

ПРИРОДНАЯ МУТАЦИЯ В ГЕНЕ БЕЛКА-РЕГУЛЯТОРА BgrR, ПРИВОДЯЩАЯ К НАРУШЕНИЮ СИНТЕЗА БЕЛКА Bac, ФАКТОРА ПАТОГЕННОСТИ *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

А.С. Рождественская¹, И. Сантос-Санчес², А.В. Дмитриев¹

¹ ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

² Центр микробиологии, Университет «Нова», Лиссабон, Португалия

Резюме. *Streptococcus agalactiae* — условно-патогенный микроорганизм, который способен вызывать широкий спектр заболеваний новорожденных и взрослых людей. Для успешной колонизации различных органов и тканей человека, а также для подавления его иммунной системы, *S. agalactiae* синтезирует большое количество факторов патогенности. За своевременную и скоординированную экспрессию генов патогенности отвечают регуляторные молекулы *S. agalactiae*, в том числе белки-регуляторы, которые входят в состав двухкомпонентных систем. Полученные в рамках настоящего исследования результаты показали, что в штамме *S. agalactiae* A49V природная мутация в гене белка-регулятора BgrR, входящего в состав двухкомпонентной системы BgrRS, привела к нарушению синтеза одного из факторов патогенности *S. agalactiae* — белка Bac. Делеция одного нуклеотида в гене *bgrR* явилась причиной сдвига рамки считывания. Это повлияло на аминокислотную последовательность белка и, как следствие, на его вторичную и третичную структуры. Потеря белком BgrR штамма A49V функциональной активности и нарушение синтеза белка Bac привели к увеличению вирулентности штамма при моделировании стрептококковой инфекции на лабораторных мышах.

Ключевые слова: *Streptococcus agalactiae*, двухкомпонентная регуляторная система BgrRS, белок Bac, вирулентность.

NATURAL MUTATION IN THE GENE OF RESPONSE REGULATOR BgrR RESULTING IN REPRESSION OF Bac PROTEIN SYNTHESIS, A PATHOGENICITY FACTOR OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Rozhdestvenskaya A.S., Santos-Sanches I., Dmitriev A.V.

Abstract. *Streptococcus agalactiae* can cause variety of diseases of newborns and adults. For successful colonization of different human tissues and organs as well as for suppression of the host immune system *S. agalactiae* expresses numerous virulence factors. For coordinated expression of the virulence genes *S. agalactiae* employs regulatory molecules including regulatory proteins of two-component systems. Results of the present study demonstrated that in *S. agalactiae* strain A49V the natural mutation in the *bgrR* gene encoding for BgrR regulatory protein, which is component of regulatory system BgrRS, resulted in the repression of Bac protein synthesis, a virulence factor of *S. agalactiae*. A single nucleotide deletion in the *bgrR* gene has caused a shift of the reading frame and the changes in the primary, secondary and tertiary structures of the BgrR protein. The loss of functional activity of BgrR protein in A49V strain and repression of Bac protein synthesis have increased virulence of the strain in experimental animal streptococcal infection. (*Infekc. immun.*, 2013, vol. 3, N 1, p. 43–48)

Key words: *Streptococcus agalactiae*, BgrRS two-component regulatory system, protein Bac, virulence.

поступила в редакцию 15.02.2013
принята к печати 12.03.2013

© А.С. Рождественская,
И. Сантос-Санчес,
А.В. Дмитриев, 2013

Адрес для переписки:

Дмитриев Александр Валентинович,
д.б.н., заместитель директора
ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН

197376, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12,
ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН.
Тел.: (812) 234-68-57.
Факс: (812) 234-94-77.
E-mail: admtriev10@yandex.ru

Введение

Streptococcus agalactiae — грамположительный микроорганизм, вызывающий широкий спектр заболеваний, таких как пиелонефрит, артрит, абсцессы, эндокардит, септицемия и др. [22]. *S. agalactiae* может приводить к патологии беременности [15], вызывать сепсис, менингит, пневмонию новорожденных, часто приводящие к летальному исходу [7].

