

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-19-25

УДК 616.932:579.61

Н.А. Плеханов, С.П. Заднова, А.А. Крицкий

**БИОПЛЕНКА *VIBRIO CHOLERAE*: МЕХАНИЗМЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ, И СИГНАЛЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ЕЕ ФОРМИРОВАНИЮ**

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В настоящее время общепризнанным является факт, что способность возбудителя холеры формировать биопленку повышает его выживаемость и сохранение как во внешней среде, так и в макроорганизме. В ассоциированном состоянии клетки *V. cholerae* лучше защищены от действия целого ряда стрессовых факторов, более эффективно потребляют питательные вещества и обмениваются генетической информацией. Процесс образования биопленки холерным вибрионом изучен достаточно детально. Однако, учитывая важную роль данной структуры в жизненном цикле *V. cholerae*, исследователи, используя современные методы анализа, получают новые данные или уточняют ранее полученные сведения о лежащих в основе этого процесса молекулярных механизмах. При этом особое внимание уделяется изучению регуляторных механизмов образования биопленки штаммами *V. cholerae*, а также сигналам внешней среды, являющимся триггером при ее формировании. В данном обзоре приведены ранее полученные сведения, а также новые данные о регуляторной сети *V. cholerae*, контролирующей процесс образования биопленки, включающей транскрипционные активаторы, репрессоры, альтернативные сигма-факторы, регуляторные РНК и ряд сигнальных молекул. Отмечено также участие регуляторных механизмов при формировании биопленки в макроорганизме. Представлены данные о сигналах внешней среды (наличие питательных веществ (углеводов), желчи, неорганических веществ, изменение осмолярности среды), стимулирующих/подавляющих ее формирование. Учитывая решающую роль экзополисахарида в процессе образования зрелой биопленки, а также важную роль сигнальных молекул системы Quorum Sensing и 3'-5'-циклического дигуанилатмонофосфата в данном процессе, особое внимание уделено рассмотрению механизмов биосинтеза экзополисахарида и действию указанных сигнальных молекул.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, биопленка, 3'-5'-циклический дигуанилатмонофосфат, Quorum-Sensing.

Корреспондирующий автор: Плеханов Никита Александрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крицкий А.А. Биопленка *Vibrio cholerae*: механизмы, регулирующие образование, и сигналы внешней среды, способствующие ее формированию. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:19–25. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-19-25

N.A. Plekhanov, S.P. Zadnova, A.A. Kritsky

***Vibrio cholerae* Biofilm: Mechanisms, Regulating Formation and Signals of External Environment, Factoring Its Production**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Abstract.** Currently it is a common knowledge that the ability of cholera agent to form biofilm increases the survival rate and persistence both in external environment and macroorganism. *V. cholerae* cells in associated state are better protected from the effect of a range of factors, more effectively consume nutrient substances and exchange genetic information. The process of biofilm formation by cholera vibrio is investigated in sufficient detail. However, taking into consideration the significant role of this structure in the life cycle of *V. cholerae*, researchers obtain new data and clarify earlier gathered information on the molecular mechanisms that lie at the bottom of this process, using advanced analytical methods. Herewith, close attention is paid to studies of regulatory mechanisms of biofilm formation, as well as external environment signals that trigger it. This review presents previously obtained data and new information on *V. cholerae* regulatory network, controlling the process of biofilm formation, including transcriptional activators, repressors, alternative sigma-factors, regulatory RNA, and a range of signal molecules. The role of regulatory mechanisms in biofilm formation inside a macroorganism is also considered in the paper. Given are the data on external environment signals (availability of nutrient substances (carbohydrates), bile, non-organic substances; change in osmolarity of the media), stimulating/suppressing its formation. Taking into account the critical role of exopolysaccharide in mature biofilm formation, as well as significant role of signal molecules of Quorum Sensing system and 3'-5'-cyclic diguanylate monophosphate in the process, a particular attention is drawn to mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis and effect of the mentioned molecules.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, biofilm, 3'-5'-cyclic diguanylate monophosphate, Quorum-Sensing.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nikita A. Plekhanov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritsky A.A. *Vibrio cholerae* Biofilm: Mechanisms, Regulating Formation and Signals of External Environment, Factoring Its Production. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:19–25. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-19-25

Received 15.01.19. Revised 30.01.19. Accepted 31.01.19.

