



Протеомный анализ типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor

Плеханов Н.А.[✉], Заднова С.П., Крицкий А.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Баданин Д.В., Смирнова Н.И.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"» Роспотребнадзора, 410005, Саратов, Россия

Цель работы — сравнительное изучение экспрессии белков у типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor с помощью протеомного анализа.

Материалы и методы. В качестве модельных были использованы клинические штаммы *V. cholerae* — типичный M1062 (Астрахань, 1970) и генетически измененный M1509 (Москва, 2012). Штаммы выращивали в LB бульоне pH 7,2. Получали фракции лизатов клеток и экзопротеинов и анализировали их методом 2D-электрофореза. Различающиеся белковые пятна исследовали масс-спектрометрически. Изучение выживаемости штаммов *V. cholerae* в условиях осмотического и оксидативного стресса проводили при инкубации штаммов в 3 М растворе NaCl или 20 мМ растворе H₂O₂.

Результаты и обсуждение. При анализе лизатов клеток значительных отличий в экспрессии белков с известной функцией между изучаемыми штаммами не обнаружено. Подавляющая часть идентифицированных белков в лизатах функционально связана с углеводным обменом, метаболизмом аминокислот и энергетическими процессами в клетке. В то же время во фракции экзопротеинов геноварианта M1509 присутствовали в повышенных количествах белки (пероксидаза, супероксиддисмутаза, тиоредоксин, белки внешней мембраны OmpW и OmpT), защищающие клетки холерного вибриона от воздействия стрессовых факторов внешней среды. Последующее изучение устойчивости штаммов к осмотическому и оксидативному стрессу выявило лучшую выживаемость геноварианта при действии указанных факторов.

Заключение. Данные протеомного анализа типичного и генетически измененного штаммов *V. cholerae* биовара El Tor свидетельствуют о повышенной экспрессии у геноварианта белков, обеспечивающих устойчивость вибрионов к действию стрессовых факторов внешней среды, что, возможно, является одной из причин их широкого распространения. Кроме того, полученные сведения позволят выявить новые биомаркеры, которые могут быть использованы для дифференциации типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*; протеомный анализ; белки адаптации; осмотический стресс; оксидативный стресс.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках НИР 76-4-19 «Комплексный геномно-протеомный анализ варибельности эпидемически значимых свойств *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Российской Федерации».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крицкий А.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Баданин Д.В., Смирнова Н.И. Протеомный анализ типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 578–586.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-8>

Поступила 15.04.2020

Принята в печать 26.06.2020

Proteomic analysis of typical and genetically altered strains of *Vibrio cholerae* serogroup O1, biovar El Tor

Nikita A. Plekhanov[✉], Svetlana P. Zadnova, Andrey A. Kritsky, Tatyana A. Polunina, Nina V. Kotova, Daniil V. Badanin, Nina I. Smirnova

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia

Objective — comparative study of protein expression in typical and genetically altered *Vibrio cholerae* strains of O1 serogroup, biovar El Tor by means of proteomic analysis.

Materials and methods. Clinical *V. cholerae* strains — typical strain, M106 (Astrakhan, 1970) and genetically altered one, M1509 (Moscow, 2012) — were used as model ones. Strains were cultivated in LB broth (pH7.2).

Then, cell and exoprotein lysate fractions were obtained and investigated in 2D electrophoresis. Different protein stains were examined using mass spectrometry. Survivability of *V. cholerae* strains under osmotic and oxidative stresses was studied during incubation of the strains in 3 M NaCl solution or 20 mM H₂O₂ solution.

Results and discussion. When analyzing cell lysates, significant differences in protein expression with known function between studied strains were not detected. The great majority of identified proteins in the lysates is functionally associated with carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, and energy processes in a cell. At the same time, exoprotein fraction of M1509 genovariant contained increased amount of proteins (peroxidase, superoxide dismutase, thioredoxin, outer membrane proteins OmpW, OmpT) protecting the cells of cholera vibrio from effect of stress factors of the environment. Further study of the resistance to osmotic and oxidative stresses revealed better survivability in the genovariant when exposed to the stated factors.

Conclusion. The data of proteomic analysis of the typical and genetically altered *V. cholerae* strains, biovar El Tor, testify to high levels of expression of the proteins that provide for vibrio resistance to the effect of environmental stress factors in genovariants, which is possibly one of the causes of their wide dissemination. In addition, the results obtained will allow for identification of new biomarkers which can be used for differentiation of typical strains and genovariants of *V. cholerae*, biovar El Tor.

Keywords: *Vibrio cholerae*; proteomic analysis; adaptation proteins; osmotic stress; oxidative stress.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of research work 76-4-19 «Complex genomic-proteomic analysis of the variability of epidemically significant properties of *Vibrio cholerae* O1 isolated on the territory of the Russian Federation».