Штаммы *S. agalactiae* способны быстро адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, используя различные регуляторные механизмы. Одним из таких механизмов является регуляция транскрипции генов двухкомпонентными регуляторными системами. Двухкомпонентные системы участвуют в регуляции метаболизма бактерий, включая их способность использовать различные питательные вещества [11, 18], в регуляции устойчивости к стрессовым воздействиям и действию антибиотиков и др. [14]. Кроме того, двухкомпонентные регуляторные системы часто контролируют экспрессию генов патогенности, обеспечивая тем самым колонизацию органов и тканей организма хозяина и подавление иммунного ответа, что приводит к развитию патологических процессов [1, 8, 13, 19–21].

Одним из генов патогенности *S. agalactiae* является ген *bac*, кодирующий белок *Vac*. Этот белок, способный связывать IgA человека и фактор Н комплемента человека, признан в качестве фактора патогенности *S. agalactiae* [6, 12, 16, 17]. Ген *bac* локализован в пределах «островка» патогенности размером 8992 п.н., содержащего семь генов, в том числе гены *bgrS* и *bgrR*, которые кодируют сенсорную гистидинкиназу *BgrS* и белок-регулятор ответа *BgrR*, составляющие двухкомпонентную регуляторную систему *BgrRS* [10]. Показано, что «островок» патогенности, содержащий ген *bac*, был приобретен клоном *S. agalactiae* сравнительно недавно, и все штаммы, содержащие ген *bac*, относятся к отдельной генетической линии [2, 9].

Недавно было обнаружено, что двухкомпонентная система *BgrRS* участвует в регуляции синтеза белка *Vac* и контролирует вирулентные свойства *S. agalactiae*. Так, в результате инактивации белка-регулятора *BgrR* в штамме *S. agalactiae* 168/00 уровень транскрипции гена *bac* снизился в 17 раз, что привело к прекращению синтеза белка *Vac*. При этом штамм *S. agalactiae*, мутантный по гену *bgrR*, оказался более вирулентным по сравнению с исходным штаммом 168/00 при внутрибрюшном заражении лабораторных мышей [20].

Учитывая участие двухкомпонентной системы *BgrRS*, в частности, белка-регулятора *BgrR*, в регуляции вирулентных свойств *S. agalactiae*, актуальной представляется характеристика

особенностей функционирования этой регуляторной системы в различных штаммах, выделенных от человека. Настоящее исследование посвящено выявлению и изучению природной мутации в гене белка-регулятора *BgrR*, приводящей к нарушению синтеза белка *Vac*.

Материалы и методы

В работе были использованы 40 штаммов *S. agalactiae*, которые содержали ген *bac* [2, 4]. 35 штаммов были выделены от беременных женщин и 5 штаммов были выделены из коровьего молока в период с 1989 по 2002 гг. Штаммы были получены из коллекций ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН (Санкт-Петербург, Россия), Пекинского детского госпиталя (Пекин, Китай) и Университета ветеринарной медицины (Кошице, Словакия). Штамм *E. coli* DH5 α использовали в качестве реципиента при клонировании.

Культивирование штаммов *S. agalactiae* осуществляли в жидкой среде Todd-Hewitt (Hi-Media, Индия) и на 1,5% агаризованных средах на основе Todd-Hewitt при температуре 37°C без перемешивания. Для оценки гемолитической активности штаммов в агаризованную среду добавляли человеческую эритроцитарную массу до конечной концентрации 5%. Штамм *E. coli* DH5 α и полученные на его основе рекомбинантные штаммы 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 (Hi-Media). Питательные среды готовили в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями. Концентрация спектиномицина при культивировании рекомбинантных штаммов *S. agalactiae* и *E. coli* составила 125 и 100 мкг/мл соответственно.

