическая плотность культуры № 97, соответствующая стационарной фазе роста, превышала таковую культуры № 97[*mutR*] (рис. 1).



**Рисунок 1. Рост штаммов *S. pyogenes* в Todd-Hewitt Broth**

**Примечание.** Значения оптических плотностей (ось ординат) и доверительные интервалы приведены, исходя из результатов трех независимых экспериментов.





**Рисунок 2.** Экспрессия секретируемых нуклеаз у штаммов *S. pyogenes*

При анализе экспрессии секретируемых нуклеаз было показано, что у обоих мутантных штаммов она оказалась существенно снижена по сравнению с таковой у исходных штаммов № 97 и № 152 (рис. 2).

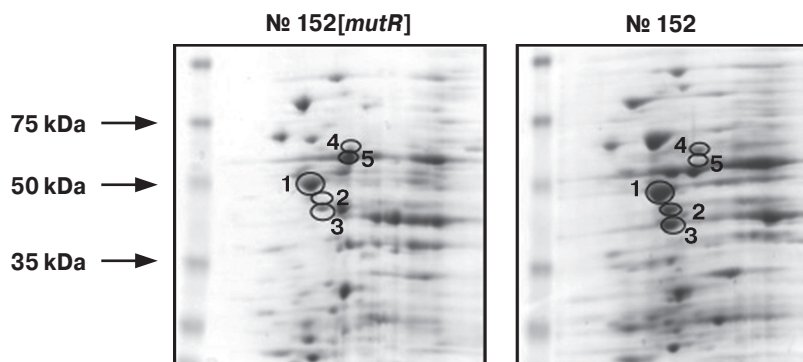
При анализе внутриклеточных белков методами SDS-PAGE и двумерного электрофореза был выявлен ряд отличий. Так, для штаммов № 152 и № 152[*mutR*], а также для штаммов № 97 и № 97[*mutR*] некоторые из белковых продуктов были идентифицированы методом масс-спектрометрии, и выявлена разница в экспрессии ряда белков/изоформ белков. В частности, у штамма № 152[*mutR*] оказались снижены уровни экспрессии эналазы, фактора элонгации Ts, пируваткиназы по сравнению со штаммом № 152 (рис. 3). Кроме того, в мутантном штамме перестала экспрессироваться одна из изоформ фосфоглицераткиназы и начала экспрессироваться одна из изоформ фактора элонгации Tu (рис. 3). У штамма № 97[*mutR*] оказался снижен уровень экспрессии орнитинкарбоамилтрансферазы и повышен уровень экспрессии фактора элонгации Tu по сравнению со штаммом № 97 (данные не приведены).

### Сравнительный анализ вирулентных свойств штаммов

В результате исследования обнаружено, что в результате инактивации гена *mutR* адгезивные свойства *S. pyogenes* к клеткам человеческого эпителия значительно снижаются. Так, среднее число стрептококковых клеток на одну эпителиальную клетку для штаммов № 97 и № 97[*mutR*] оказалось равным 26 и 8 соответственно, а для штаммов № 152 и № 152[*mutR*] — 79 и 9 соответственно (данные не приведены). Анализ вирулентных свойств на мышинной модели показал, что инактивация гена *mutR* привела к снижению вирулентных свойств штамма № 152 в 4,7 раза, а штамм № 97[*mutR*] оказался авирулентным по сравнению со штаммом № 97 (рис. 4).