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritsky A.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Badanin D.V., Smirnova N.I. Proteomic analysis of typical and genetically altered strains of *Vibrio cholerae* serogroup O1, biovar El Tor. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 578–586. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-8>

Received 15 April 2020
Accepted 26 June 2020

Введение

В настоящее время продолжается 7-я пандемия холеры, которая началась в 1961 г. и была вызвана токсигенными типичными штаммами *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor. От штаммов *V. cholerae* O1 классического биовара, которые явились причиной 5-й и 6-й пандемий холеры, типичные вибрионы El Tor отличаются по содержанию и структуре ряда генов патогенности, пандемичности и адаптации. Результатом таких различий явилось изменение у El Tor вибрионов ряда биохимических свойств, снижение уровня вирулентности, но одновременно повышение выживаемости во внешней среде [1, 2].

В начале 1990-х гг. стало известно о возникновении высоковирулентных генетически изменённых штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor или геновариантов, содержащих в опероне *ctxAB*, кодирующем холерный токсин, ген *ctxB* классических вибрионов (аллель *ctxB1*), полученный путем горизонтального переноса генов. В результате геноварианты продуцируют значительно больше холерного токсина по сравнению с типичными вибрионами El Tor, имеющими аллель *ctxB3* [3]. В ходе эволюции возбудителя происходили дальнейшие изменения структуры генома геновариантов и возникали штаммы с новыми свойствами. Так, в 2007 г. в Индии были обнаружены клоны, одной из генетических особенностей которых было наличие в опероне *ctxAB* нового аллеля гена *ctxB* — *ctxB7*. Указанные штаммы получили широкое распространение, приведя к тяжелым эпидемиям в ряде стран

Африки, Латинской Америки и Юго-Восточной Азии, а будучи завезёнными на территорию Российской Федерации, вызвали единичные случаи холеры [4–7]. Впоследствии в геноме таких штаммов возникли новые мутации в ключевых генах вирулентности и пандемичности, наиболее значимые из них — новый аллель гена *tcpA* (*tcpA*^{CRS}), кодирующего основную субъединицу токсин-корегулируемых пилей адгезии, участвующую в колонизации тонкого кишечника, а также делеция ряда генов в острове пандемичности VSP-II.

Несмотря на активно проводимые исследования молекулярно-генетических и фенотипических свойств генетически изменённых штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor, факторы, способствующие их широкому распространению, до конца не раскрыты. Очевидная высокая вирулентность геновариантов является не единственной причиной их преобладания над типичными изолятами. Высказано предположение, что селективные преимущества геновариантов обусловлены их лучшей адаптацией к изменяющимся условиям окружающей среды [8]. Однако выявление механизмов, обеспечивающих повышенную устойчивость генетически изменённых штаммов *V. cholerae* во внешней среде, невозможно без проведения сравнительной оценки экспрессии генов. В связи с вышеизложенным целью данной работы было сравнительное изучение экспрессии белков у типичных и генетически изменённых штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor с помощью протеомного анализа.

Материалы и методы

В качестве модельных были использованы два клинических штамма *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor: типичный штамм M1062 (Астрахань, 1970; *ctxB3*, *tcpA*^{ElTor}, VSP-II интактный) и геновариант M1509 (Москва, 2012; *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS}, VSP-II с делецией), хранящиеся в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Полногеномные последовательности выбранных штаммов были получены ранее (номер доступа в GenBank: M1062 — SSAB00000000.1; M1509 — NEDZ00000000.1).

Штаммы выращивали в LB бульоне (pH 7,2) в течение 16–18 ч при 37°C. Затем бактериальные клетки осаждали с использованием центрифуги MR23i («Thermo Fisher Scientific») при 15 000 об/мин в течение 20 мин, получая осадок клеток и супернатант. К осадку бактерий добавляли лизирующий буфер (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 2% CHAPS, 0,5% Triton X-100, 20 мМ Tris, 2 мМ MgCl₂, 65 мМ дитиотреитол, 1 мМ Na₂-EDTA или 5 мМ фенолметилсульфонил фторид) в соотношении 1 мл на 100 мг клеток. После добавления буфера клетки обрабатывали на ультразвуковом гомогенизаторе «Bioruptor UCD-200» («Diagenode») циклом озвучивания 30 с ON, 30 с OFF в течение 10 мин при частоте 60 кГц на ледяной бане. Образцы оставляли в лизирующем буфере на 2 ч, затем центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 мин. Экзопротеины получали из супернатанта при добавлении 50% трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 10% с инкубацией на льду в течение 30 мин. Осадок белков дважды промывали холодным ацетоном, высушивали и растворяли в 10 мл холодного 10 мМ Трис-HCl буфера (pH 8,5). Работу с пробами проводили после получения результата об их специфической стерильности¹.