Выделение хромосомной ДНК осуществляли методом фенол/хлороформенной экстракции. Амплификацию полноразмерного гена *bgrR* осуществляли методом ПЦР с использованием праймеров Rfull_F (5'-CGGGATCCCGATGAACATTTTAG-3') и Rfull_R (5'-CCGGAATTCCGGTTAATAATTTAGG-3'). Для амплификации фрагмента ДНК, содержащего полноразмерные гены *bgrR*, *bgrS* и промотор, использовали праймеры Bgr_F (5'-CGGGATCCCGGAGTCTAATATCTGA-3') и Bgr_R (5'-CCGGAATTCCGGTTCTTTTACTTTAT-3').

ПЦР проводили при следующих условиях: исходная денатурация (3 мин при 94°C); 10 циклов реакции, состоящих из стадий денатурации (30 с при 94°C), отжига праймеров (50 с при температуре 36°C) и синтеза (1 мин при использовании праймеров Rfull_F и Rfull_R при 72°C; 2 мин при использовании праймеров Bgr_F и Bgr_R при 72°C); 30 циклов реакции, состоящих из стадий денатурации (30 с при 94°C), отжига праймеров (50 с при температуре 55°C)

и синтеза (1 мин при использовании праймеров Rfull_F и Rfull_R при 72°C; 2 мин при использовании праймеров Bgr_F и Bgr_R при 72°C); окончательная достройка (5 мин при 72°C).

Генно-инженерные манипуляции (рестрикция, лигирование, трансформация *E. coli* лигазной смесью, электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле) проводили согласно [3]. Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью коммерческого набора «АхуPrep DNA Gel Extraction Kit» (Ахуgen, США) согласно инструкции производителя.

Секвенирующую ПЦР проводили с использованием набора «GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit» (Beckman Coulter, США) согласно протоколу производителя. Для секвенирования использовали секвенатор GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

Выделение плазмидной ДНК из рекомбинантных штаммов *E. coli* осуществляли с помощью коммерческих наборов «АхуPrep Plasmid Miniprep Kit» и «АхуPrep Plasmid Midiprep Kit» (Ахуgen) согласно инструкции производителя. Для трансформации микроорганизмов методом электропорации использовали Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, США).

Белковый анализ клеточных лизатов штаммов *S. agalactiae* проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-электрофорез) и методом Western-blot. Для приготовления лизатов осадки клеток суспендировали в физиологическом растворе, смешивали с равным объемом буферного раствора, содержащего 10% β-меркаптоэтанола, и кипятили в течение 10 минут.

Для оценки вирулентности изучаемых штаммов применяли внутрибрюшное заражение лабораторных мышей (самцы, 10–12 нед., вес 14–16 г). Исследуемые штаммы выращивали при 37°C в 40 мл бульона Todd-Hewitt в течение ночи, клетки центрифугировали и отмывали физиологическим раствором. Отмытые клетки ресуспендировали в физиологическом растворе, затем вводили каждому животному в брюшную полость по 0,5 мл микробной суспензии, содержащей 10⁸ КОЕ. Животным контрольной группы вводили по 0,5 мл физиологического раствора. Для каждого исследуемого штамма использовали по 13 мышей. Наблюдение вели в течение 10 дней. Для подтверждения гибели животных от стрептококковой инфекции делали счетные высевы из селезенок.

В работе использовали компьютерные программы и базы данных: «Chromas 1.45» (Microsoft) — для анализа нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования; программное обеспечение «BLAST» и базу данных «GenBank» — для сравнительного анализа ДНК; программное обе-

спечение «BankIt» — для депонирования аллели гена *bgrR* в базу данных «GenBank»; программное обеспечение «Expasy translate tool» — для транслирования нуклеотидных последовательностей генов; программное обеспечение «Protein BLAST» — для сравнительного анализа аминокислотных последовательностей; программное обеспечение «SWISS-MODEL» — для моделирования трехмерных структур белковых молекул.