В конце XIX в. Роберт Кох, Луи Пастер и другие ученые положили начало работе с чистыми культу-

рами микроорганизмов. После этого исследователи описывали свойства различных бактерий, находя-

щихся в планктонной, свободноплавающей форме. Однако в настоящее время доказано, что в естественных условиях подавляющее большинство микроорганизмов существует не в виде свободноживущих клеток, а в составе различных ассоциаций, в том числе биопленок – сложных, высокоорганизованных структур, состоящих из микробных клеток, прикрепленных к поверхности, погруженных в общий полимерный матрикс и отличающихся по экспрессии специфических генов [1]. Не является исключением и *Vibrio cholerae*, образующая биопленку при нахождении как в открытых водоемах, так и в кишечнике человека. Доказано, что агрегированными в составе биопленки холерные вибрионы выходят из макроорганизма во внешнюю среду (стул больных содержит не планктонные, а биопленочные формы) [2]. Попадая в открытые водоемы, штаммы *V. cholerae* также образуют биопленку. Показано, что на эндемичной территории токсигенные штаммы холерных вибрионов могут обнаруживаться в свободноплавающей форме во время эпидемий. Однако в межэпидемический период сохраняются и выделяются только в составе биопленок [3]. Несмотря на то, что роль биопленок в инфекционном процессе до сих пор изучается, установлено, что инфекционность биопленочных форм холерного вибриона, содержащих большое количество бактерий, намного выше, чем планктонных клеток [4].

Биопленка выполняет защитную роль, предохраняя клетки холерного вибриона от действия различных стрессовых факторов (высокая концентрация ионов  $\text{Na}^+$ , влияние антибиотиков и дезинфицирующих средств), а также уничтожения простейшими [5, 6]. Кроме того, в составе биопленки у клеток *V. cholerae* более эффективно происходит потребление питательных веществ, а в образованных на хитиновых поверхностях биопленках активируются процессы горизонтального переноса генов [7, 8].

Биопленка холерного вибриона изучена достаточно детально. Описаны этапы ее образования, структура отдельных компонентов, пространственная организация, исследуются сигналы внешней среды, являющиеся триггером для прикрепления бактерий к поверхности и формирования монослоя, а также определены структурные и регуляторные гены, необходимые для развития зрелой трехмерной формы [9–11]. Однако интерес к изучению биопленок *V. cholerae* не ослабевает. Исследователи, используя современные методы анализа, получают новые данные или уточняют ранее полученные сведения о молекулярных механизмах образования биопленки. Активно развивается направление по поиску веществ, способных ингибировать ее формирование, что способно предотвратить широкое распространение возбудителя [12, 13]. В одном обзоре невозможно представить все имеющиеся данные, касающиеся образования биопленки возбудителем холеры, мы акцентировали внимание на регуляторных механизмах, контролирующих ее формирование, и сигналах внешней среды, индуцирующих этот процесс.

**Механизмы, регулирующие формирование биопленки.** Регуляторная сеть, контролирующая формирование биопленки, включает ряд транскрипционных активаторов (VpsR, VpsT, AphA), репрессоры HapR и H-NS, альтернативные сигма-факторы (RpoN, RpoS, RpoE), небольшие регуляторные РНК, а также сигнальные молекулы (рис. 1) [14]. Предполагается, что ключевая роль в регуляции процесса образования биопленки штаммами *V. cholerae* принадлежит сигнальным молекулам системы Quorum Sensing (QS), а также 3'-5'-циклическому дигуанилатмонофосфату (c-di-GMP). QS-система и c-di-GMP контролируют транскрипцию генов, необходимых для биосинтеза экзополисахарида – основного компонента матрикса биопленки.