Белковый состав фракций лизатов и экзопротеинов исследовали методом SDS-PAGE-электрофореза [9]. Предварительно устанавливали концентрацию белка в пробах [10]. Для проведения двумерного (2D) электрофореза белков использовали набор для изофокусирования «2-D Starter Kit» («Bio-Rad») и коммерческие IPG-стрипы («Bio-Rad») длиной 17 см с градиентом pH 4–7, широко применяемые для изучения протеома *V. cholerae*. Для визуализации белков электрофореграммы окрашивали кумасси синим G-250. Анализ 2D-гелей проводили с помощью программного обеспечения «Dymension» мультифункциональной системы гель-документирования «Syngene» («G:BOX Chemi XT4»). Изменение экспрессии идентифицированных белков устанавливали по изменению интенсивности белкового пятна на электрофореграмме. Выбранные для ана-

лиза белковые пятна вырезали, обрабатывали трипсином и разделяли на хроматографической колонке «AcclaimPepMap™100» 75 мкм × 25 см, nanoViper C18, 3 мкм 100 Å («Thermo Fisher Scientific»). Масс-спектры получали на тандемном квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре с высоким разрешением класса UHR-TOF с ионизацией электроспреем. Масс-спектры конвертировали в формат Mascotgeneric, учитывая в качестве переменных модификаций карбамидометилирование цистеина, окисление метионина и ацетилирование лизина. Поиск проводили относительно базы данных NCBI² с таксономическим ограничением для исследуемого вида микроорганизмов.

Изучение выживаемости штаммов *V. cholerae* в условиях осмотического и оксидативного стресса проводили по методике, описанной S.N. Wai с соавт. [11]. Культуры анализируемых штаммов в одинаковой концентрации помещали в 3 М раствор NaCl (осмотический стресс) или 20 мМ раствор H₂O₂ (оксидативный стресс) и через равные промежутки времени проводили высевы бактерий на чашки с LB агаром. Через 18–24 ч инкубации посевов при 37°C подсчитывали количество выросших бактерий каждого штамма. Эксперимент проводили трехкратно, результаты представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки средней арифметической.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный протеомный анализ

При проведении 2D-электрофореза у типичного изолята *V. cholerae* M1062 выявлено 231 белковое пятно, у геноварианта M1509 — 229, во фракции экзопротеинов — 71 и 98 соответственно. Для последующей идентификации были взяты белковые пятна, экспрессия которых отличалась в 1,5 раза и более. В лизатах клеток таких белков было 14, из которых были идентифицированы 12; во фракции экзопротеинов — 26, функциональная значимость всех данных белков была установлена.

В результате идентификации (рис. 1) были аннотированы как гипотетические 2 белка в лизатах клеток (№ 10, экспрессия увеличена в 2 раза у штамма M1509; № 12, экспрессия увеличена в 10 раз у штамма M1062) и 4 белка во фракции экзопротеинов (№ 7, 13, 14, экспрессия увеличена в 7, 3, 6 раз соответственно у штамма M1062, и № 23, присутствует только у M1509).

Подавляющая часть других идентифицированных белков в клеточных лизатах изучаемых штаммов функционально связана с углеводным обменом, метаболизмом аминокислот и энергетическими процессами в клетке. Так, у типичного штамма была отмечена повышенная продукция:

¹ СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

² URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

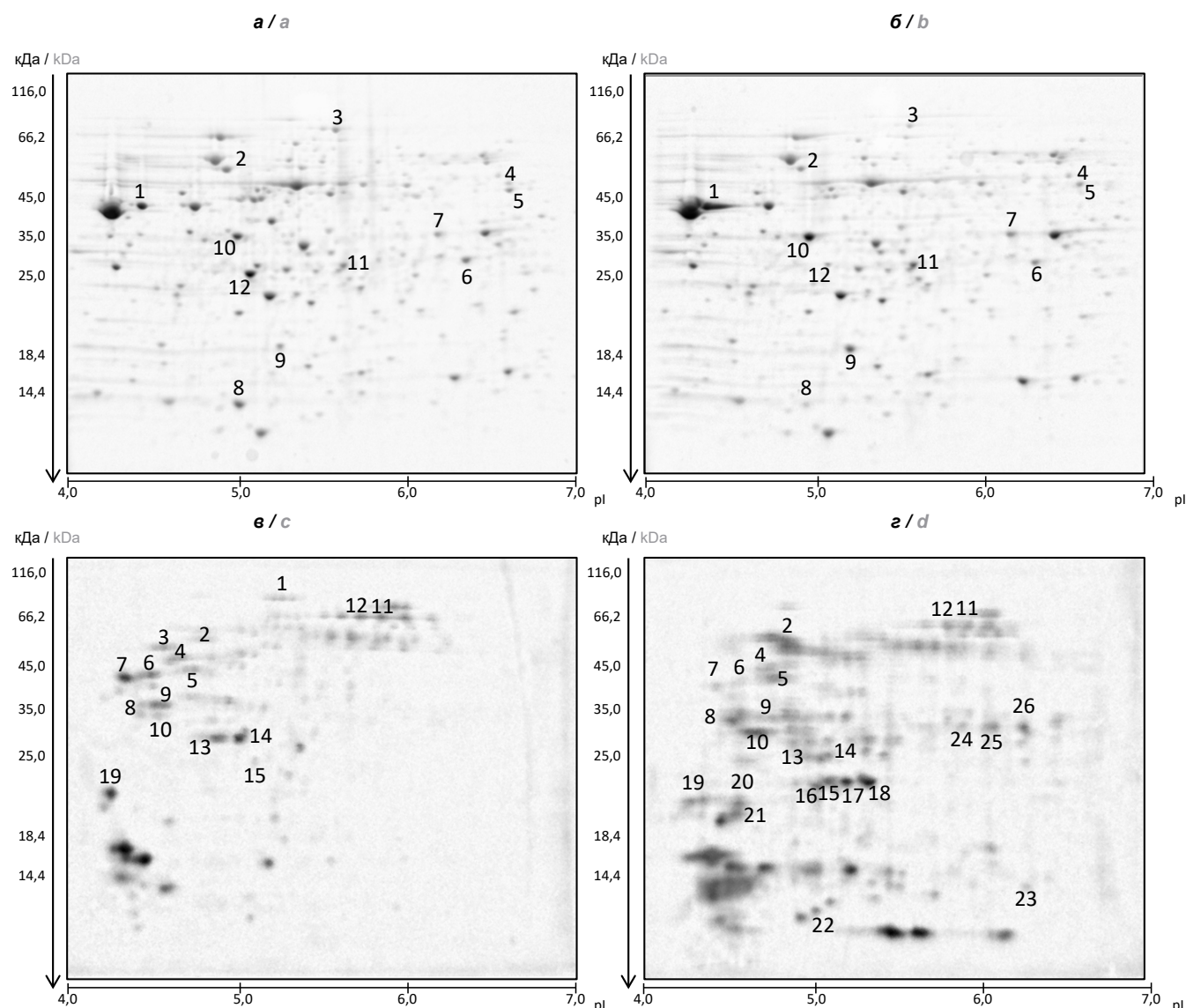


Рис. 1. 2D-электрофореграммы клеточных лизатов (а, б) и фракции экзопротеинов (в, г) типичного штамма *V. cholerae* M1062 биовара Эль Тор (а, в) и геноварианта M1509 (б, г).

Fig. 1. 2D gel electrophoregrams of cell lysates (a, b) and exoprotein fraction (c, d) of a typical strain *V. cholerae* M1062 biotype EI Tor (a, c) and altered EI Tor strain M1509 (b, d).

- β-субъединицы АТФ-синтазы (ЕС 7.1.2.2, пятно № 2, экспрессия увеличена в 2,5 раза), участвующей в процессе синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата;
- фосфатацетилтрансферазы (ЕС 2.3.1.8, пятно № 3, экспрессия увеличена в 1,5 раза), катализирующей переход ацетил-КоА в ацетилфосфат (метаболизм углеводов);
- аланинацетаза (ЕС 5.1.1.1, пятно № 5, экспрессия увеличена в 3,5 раза), превращающей L-аланин в его энантиомер D-аланин, который является структурным компонентом пептидогликана;
- уридинфосфорилазы (ЕС 2.4.2.3, пятно № 6, экспрессия увеличена в 1,5 раза), участвующей

щей в превращении уридина в урацил (метаболизм пиримидинов);

- глицил-радикального кофактора GrcA (пятно № 8, экспрессия увеличена в 3,5 раза), восстанавливающего пируватформатлиазу (метаболизм глюкозы) при ее повреждении в результате оксидативного стресса [12, 13].

При сравнительном анализе белков, содержащихся в лизате клеток геноварианта *V. cholerae* M1509 относительно типичного штамма M1062, обнаружена повышенная экспрессия:

- глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы I типа (ЕС 1.2.1.12, пятно № 7, экспрессия увеличена в 1,5 раза), обеспечивающей окисление глюкозы с образованием пирувино-

градной кислоты и синтезом АТФ в процессе гликолиза;

- аланиндегидрогеназы (ЕС 1.4.1.1, пятно № 4, экспрессия увеличена в 2 раза), участвующей в образовании аминокислоты аланина;
- субстрат-связывающего АВС-транспортёра вольфрама (пятно № 11, экспрессия увеличена в 1,5 раза), осуществляющего перенос вольфрама, являющегося кофактором ряда ферментов.

Кроме того, у штамма М1509 отмечена повышенная экспрессия двух факторов адаптации: белка-порина внешней мембраны OmpT (пятно № 1, экспрессия увеличена в 2 раза) и пептидил-пролил изомеразы (ЕС 5.2.1.8, пятно № 9, экспрессия увеличена в 3 раза). Согласно данным литературы белки-порины внешней мембраны контролируют поступление воды, гидрофобных молекул и питательных веществ в клетки бактерий. Белок OmpT *V. cholerae*, кроме функций порина, выполняет и другие задачи, в том числе способствует выживанию *V. cholerae* при действии стрессовых факторов как *in vivo*, так и *in vitro* [14]. Пептидил-пролил изомеразы, изменяющие пространственную структуру белков, обладают шаперонной активностью и обеспечивают рефолдинг белков, повреждённых стрессом (например, тепловым шоком) [15].