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

Выявление и характеристика штамма *S. agalactiae* с нарушенным синтезом белка Bac

35 штаммов *S. agalactiae*, выделенные от человека, и 5 штаммов, выделенные от коров, содержащих ген *bac* [2, 4], были проанализированы на наличие белка Bac с целью обнаружения возможных нарушений его синтеза. Анализ был осуществлен с помощью SDS-электрофореза и Western-blot с использованием IgA человека, меченных пероксидазой хрена. В результате анализа был выявлен штамм *S. agalactiae* A49V, содержащий ген *bac*, но не экспрессирующий белок Bac (рис. 1).

Учитывая, что белок-регулятор BgrR необходим для синтеза белка Bac [20], ген *bgrR* штамма A49V был секвенирован с целью выявления в нем возможных природных мутаций. Для определения нуклеотидной последовательности гена *bgrR* штамма A49V была проведена ПЦР с использованием праймеров Rfull_F и Rfull_R. Амплификат был выделен из агарозного геля и секвенирован. В результате анализа в нуклеотидной последовательности гена *bgrR* штамма A49V была выявлена делеция одного нуклеотида. Этот нуклеотид соответствовал гуанину

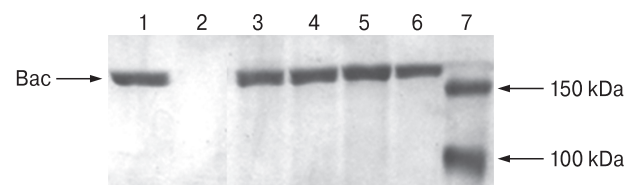


Рисунок 1. Анализ штаммов *S. agalactiae* методом Western-blot

1, 3–6 — клеточные лизаты штаммов, экспрессирующих белок Bac;
2 — клеточный лизат штамма A49V;
7 — маркер молекулярного веса.

в положении 439 в гене *bgrR* штамма 168/00 (номер FJ890928 в базе данных «GenBank»), кодирующем функционально активный белок BgrR. Охарактеризованная нуклеотидная последовательность гена *bgrR* штамма A49V была депонирована в базу данных «GenBank» под номером HQ840774.

Делеция одного нуклеотида в последовательности гена *bgrR* штамма A49V привела к изменению рамки считывания и нарушению аминокислотной последовательности белка BgrR. Согласно компьютерному анализу, в результате делеции произошла замена 72 аминокислотных остатков на С-конце белка-регулятора BgrR на 10 аминокислотных остатков, при этом были утрачены все 9 аминокислотных остатков, обеспечивающих связывание ДНК (рис. 2). В результате сравнительного анализа моделей третичных структур ДНК-связывающего белка BgrR штаммов 168/00 и A49V было выявлено отсутствие ДНК-связывающего домена в белке BgrR штамма A49V (рис. 2, III обложка).

Восстановление синтеза белка Vas в штамме *S. agalactiae* A49V

Для того, чтобы доказать, что отсутствие синтеза белка Vas в штамме дикого типа A49V вызвано нарушением функциональной активности белка-регулятора BgrR, восстановили экспрессию гена *bgrR* в этом штамме. Для этого с помощью праймеров Bgr_F и Bgr_R амплифицировали фрагмент ДНК штамма *S. agalactiae* 168/00, содержащий гены *bgrR* и *bgrS* и промоторную область. Полученный фрагмент ДНК клонировали в вектор pAT29, содержащий ген устойчивости к спектиномицину и способный к автономной репликации в грамположительных кокках. Сконструированную рекомби-

нантную плазмиду, названную pBgrRS(P), использовали для трансформации штамма A49V. Полученный клон, содержащий плазмиду pBgrRS(P), назвали A49V[BgrRS]⁺.

В результате сравнительного анализа клеточных лизатов штаммов методом SDS-электрофореза выявили, что трансформация штамма дикого типа A49V рекомбинантной плазмидой pBgrRS(P), содержащей полноразмерные гены *bgrR* и *bgrS* штамма 168/00 под контролем природного промотора, привела к восстановлению экспрессии белка Vas (рис. 3), что подтверждает данные о ключевой роли двухкомпонентной системы BgrRS в активации экспрессии гена *bac*.