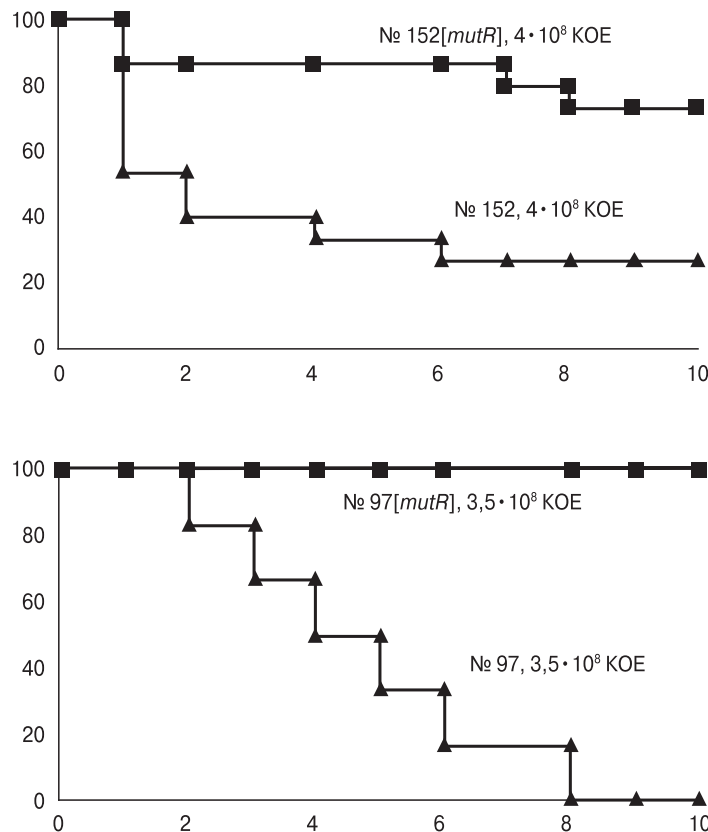
### Обсуждение

Исследования молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов, в том числе, генов патогенности, обеспечивающих микроорганизмам способность приводить к патологическим процессам в организме человека, являются од-



**Рисунок 3.** Анализ клеточных лизатов штаммов № 152[*mutR*] и № 152 методами двумерного электрофореза и спектрометрии

**Примечание.** Цифрами отмечены продукты, соответствующие следующим белкам: 1 — эналаза; 2 — фосфоглицераткиназа; 3 — фактор элонгации Ts; 4 — пируваткиназа; 5 — фактор элонгации Tu.



**Рисунок 4. Динамика гибели лабораторных мышей при внутрибрюшном заражении штаммами *S. pyogenes* № 152, № 152[mutR] и штаммами № 97, № 97[mutR]**

**Примечание.** На оси абсцисс — количество дней от начала заражения животных, на оси ординат — процент выживших животных.

ним из наиболее приоритетных направлений современной микробиологии [4]. *S. pyogenes*, вызывающий широкий спектр инфекционных заболеваний, в том числе, тяжелые инвазивные заболевания, и являющийся причиной пост-стрептококковых осложнений — один из интенсивно изучаемых микроорганизмов [11].

Цель исследований большинства из генов-регуляторов *S. pyogenes* — показать функциональную роль конкретного гена в конкретном физиологическом процессе, например, адаптации к условиям окружающей среды [8, 12], способности формировать биопленки [7], способности ферментировать различные биологические молекулы [8], способности влиять на транскрипцию генов вирулентности и вирулентные свойства [6, 13, 14, 19, 25]. При этом крайне сложно предположить, какое место в разветвленной регуляторной сети *S. pyogenes* занимает конкретный ген-регулятор транскрипции.

Следует отметить, что регуляция экспрессии генов и вирулентных свойств у *S. pyogenes* может кардинальным образом отличаться у разных штаммов. Так, например, результаты инактивации одного и того же гена-регулятора транскрипции *rgg* у трех разных штаммов харак-

теризовались штаммовой специфичностью — инактивация либо не приводила к изменению вирулентности, либо приводила к увеличению вирулентности, либо приводила к уменьшению вирулентности соответственно [3, 19].

В данной работе в качестве объекта исследования был выбран ген-регулятор транскрипции *mutR*, инактивация которого в штамме *S. pyogenes* генотипа *emm1* приводила к потере вирулентных свойств [1, 27]. В результате инактивации данного гена у двух штаммов одного из наиболее распространенных генотипов, *emm12*, было показано его влияние на многочисленные физиологические процессы. Например, было показано, что ген *mutR* контролирует скорость и характер роста штаммов в жидкой питательной среде (рис. 1), активирует экспрессию секретируемых нуклеаз, являющихся факторами патогенности (рис. 2), влияет на экспрессию ряда белков, важных для размножения и роста *S. pyogenes* (рис. 3). Многие из проанализированных свойств зависели от активности гена *mutR* штаммоспецифическим образом, что неудивительно, учитывая штаммоспецифическую активность другого гена-регулятора *S. pyogenes* — *rgg* [13, 14].