При анализе секретома штамма М1062 отмечен повышенный биосинтез гемолизина (пятно № 1, присутствует только у данного штамма, пятно № 11 и № 12, экспрессия увеличена в 2 раза). Гемолизин относится к дополнительным факторам вирулентности *V. cholerae*, т.к. способствует образованию пор в эукариотических клетках, что приводит их к гибели. У данного штамма также обнаружена повышенная экспрессия белков, обеспечивающих подвижность. Так, жгутиковый белок FlgE в 1 случае обнаружен только у данного штамма (пятно № 3), или его экспрессия увеличена в 6 раз (пятно № 6). Биосинтез флагеллина (пятно № 9) у штамма М1062 увеличен в 3 раза, но снижен в 1,5 раза в пятне № 8. Как известно, подвижность является ключевым фактором для развития инфекционного процесса при холере: неподвижные или малоподвижные вибрионы не способны преодолевать слизистый слой и прикрепляться к эпителиоцитам кишечника человека [16], а во внешней среде у таких штаммов снижена способность к формированию биопленки [17]. Кроме того, в данном штамме продуцируется в 2 раза больше транспортёра длинноцепочечных жирных кислот (пятно № 4), участвующего в трансмембранном переносе липидов.

Относительно секретрируемых белков, в повышенном количестве продуцируемых штаммом М1509, необходимо отметить биосинтез субстрат-связывающего АВС-транспортёра мальтозы MalE (пятно № 5, экспрессия увеличена в 1,7 раза).

Белок MalE с молекулярной массой 42 289 кДа является частью мальтозного комплекса MalEFGK, участвующего в обеспечении клеток *V. cholerae* мальтозой. Штаммы *V. cholerae* с повреждёнными генами мальтозного регулона обладают сниженной патогенностью в результате уменьшения биосинтеза таких факторов вирулентности, как холерный токсин, токсин-корегулируемые пили адгезии, растворимая гемагглютинин-протеаза, а также ослабленным адаптационным потенциалом вследствие сокращения продукции маннозочувствительных пилей адгезии, обеспечивающих прикрепление *V. cholerae* к субстрату при формировании биопленки во внешней среде [18]. Во фракции экзопротеинов, как и в клеточных лизатах, у геноварианта обнаружена повышенная в 2 раза продукция белка-порина внешней мембраны OmpT (пятно № 10). Кроме того, выявлены различия в экспрессии белка внешней мембраны OmpW (пятна № 19, 20, 21), повышающего выживаемость *V. cholerae* в условиях осмотического стресса [19]. В пятне № 19 он присутствует в обоих штаммах (у М1062 экспрессия увеличена в 3 раза), а в пятнах № 20 и № 21 данный белок есть только у М1509. У геноварианта также обнаружено повышенное (2,5 раза) количество N-ацетилглюкозамин-связывающего белка GbrA (пятно № 2), обеспечивающего прикрепление *V. cholerae* к эпителиоцитам кишечника при инфекционном процессе и к хитиновым покровам беспозвоночных при формировании биопленки во внешней среде [20]. Белок С4-дикарбоксилат-субстрат-связывающий АВС-транспортёр (пятна № 24, 25, 26), участвующий в активном транспорте трикарбоновых кислот и являющийся одним из индикаторов интенсивных метаболических процессов в клетках [21], был выявлен только у геноварианта.

Особо следует отметить различия между двумя штаммами в продукции ферментов, защищающих клетку от стрессовых факторов внешней среды. Так, только во фракции экзопротеинов геноварианта обнаружена продукция супероксиддисмутазы (ЕС 1.15.1.1., пятно № 17, 18) и тиоредоксина (пятно № 22). Пероксидаза (ЕС 1.11.1.7) также в большем количестве синтезируется данным штаммом (пятно № 15 — экспрессия увеличена в 3 раза, пятно № 16 присутствует только у М1509). Как известно, пероксидаза непосредственно участвует в расщеплении H_2O_2 , а супероксиддисмутаза превращает образующийся в клетках супероксид-анион в H_2O_2 , которая затем нейтрализуется каталазой и пероксидазой. Тиоредоксин — белок с небольшой молекулярной массой — защищает клетки от действия синглетного кислорода и гидроксильных радикалов, а также выступает в качестве донора водорода для пероксидазы.