Сравнительный анализ вирулентных свойств штаммов *S. agalactiae* A49V и A49V[BgrRS]⁺

Для анализа вирулентности штаммов *S. agalactiae* A49V и A49V[BgrRS]⁺ стрептококковую инфекцию моделировали на лабораторных мышах. Анализ динамики гибели мышей показал, что заражение исходным штаммом *S. agalactiae* A49V привело к гибели 30,8% животных, в то время как заражение штаммом A49V[BgrRS]⁺ не вызвало гибель мышей (рис. 4). Таким образом, восстановление экспрессии полноразмерных генов двухкомпонентной системы BgrRS в штамме A49V *S. agalactiae* привело к потере вирулентных свойств штамма при внутрибрюшном заражении лабораторных мышей.

Обсуждение

Исследование факторов патогенности микроорганизмов и механизмов, способствующих развитию инфекционного процесса, является одним из приоритетных направлений современной микробиологии. В качестве механизма, обеспечивающего своевременный синтез факторов патогенности для колонизации организма хозяина и подавления его иммунного ответа, может выступать регуляция экспрессии генов двухкомпонентными регуляторными системами.

Полученные в настоящем исследовании результаты показали на примере штамма *S. agalactiae* A49V, что природная мутация в гене белка-регулятора BgrR, входящего в состав двухкомпонентной системы BgrRS, привела к нарушению синтеза одного из факторов патогенности *S. agalactiae*, а именно белка Vas, и повышению вирулентности штамма.

Делеция одного нуклеотида в гене *bgrR* явилась причиной сдвига рамки считывания. Это повлияло на аминокислотную последовательность белка и, как следствие, на его вторичную и третичную структуры. Согласно данным компьютерного анализа, в структуре белка BgrR штамма A49V была утрачена область, которая

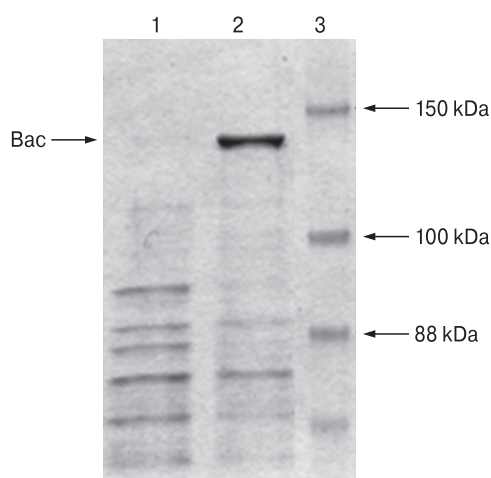


Рисунок 3. Анализ штаммов *S. agalactiae* методом SDS-электрофореза

1 — клеточный лизат штамма A49V;
2 — клеточный лизат штамма A49V[BgrRS]⁺;
3 — маркер молекулярного веса.