Циклический di-GMP является одной из важных сигнальных молекул, контролирующей переход не только холерного вибриона, но и других видов бактерий от свободноплавающего состояния к образованию биопленки; c-di-GMP синтезируется в клетках из двух молекул гуанозинтрифосфата при участии фермента дигуанилатциклазы, а расщепляется под действием фосфодиэстеразы. В геноме *V. cholerae* обнаружено 62 гена, кодирующих белки, обладающие дигуанилатциклазной или фосфодиэстеразной активностью, что свидетельствует о разнообразной роли c-di-GMP как вторичного мессенджера [15, 16]. Он необходим практически для каждого этапа образования биопленки – влияет на подвижность вибрионов, адгезию к субстрату, секрецию защитного экзополисахаридного матрикса.

Экспериментально доказано, что высокие внутриклеточные концентрации c-di-GMP ингибируют продукцию и сборку жгутика холерного вибриона, а также снижают подвижность бактерий [15].

Как известно, прикрепление *V. cholerae* к субстрату при образовании биопленки происходит при участии маннозочувствительных гемагглютиниру-

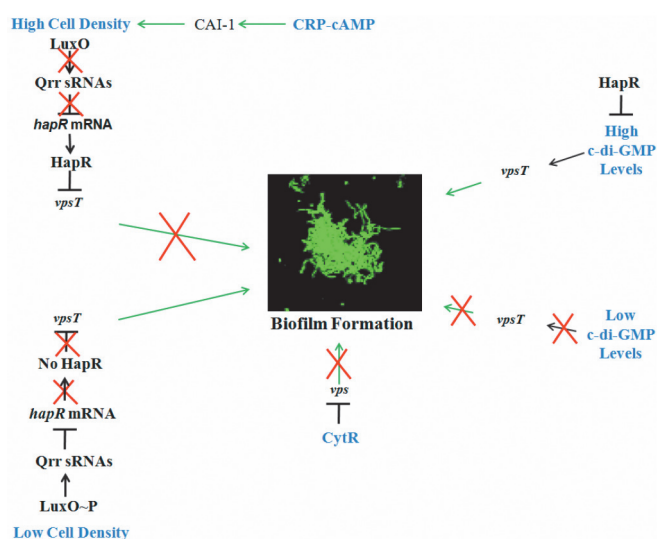


Рис. 1. Регуляция формирования биопленки у холерного вибриона [14]

Fig. 1. Regulation of biofilm formation in cholera vibrio [14]

ющих пилей адгезии (MSHA). MSHA пили имеют субъединичное строение и состоят из белка MshA, кодируемого геном *mshA* [17]. В процессе их полимеризации и сборки участвует белок MshE, обладающий АТФ-азной активностью. В исследованиях K.G. Roelofs *et al.* показано, что c-di-GMP связывается с белком MshE и активирует его экспрессию. Штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы, утратившие *mshE*, теряют способность к адгезии и образованию биопленки [18]. Таким образом, c-di-GMP-опосредованный синтез MSHA пилей является одним из ключевых этапов формирования биопленки, интенсивность протекания которого зависит от концентрации данного вторичного мессенджера.