Поскольку возможной причиной выявленных отличий в экспрессии идентифицированных белков между типичным штаммом и геновариантом могли

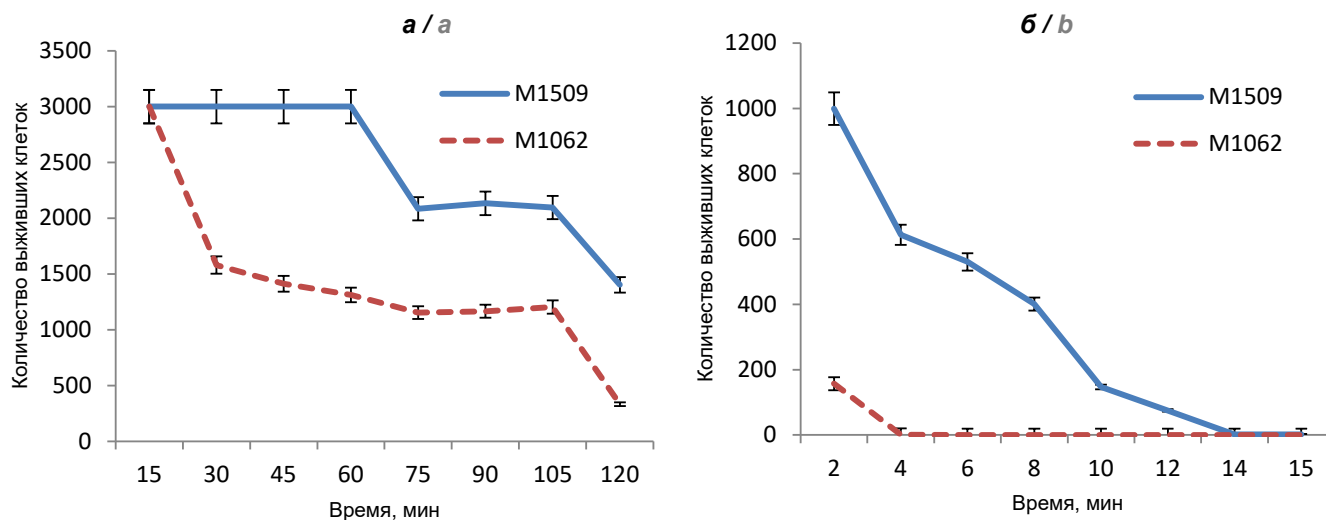


Рис. 2. Выживаемость типичного штамма *V. cholerae* M1062 биовара El Tor и геноварианта M1509 при действии осмотического (а) и оксидативного (б) стресса.

Fig. 2. Survival of a typical strain of *V. cholerae* M1062 biotype El Tor and altered El Tor strain M1509 after osmotic (a) and oxidative (b) stress.

быть изменения в структуре кодирующих генов, мы провели сравнительный анализ их нуклеотидной последовательности. В результате обнаружили, что структура исследуемых генов была одинаковой у обоих штаммов и идентична референсной последовательности штамма *V. cholerae* N16961 биовара El Tor. Исключение составил ген *grcA*, в структуре которого у геноварианта была выявлена делеция аденилового нуклеотида в позиции 41 от начала гена, приводящая к появлению стоп-кодона, вызывающего преждевременную терминацию синтеза белка. Данные изменения в структуре гена *grcA*, вероятно, и являются причиной сниженной продукции штаммом M1509 глицил-радикального кофактора GrcA. Таким образом, изученные штаммы с разным уровнем экспрессии белков, участвующих в энергетическом обмене, процессах метаболизма, транспорта, а также входящих в состав внешней мембраны, практически не различались по структуре исследуемых генов. Полученные данные позволяют предположить, что повышенная экспрессия ряда белков геновариантом могла возникнуть в результате изменения регуляторного механизма транскрипции кодирующих их генов.

Устойчивость штаммов *V. cholerae* M1062 и M1509 к осмотическому и оксидативному стрессу

Учитывая полученные данные о повышенной экспрессии геновариантом M1509 белков, защищающих клетки *V. cholerae* при действии осмотического и оксидативного стресса, на следующем этапе нами была проведена оценка сравнительной устойчивости типичного штамма и геноварианта к действию данных стрессовых факторов. В резуль-

тате изучения выживаемости исследуемых штаммов при действии высоких (3 М) концентраций соли и H_2O_2 (20 мМ) выявлено, что штамм M1509 отличается повышенной устойчивостью к данным стрессовым факторам. Так, через 15 мин инкубации в растворе NaCl количество выросших клеток двух штаммов было практически одинаковым. Однако через 30 мин КОЕ штамма M1509 в 2 раза превышало данный показатель штамма M1062, и до конца эксперимента (120 мин) количество живых бактерий геноварианта было выше, чем у типичного штамма (рис. 2, а). Еще более показательные результаты получены при изучении выживаемости штаммов в условиях оксидативного стресса. Бактерии штамма M1062 оказались значительно более чувствительными и выдерживали не более 4 мин инкубации в 20 мМ растворе H_2O_2 , в то время как у штамма M1509 единичные жизнеспособные клетки обнаруживались и конце эксперимента (12–13 мин инкубации) (рис. 2, б).

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что генетически измененный штамм *V. cholerae* M1509, в отличие от типичного изолята M1062, является более устойчивым к действию осмотического и оксидативного стресса. Вероятно, одной из причин такой устойчивости является повышенный биосинтез данным штаммом пероксидазы, супероксиддисмутазы, тиоредоксина, белков внешней мембраны OmpW и OmpT.