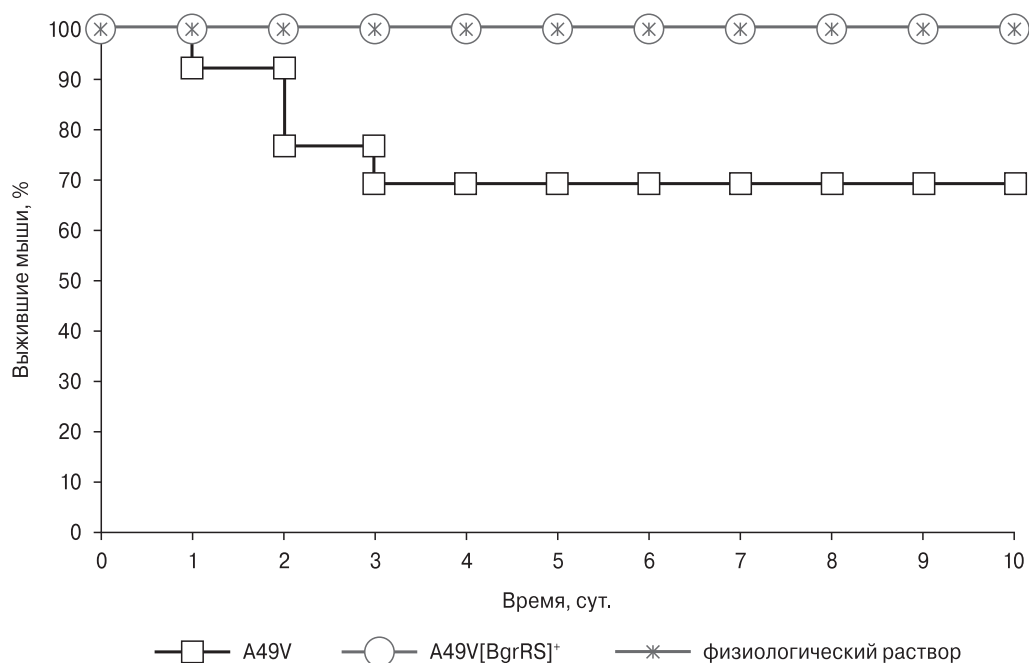


Рисунок 4. Динамика гибели лабораторных мышей при внутрибрюшном заражении штаммом *S. agalactiae* A49V, рекомбинантным штаммом A49V[BgrRS]⁺ и при инъекции физиологического раствора (контрольная группа)

отвечает за связывание с ДНК, необходимое для активации или репрессии транскрипции генов [11, 18, 23].

Моделирование стрептококковой инфекции на лабораторных мышах показало, что экспрессия генов двухкомпонентной системы BgrRS приводит к значительному снижению вирулентности штамма *S. agalactiae*. Аналогичные результаты были получены ранее при сравнительном анализе вирулентных свойств штамма *S. agalactiae* 168/00 и штамма, мутантного по генам *bgrR* и *bgrS* [20]. Возможно, снижение вирулентности связано с активацией синтеза и экспортом на поверхность *S. agalactiae* белка Vas, который обеспечивает иммунологическую толерантность, позволяющую *S. agalactiae* длительно персистировать в организме хозяина и не вызывать выраженный иммунный ответ [5]. Связывание белка Vas с Fc частью IgA человека стерически затрудняет распознавание эпитопов поверхностных белков и полисахаридов *S. agalactiae*, что способствует подавлению иммунного ответа, но в то же время может снижать инвазивность штамма и его способность вызывать тяжелые формы заболевания [12, 16].

Таким образом, можно предположить, что приобретение «островка» патогенности, содержащего гены *bac*, *bgrR* и *bgrS*, позволило штаммам *S. agalactiae* более успешно приспосабливаться к бессимптомной колонизации вагинального тракта женщин и не вызывать тяжелые инфекционные процессы, которые способствуют гибели хозяина. Именно такое селективное преимущество могло позволить

потомкам клона-реципиента «островка» патогенности быстро распространиться среди людей, что было отмечено нами ранее [2, 9].

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты значительно расширили представления о возможной роли белка Vas и участии двухкомпонентной регуляторной системы BgrRS в патогенезе *S. agalactiae*.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ, проект № 12-04-31431 мол_а, программой «УМНИК» («Участник молодежного научно-инновационного конкурса»), проект № 16805, проектом NANO-GUARD № 269138.

Список литературы

1. Дмитриев А.В., Рождественская А.С., Зуткис А.А., Тотолян А.А. Направленная регуляция патогенных свойств стрептококков // Мед. Акад. Журн. — 2009. — № 4. — С. 50–58.
2. Дмитриев А.В., Hu Y.Y., Shen A.D., Суворов А.Н., Yang Y.H. Анализ клинических штаммов стрептококков группы В методами молекулярной генетики // Мед. Акад. Журн. — 2002. — № 2. — С. 18–27.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / пер. с англ. под ред. А.А. Баева и К.Г. Скрябина. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
4. Рождественская А.С., Bhide M., Mikula I. Jr., Mikula I., Дмитриев А.В. Использование полиморфизма гена sak0192 *Streptococcus agalactiae* в качестве молекулярно-эпидемиологического мар-