Производство основного компонента биопленки – экзополисахарида, содержание которого может составлять 85 % от всего объема биопленки, обеспечивается работой генов *vps* (30,7 т.п.н.) (от англ. *Vibrio polysaccharide synthesis*), которые расположены на большой хромосоме в двух кластерах – *vpsI* (*vpsA-K*) и *vpsII* (*vpsL-Q*) (рис. 2). По выполняемым функциям данные гены разделены на шесть классов. Первый класс генов (*vpsA* и *vpsB*) отвечает за биосинтез структурных молекул-предшественников, необходимых для продукции полисахаридов; второй (*vpsD*, *vpsI*, *vpsK* и *vpsL*) – кодирует ферменты, относящиеся к гликозилтрансферазам, которые катализируют перенос остатков сахаров к акцепторным молекулам, образуя гликозидные связи; гены третьего класса (*vpsE*, *vpsH*, *vpsN*, *vpsO*) обеспечивают полимеризацию и экспорт экзополисахарида; четвертого (*vpsC* и *vpsG*) – кодируют ацетилтрансферазу, переносящую ацетильные группы к молекулам полисахарида; пятого (*vpsU*) – фосфотирозин протеинфосфатазу, элиминирующую фосфатную группу у тирозин-фосфорилированных белков. В шестой класс объединены гены (*vpsF*, *vpsJ*, *vpsM*, *vpsP*, *vpsQ*), функциональная роль которых пока не выяснена, но известно, что мутации в *vpsF*, *vpsJ*, *vpsM* приводят к утрате продукции штаммом *V. cholerae* экзополисахарида [19]. Необходимо отметить, что мутации в любом гене *vps* кластера снижают способность вибрионов формировать биопленку [10, 20, 21].

Между кластерами *vpsI* и *vpsII* находятся пять *rbmA-F* генов (от англ. *rugosity and biofilm structure modulators*), необходимых для формирования и поддержания сложной архитектуры биопленки (рис. 2). Секретируемый белок RbmA, кодируемый первым геном, выполняет одновременно структурную и регуляторную функции, участвует в стабилизации

структуры биопленки, а также контролирует содержание в клетке c-di-GMP. Потеря RbmA приводит к тому, что биопленка становится хрупкой и легко растворяется при обработке детергентами [22].

Экспрессию генов *vps* контролируют два регуляторных белка – VpsR и VpsT (от англ. *Vibrio polysaccharide*), которые гомологичны белкам двухкомпонентных регуляторных систем [20, 23]. При этом VpsR непосредственно активирует экспрессию генов биосинтеза экзополисахарида, а также генов, кодирующих белки матрикса биопленки. Кроме того, данный белок контролирует продукцию белка AphA, который является важным регулятором биосинтеза факторов вирулентности (холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии), а также активирует экспрессию VpsT [24].

Экспериментально доказано, что c-di-GMP способен образовывать комплекс с белком VpsR (константа связывания = 1,6  $\mu$ M) [25]. Возможно, связывание с c-di-GMP облегчает взаимодействие VpsR с РНК-полимеразой или индуцирует конформационные изменения, способствующие активации транскрипции [26]. Таким образом, c-di-GMP регулирует продукцию экзополисахаридного матрикса, влияя на транскрипцию регуляторных генов *vpsR* и *vpsT*.

Не менее важную роль в регуляции формирования биопленки играет система QS, работа которой зависит от продукции, секреции и детекции определенных сигнальных молекул – аутоиндукторов (AI), позволяющих синхронизировать поведение клеток в популяции [27]. Как правило, бактерии синтезируют сразу несколько видов AI. Часть из них используется для межвидовой коммуникации, остальные – для регуляции внутри популяции [28]. У штаммов *V. cholerae* хорошо изучены два вида аутоиндукторов: CAI-1 – (S)-3-гидрокситридекан-4-он и AI-2 – (2S,4S)-2-метил-2,3,3,4-тетрагидрокситетрагидрофуран-борат [29, 30]. Однако некоторые исследователи предполагают существование дополнительных систем [29, 31].

При низкой плотности микробной популяции (т.е. при низкой концентрации секретируемых AI) периплазматические рецепторы к AI CqsS и LuxP/Q работают как киназы, фосфорилируя белок LuxU, который затем передает фосфатную группу белку LuxO, активируя его. Фосфорилированный LuxO~P совместно с сигма-фактором  $\sigma^{54}$  (продуктом регуляторного гена *rpoN*) активируют экспрессию четырех некодирующих РНК или QrrsRNAs (от англ. Quorum Regulatory small RNA), имеющих сложную струк-