Обсуждение

Глобальное распространение недавно возникших геновариантов возбудителя холеры El Tor, отличающихся от типичных штаммов, вызвавших начало 7-й пандемии холеры, присутствием мута-

ций в различных участках генома, связанных с вирулентным и эпидемическим потенциалом, диктует необходимость сравнительной оценки уровня экспрессии их белков. В результате протеомного анализа лизатов типичного и генетически измененного штаммов белки, которые синтезировались бы только у одного из них, не выявлены. У обоих штаммов обнаружен примерно одинаковый уровень экспрессии белков, участвующих в энергетическом (синтез АТФ) обмене, процессах адаптации (у типичного штамма — белок GrcA, у геноварианта — OmpT и пептидил-пролил изомеразы), а также в различных клеточных процессах. В том числе у типичного штамма — в биосинтезе компонента клеточной стенки, метаболизме ДНК; у геноварианта — белка-транспортера и белковом синтезе.

При анализе экзопротеинов выявлено, что как типичный штамм, так и геновариант продуцируют дополнительные факторы вирулентности (гемолизин, транспортер мальтозы, белки жгутика, GbpA), а также белки, участвующие в процессах метаболизма (транспортер длинноцепочечных жирных кислот, С4-дикарбоксилат-субстрат-связывающий АВС-транспортёр). При этом необходимо отметить, что ряд идентифицированных белков (N-ацетилглюкозамин-связывающий белок GbpA, белки жгутика, субстрат-связывающий АВС-транспортёр мальтозы MalE) являются многофункциональными и участвуют как в патогенезе, так и в процессах адаптации возбудителя холеры к меняющимся условиям внешней среды. В то же время при исследовании секретируемых белков был обнаружен ряд существенных отличий между штаммами относительно продукции белков адаптации. Так, анализ фракции экзопротеинов продемонстрировал усиленный биосинтез штаммом M1509 пероксидазы, супероксиддисмутазы и антиоксиданта тиоредоксина. Особо следует отметить повышенную продукцию белка внешней мембраны OmpW, участвующего в транспорте L-карнитина, относящегося к группе совместимых осморегуляторных веществ [19]. Данная группа низкомолекулярных соединений широко используется многими видами бактерий для поддержания оптимального осмотического давления в цитоплазме клетки.

В ранее проведенном исследовании других модельных штаммов нами показано, что геноварианты *V. cholerae* биовара El Tor отличаются большей устойчивостью к действию осмотического и оксидативного стресса по сравнению с типичными штаммами. При этом более высокая выживаемость геновариантов при действии осмотического стресса была связана с их способностью формировать защитный экзополисахаридный слой раньше, чем типичные штаммы El Tor. Однако причину повышенной выживаемости геновариантов при действии окислительного стресса выявить не удалось [22]. Протеомный анализ позволил глубже понять при-

чины лучшей выживаемости геновариантов в неблагоприятных условиях внешней среды, показав, что механизм их устойчивости к действию как осмотического, так и окислительного стресса связан также с повышенной продукцией защитных белков.

Таким образом, протеомный анализ типичного и генетически измененного штаммов *V. cholerae* биовара El Tor свидетельствует о повышенной экспрессии у геновариантов белков, обеспечивающих устойчивость бактерий к действию стрессовых факторов внешней среды, что, возможно, является одним из механизмов их повышенной выживаемости в меняющихся условиях окружающей среды и, как следствие, их широкого распространения. Кроме того, полученные сведения позволяют выявить новые биомаркеры, которые могут быть использованы для дифференциации типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бароян О.В. *Холера Эль Тор*. М.: Медицина; 1971.
2. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4): 1301–14.
3. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>
4. Kumar P., Jain M., Goel A.K., Bhadauria S., Sharma S.K., Kamboj D.V., et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 2): 234–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.002089-0>
5. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; 69(7-8): 46–53. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109>
7. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11): 2006–8. <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
8. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., et al. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13): 3524–33. <https://doi.org/10.1128/JB.00040-10>
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
11. Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.I., Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance,