- кера // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2009. — № 5. — С. 38–43.
5. Тотолян А.А., Суворов А.Н., Дмитриев А.В. Стрептококки группы В в патологии человека / под общ. ред. А.А. Тотоляна // СПб.: Человек. — 2009. — 212 с.
 6. Areschoug T., Stalhammar-Carlemalm M., Karlsson I., Lindahl G. Streptococcal β protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 12642–12648.
 7. Berardi A., Tzialla C., Riva M., Cerbo R.M., Creti R. Group B streptococcus: early- and late-onset infections // *J. Chemother.* — 2007. — Vol. 19. — P. 24–27.
 8. Cox K.H., Ruiz-Bustos E., Courtney H.S. Inactivation of DltA modulates virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes* // *PLoS ONE*. — 2009. — Vol. 4. — e5366.
 9. Dmitriev A., Hu Y.Y., Shen A.D., Suvorov A., Yang Y.H. Chromosomal analysis of group B streptococcal clinical strains; bac gene-positive strains are genetically homogenous // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2002. — Vol. 208. — P. 93–98.
 10. Dmitriev A., Yang Y.H., Shen A.D., Totolian A.A. Adjacent location of bac gene and two-component regulatory system genes within the putative *Streptococcus agalactiae* pathogenicity island // *Folia Microbiol.* — 2006. — Vol. 51. — P. 229–235.
 11. Gao R., Stock A.M. Biological insights from structures of two-component proteins // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2009. — Vol. 63. — P. 133–154.
 12. Heden L.-O., Frithz E., Lindahl G. Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity // *Eur. J. Immunol.* — 1991. — Vol. 21. — P. 1481–1490.
 13. Jiang S.-M., Cieslewicz M.J., Kasper D.L., Wessels M.R. Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus // *J. Bacteriol.* — 2005. — Vol. 187. — P. 1105–1113.
 14. Jordan S., Hutchings M.I., Mascher T. Cell envelope stress response in gram-positive bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2008. — Vol. 32. — P. 107–146.
 15. Larsen J.W., Sever J.L. Group B streptococcus and pregnancy: a review // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 2008. — Vol. 198. — P. 440–448.
 16. Lindahl G., Stalhammar-Carlemalm M., Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2005. — Vol. 18. — P. 102–127.
 17. Nordström T., Movert E., Olin A.I., Ali S.R., Nizet V., Varki A., Areschoug T. Human Siglec-5 inhibitory receptor and immunoglobulin A (IgA) have separate binding sites in streptococcal beta protein // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286. — P. 33981–33991.
 18. Perry J., Koteva K., Wright G. Receptor domains of two-component signal transduction systems // *Mol. Biosyst.* — 2011. — Vol. 7. — P. 1388–1398.
 19. Rajagopal L. Understanding the regulation of group B streptococcal virulence factors // *Future Microbiol.* — 2009. — Vol. 4. — P. 201–221.
 20. Rozhdestvenskaya A.S., Totolian A.A., Dmitriev A.V. Inactivation of DNA-binding response regulator Sak189 abrogates beta-antigen expression and affects virulence of *Streptococcus agalactiae* // *PLoS ONE*. — 2010. — Vol. 5. — e10212.
 21. Santi I., Grifantini R., Jiang S.-M., Brettoni C., Grandi G., Wessels M.R., Soriani M. CsrRS regulates group B streptococcus virulence gene expression in response to environmental pH: a new perspective on vaccine development // *J. Bacteriol.* — 2009. — Vol. 191. — P. 5387–5397.
 22. Sendi P., Johansson L., Norrby-Teglund A. Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults: a review with emphasis on skin and soft-tissue infections // *Infection*. — 2008. — Vol. 36. — P. 100–111.
 23. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. Two-component signal transduction // *Annu. Rev. Biochem.* — 2000. — Vol. 69. — P. 183–215.