Вместе с тем, во всех трех изученных штаммах *S. pyogenes* ген *mutR* выполняет роль гена-активатора вирулентных свойств. Важно отметить, что это свойство характерно для наиболее распространенных генотипов *S. pyogenes*, *emm1* и *emm12*. Инактивация гена *mutR* приводит к значительному снижению вирулентных свойств или их полной утрате микроорганизмом при модельных экспериментах на лабораторных животных, в цельной человеческой крови и на эпителиальных клетках [1, 27].

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные значительно расширили представления о функциональной роли гена-регулятора *mutR* в патогенезе заболеваний, вызываемых *S. pyogenes*. Дальнейшие исследования могут быть направлены на разработку нового класса антибактериальных препаратов, селективно действующих на ген *mutR* или его белковый продукт, MutR, с целью профилактики и лечения стрептококковых заболеваний человека.

## Список литературы/References

1. Дмитриев А.В., Рождественская А.С., Зуткис А.А., Тотолян А.А. Направленная регуляция патогенных свойств стрептококков // Медицинский академ. журн. 2009. № 4. С. 50–58. [Dmitriev A.V., Rozhdestvenskaya A.S., Zutkis A.A., Totolian A.A. Targeted regulation of pathogenic properties in streptococci. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2009, no. 4, pp. 50–58. (In Russ.)]
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Под ред. А.А. Баева, К.Г. Скрябина. М.: Мир, 1984. 479 с. [Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1982, 545 p.]
3. Рождественская А.С., Дмитриев А.В., Грабовская К.Б., Тотолян А.А. Инактивация гена регулятора транскрипции Rgg изменяет экспрессию секретируемых факторов патогенности и вирулентность *Streptococcus pyogenes* // Медицинский академ. журн. 2008. № 2. С. 21–27. [Rozhdestvenskaja A.S., Dmitriyev A.V., Grabovskaja K.B., Totolian A.A. Inactivation of the transcription regulator gene Rgg leads to changes in the expression of secreted pathogenicity factors and the virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2008, no. 2, pp. 21–27. (In Russ.)]
4. Рождественская А.С., Сантос-Санчес И., Дмитриев А.В. Природная мутация в гене белка-регулятора BgrR, приводящая к нарушению синтеза белка Bac, фактора патогенности *Streptococcus agalactiae* // Инфекция и иммунитет. 2013. № 1. С. 43–48. [Rozhdestvenskaya A.S., Santos-Sanches I., Dmitriyev A.V. Natural mutation in the gene of response regulator BgrR resulting in repression of Bac protein synthesis, a pathogenicity factor of *Streptococcus agalactiae*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, no. 1, pp. 43–48. (In Russ.)]
5. Anbalagan S., McShan W.M., Dunman P.M., Chaussee M.S. Identification of Rgg binding sites in the *Streptococcus pyogenes* chromosome. *J. Bacteriol.*, 2011, vol. 193, no. 18, pp. 4933–4942.
6. Beckert S., Kreikemeyer B., Podbielski A. Group A streptococcal *rofA* gene is involved in the control of several virulence genes and eukaryotic cell attachment and internalization. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 1, pp. 534–537.
7. Chang J.C., LaSarre B., Jimenez J.C., Aggarwal C., Federle M.J. Two group A streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 8.
8. Chaussee M.A., Callegari E.A., Chaussee M.S. Rgg regulates growth phase-dependent expression of proteins associated with secondary metabolism and stress in *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 21, pp. 7091–7099.
9. Chaussee M.S., Somerville G.A., Reitzer L., Musser J.M. Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, no. 20, pp. 6016–6024.
10. Connolly K.L., Braden A.K., Holder R.C., Reid S.D. Srv mediated dispersal of streptococcal biofilms through SpeB is observed in CovRS+ strains. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 12, p. e28640.
11. Cunningham M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, vol. 13, no. 3, pp. 470–511.
12. Cusumano Z.T., Watson M.E., Caparon M.G. *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 1, pp. 233–242.
13. Dmitriyev A.V., McDowell E.J., Chaussee M.S. Inter- and intraserotypic variation in the *Streptococcus pyogenes* Rgg regulon. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, vol. 284, no. 1, pp. 43–51.
14. Dmitriyev A.V., McDowell E.J., Kappeler K.V., Chaussee M.A., Chaussee M.S. The Rgg regulator of *Streptococcus pyogenes* influences utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction, and expression of the NAD-glycohydrolase virulence operon. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 20, pp. 7230–7241.
15. Hause L.L., McIver K.S. Nucleotides critical for the interaction of the *Streptococcus pyogenes* Mga virulence regulator with Mga-regulated promoter sequences. *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 18, pp. 4904–4919.
16. Hondorp E.R., Hou S.C., Hempstead A.D., Hause L.L., Beckett D.M., McIver K.S. Characterization of the group A *Streptococcus* Mga virulence regulator reveals a role for the C-terminal region in oligomerization and transcriptional activation. *Mol. Microbiol.*, 2012, vol. 83, no. 5, pp. 953–967.
17. Kreikemeyer B., McIver K.S., Podbielski A. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol.*, 2003, vol. 11, no. 5, pp. 224–232.
18. Kwinn L.A., Khosravi A., Aziz R.K., Timmer A.M., Doran K.S., Kotb M., Nizet V. Genetic characterization and virulence role of the RALP3/LSA locus upstream of the streptolysin s operon in invasive MIT1 group A *Streptococcus*. *J. Bacteriol.*, 2007, vol. 189, no. 4, pp. 1322–1329.
19. Pulliainen A.T., Hytönen J., Haataja S., Finne J. Deficiency of the Rgg regulator promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance, AhpCF-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition, and virulence in *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 9, pp. 3225–3235.