- and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(10): 3648–55. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3648-3655.1998>
- Shiba T., Hill R.T., Straube W.L., Colwell R.R. Decrease in culturability of *Vibrio cholerae* caused by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(7): 2583–8. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2583-2588.1995>
 - Wagner A.F., Schultz S., Bomke J., Pils T., Lehmann W.D., Knappe J. YfiD of *Escherichia coli* and Y06I of bacteriophage T4 as autonomous glycyl radical cofactors reconstituting the catalytic center of oxygen-fragmented pyruvate formate-lyase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285(2): 456–62. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5186>
 - Provenzano D., Lauriano C.M., Klose K.E. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *J. Bacteriol.* 2001; 183(12): 3652–62. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3652-3662.2001>
 - Кромина К.А., Игнатов А.Н., Абдеева И.А. Участие пептидил-пролил-цис/транс-изомераз в патологическом процессе. *Биологические мембраны.* 2008; 25(4): 243–51.
 - Gardel C.L., Mekalanos J.J. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect. Immun.* 1996; 64(6): 2246–55. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2246-2255.1996>
 - Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34(3): 586–95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>
 - Lang H., Jonson G., Holmgren J., Palva E.T. The maltose regulon of *Vibrio cholerae* affects production and secretion of virulence factors. *Infect. Immun.* 1994; 62(11): 4781–8. <https://doi.org/10.1128/iai.62.11.4781-4788.1994>
 - Fu X., Zhang J., Li T., Zhang M., Li J., Kan B. The outer membrane protein OmpW enhanced *V. cholerae* growth in hypersaline conditions by transporting carnitine. *Front. Microbiol.* 2018; 8: 2703. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02703>
 - Kirn T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature.* 2005; 438(7069): 863–6. <https://doi.org/10.1038/nature04249>
 - Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(3): 1286–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337479100>
 - Заднова С.П., Плеханов Н.А., Крепостнова И.М., Ерохин П.С., Смирнова Н.И. Влияние осмотического и окислительного стрессов на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2015; 92(6): 55–62.
- clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>- Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Kut'yev V.V. Microevolution of cholera agent in the modern period. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2014; 69(7-8): 46–53. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109> (in Russian)
- Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11): 2006–8. <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
- Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., et al. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13): 3524–33. <https://doi.org/10.1128/JB.00040-10>
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.I., Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(10): 3648–55. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3648-3655.1998>
- Shiba T., Hill R.T., Straube W.L., Colwell R.R. Decrease in culturability of *Vibrio cholerae* caused by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(7): 2583–8. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2583-2588.1995>
- Wagner A.F., Schultz S., Bomke J., Pils T., Lehmann W.D., Knappe J. YfiD of *Escherichia coli* and Y06I of bacteriophage T4 as autonomous glycyl radical cofactors reconstituting the catalytic center of oxygen-fragmented pyruvate formate-lyase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285(2): 456–62. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5186>
- Provenzano D., Lauriano C.M., Klose K.E. Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *J. Bacteriol.* 2001; 183(12): 3652–62. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3652-3662.2001>
- Kromina K.A., Ignatov A.N., Abdeeva I.A. Role of peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerases in pathologic processes. *Biologicheskie membrany.* 2008; 25(4): 243–51. (in Russian)
- Gardel C.L., Mekalanos J.J. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect. Immun.* 1996; 64(6): 2246–55. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2246-2255.1996>
- Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34(3): 586–95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>
- Lang H., Jonson G., Holmgren J., Palva E.T. The maltose regulon of *Vibrio cholerae* affects production and secretion of virulence factors. *Infect. Immun.* 1994; 62(11): 4781–8. <https://doi.org/10.1128/iai.62.11.4781-4788.1994>
- Fu X., Zhang J., Li T., Zhang M., Li J., Kan B. The outer membrane protein OmpW enhanced *V. cholerae* growth in hypersaline conditions by transporting carnitine. *Front. Microbiol.* 2018; 8: 2703. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02703>
- Kirn T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature.* 2005; 438(7069): 863–6. <https://doi.org/10.1038/nature04249>
- Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and

REFERENCES

- Baroyan O.V. *Cholera El Tor [Kholera El' Tor]*. Moscow: Meditsina; 1971. (in Russian)
- Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4): 1301–14.
- Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>
- Kumar P., Jain M., Goel A.K., Bhadauria S., Sharma S.K., Kamboj D.V., et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 2): 234–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.002089-0>
- Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant

- midexponential phase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100(3): 1286–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337479100>
22. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Krepostnova I.M., Erokhin P.S., Smirnova N.I. Effect of osmotic and oxidative stress on strains

of genovariants of *Vibrio cholerae* El Tor biovar. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; 92(6): 55–62. (in Russian)

Информация об авторах

Плекханов Никита Александрович[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>.
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Заднова Светлана Петровна — д.б.н., в.н.с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>.

Крицкий Андрей Александрович — к.б.н., зав. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>.

Полунина Татьяна Алексеевна — к.м.н., с.н.с. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2234-2760>.

Котова Нина Владимировна — м.н.с. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9270-523X>.

Баданин Даниил Вячеславович — м.н.с. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9662-8438>.

Смирнова Нина Ивановна — д.б.н., проф., г.н.с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии РосНИПЧИ «Микроб», 410005, Саратов, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4785-4110>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Nikita A. Plekhanov[✉] — PhD (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>.
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Svetlana P. Zadnova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>.

Andrey A. Kritsky — PhD (Biol.), Head, Laboratory of pathogenic vibrios, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>.

Tatyana A. Polunina — PhD (Med.), senior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2234-2760>.

Nina V. Kotova — junior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9270-523X>.

Daniil V. Badanin — junior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9662-8438>.

Nina I. Smirnova — D. Sci. (Biol.), main researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Department of microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4785-4110>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.