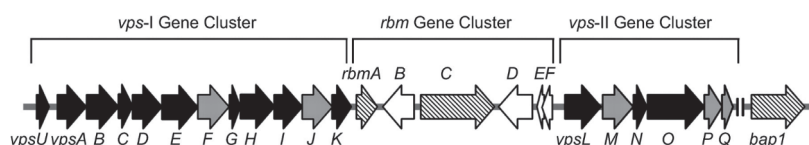


Рис. 2. Организация кластеров генов, участвующих в биосинтезе экзополисахарида *V. cholerae*, и белков матрикса биопленки [19]

Fig. 2. Structural arrangement of gene clusters participating in biosynthesis of *V. cholerae* exopolysaccharide and matrix proteins of biofilm [19]



туру и специфичных для рода *Vibrio*. QrrsRNAs, образуя комплекс с белком-шапероном Hfq, дестабилизируют матричную РНК, кодирующую основной QS-регулятор – белок HarP [32]. В результате HarP не синтезируется, в то же время продуцируются факторы вирулентности (холерный токсин и токсин-корректируемые пили адгезии), а также повышается биосинтез экзополисахарида, необходимого для формирования зрелой биопленки (рис. 1).

При увеличении популяции холерного вибриона происходит накопление CAI-1, LuxO не фосфорилируется и не активирует транскрипцию QrrsRNAs. Продукция факторов патогенности прекращается. Синтезируемый белок HarP подавляет продукцию экзополисахарида, но в то же время происходит активация глобального стрессового регулятора *rpoS*. Клетки в составе зрелой биопленки переходят в стационарное состояние и характеризуются высоким уровнем экспрессии генов факторов адаптации. В кишечнике человека биосинтез HarP стимулирует продукцию растворимой гемагглютинин/протеазы (HAR), которая способствует откреплению холерного вибриона от эпителиоцитов кишечника и выходу во внешнюю среду.

Несмотря на то, что все известные на сегодняшний день гены-мишени, регулируемые системой QS, связаны с HarP, некоторые вирулентные штаммы (референс-штамм *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор, *V. cholerae* O395 классического биовара), имея мутацию в гене *hapR*, способны формировать биопленку [33]. Вероятно, существуют альтернативные механизмы регуляции вирулентности и формирования биопленки в зависимости от плотности клеточной популяции даже при отсутствии регулятора HarP. Необходимо отметить, что кроме HarP существует и другой негативный регулятор формирования биопленки, а также генов вирулентности – нуклеотид-ассоциированный белок H-NS (от англ. Histone-like nucleoid structuring protein). Показано, что данный белок подавляет экспрессию генов *vpsL*, *vpsA* и *vpsT* как *in vitro*, так и *in vivo*, однако его участие в регуляции других необходимых для формирования биопленки генов пока не установлено [24, 34].

Следует отметить, что компоненты системы QS и вторичный мессенджер c-di-GMP являются мишенями для низкомолекулярных веществ, выступающих в роли ингибиторов образования биопленки [12].

**Сигналы внешней среды, индуцирующие образование биопленки штаммами *V. cholerae*.** Переход бактерий от планктонной стадии к формированию биопленки в первую очередь стимулируется наличием субстрата для прикрепления. Биопленка может образовываться на поверхности зоопланктона, насекомых, ракообразных, основным компонентом экзоскелета которых является хитин; минеральных частиц, включающих отрицательно заряженные ионы кремния; технологического оборудования; продуктов питания; тканей растений и животных и т.д. [7, 35–38].