20. Ribardo D.A., McIver K.S. Defining the Mga regulon: Comparative transcriptome analysis reveals both direct and indirect regulation by Mga in the group A streptococcus. *Mol. Microbiol.*, 2006, vol. 62, no. 2, pp. 491–508.
21. Roberts S.A., Scott J.R. RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon. *Mol. Microbiol.*, 2007, vol. 66, no. 6, pp. 1506–1522.
22. Siemens N., Fiedler T., Normann J., Klein J., Münch R., Patenge N., Kreikemeyer B. Effects of the ERES pathogenicity region regulator Ralp3 on *Streptococcus pyogenes* serotype M49 virulence factor expression. *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 14, pp. 3618–3626.
23. Siemens N., Kreikemeyer B. Heterologous expression of Ralp3 in *Streptococcus pyogenes* M2 and M6 strains affects the virulence characteristics. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 2.
24. Toukoki C., Gold K.M., McIver K.S., Eichenbaum Z. MtsR is a dual regulator that controls virulence genes and metabolic functions in addition to metal homeostasis in the group A streptococcus. *Mol. Microbiol.*, 2010, vol. 76, no. 4, pp. 971–989.
25. Treviño J., Liu Z., Cao T.N., Ramirez-Peña E., Sumbly P. RivR is a negative regulator of virulence factor expression in group A *Streptococcus*. *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, no. 1, pp. 364–372.
26. Voyich J.M., Sturdevant D.E., Braughton K.R., Kobayashi S.D., Lei B., Virtaneva K., Dorward D.W., Musser J.M., DeLeo F.R. Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 4, pp. 1996–2001.
27. Zutkis A.A., Dmitriev A.V., Chaussee M.S., Totolian A.A. Inactivation of the transcriptional regulator mutR gene affects virulent phenotype of *Streptococcus pyogenes*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, vol. 15, no. 4, p. 1840.

**Авторы:**

**Зуткис А.А.**, младший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и протеомики микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия;

**Мильман Б.Л.**, д.х.н., зав. лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии отдела молекулярной микробиологии ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия;

**Дмитриев А.В.**, д.б.н., зам. директора по научной работе, зав. отделом экологической физиологии ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Zutkis A. A.**, Junior Researcher, Laboratory of the Functional Genomics and Proteomics of Microorganisms, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Milman B. L.**, PhD, MD (Chemistry), Head of the Laboratory of Biomedical and Pharmaceutical Mass-Spectrometry, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Dmitriev A. V.**, PhD, MD (Biology), Deputy Director on Science, Head of the Department of Ecological Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.07.2014  
Отправлена на доработку 20.09.2014  
Принята к печати 24.11.2014

Received 19.07.2014  
Revision received 20.09.2014  
Accepted 24.11.2014