К сигналам внешней среды, индуцирующим образование биопленки, относятся изменение осмотичности и pH среды, концентрации ионов металлов (кальция, железа), фосфатов, содержание кислорода, желчи, питательных веществ [1, 39–44]. При этом снижение в среде доступных для клетки питательных веществ, в том числе углеводов, является одним из основных сигналов, стимулирующих образование биопленки холерным вибрионом. Высоко консервативной системой, контролирующей поступление углеводов в клетки различных микроорганизмов, в том числе и холерного вибриона, является фосфонолпируват фосфотрансферазная система (ФТС) [45]. Она включает в себя два связывающих цитоплазматических белка (EnzymeI и HPr), а также ряд ферментов, обеспечивающих транспорт и фосфорилирование поступающих внутрь клетки сахаров [46]. Например, глюкоза модифицируется до глюкозомонофосфата. В данной форме глюкоза не может пройти через клеточную мембрану и накапливается внутри клеток. В результате фосфорилирования концентрация свободной глюкозы в клетках резко снижается, и данный углевод начинает поступать из среды путем пассивного транспорта. При отсутствии в среде транспортируемых сахаров ферменты системы находятся в фосфорилированном состоянии, в то время как при активном переносе углеводов они быстро дефосфорилируются. Эксперименты L. Houot *et al.* [45] и P. Ymele-Leki *et al.* [47] наглядно показывают связь между активностью компонентов ФТС и формированием биопленки у штаммов *V. cholerae*. Например, морские водоросли наряду с другими запасными полисахаридами в значительном количестве синтезируют маннит. В составе ФТС холерного вибриона имеется фермент ЕП<sup>MII</sup>, благодаря которому бактерии могут реагировать на присутствие маннита в среде и утилизировать его. Показано, что даже в незначительной (400 мМ) концентрации маннит активирует транскрипцию генов *vps*-оперона. Однако на поверхности фитопланктона концентрация маннита может достигать 700 мМ и выше. Представленные данные еще раз доказывают важную роль фитопланктона в качестве субстрата при формировании биопленки.

Активно исследуются механизмы влияния желчи на процесс формирования биопленки штаммами *V. cholerae* в кишечнике человека. Как известно, желчь повреждает клеточную мембрану холерного вибриона, индуцирует оксидативный стресс, а также приводит к конформационным изменениям белков и нарушает содержание ионов Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> и Ca<sup>2+</sup> [48]. Среди компонентов желчи наиболее активно воздействуют на сигнальные системы *V. cholerae* желчные кислоты, в ответ на действие которых повышается внутриклеточная концентрация c-di-GMP (в 3–10 раз), активируется транскрипция регуляторного гена *vpsT* и стимулируется процесс формирования биопленки. Данный процесс прерывается после проникновения возбудителя холеры через защитный слизистый слой

к эпителиоцитам кишечника. Значительная концентрация карбонатов слизистого слоя и высокие значения pH нивелируют влияние желчных кислот на внутриклеточную концентрацию c-di-GMP, в результате чего содержание c-di-GMP в клетках снижается, экспрессия генов *vps* подавляется, но активируется продукция холерного токсина [49].

Увеличение продукции экзополисахарида и формирование биопленки в ответ на действие желчных кислот является одним из механизмов адаптации холерного вибриона не только к действию желчи, но и к низким значениям pH, антимикробным пептидам, а также иммуноглобулину класса A, препятствующему адгезии патогенных микроорганизмов к энтероцитам [39, 50].

В роли сигнальной молекулы, которая продуцируется нормальной микрофлорой кишечника человека, также выступает индол, положительно контролирующей продукцию регуляторного белка DksA, который, активируя работу генов *vps*-оперона, стимулирует биосинтез экзополисахарида и формирование биопленки [51]. Кроме того, индол увеличивает экспрессию генов, позитивно регулирующих подвижность, отвечающих за транспорт ионов и утилизацию железа, а также способствующих устойчивости холерного вибриона к уничтожению простейшими.

Важная роль в процессе формирования биопленки штаммами *V. cholerae* принадлежит неорганическим веществам. В пресных водоемах и эстуариях клетки холерного вибриона находятся в условиях дефицита фосфатов, что является серьезным фактором, подавляющим процесс биопленкообразования [52]. В качестве особого механизма, чувствительного к концентрации неорганического фосфора, а также необходимого для выживания холерного вибриона в открытых водоемах, выступает двухкомпонентная регуляторная система PhoBR. На поздней стадии инфекции данная система репрессирует экспрессию генов вирулентности, но индуцирует биосинтез факторов адаптации, в том числе увеличивает экспрессию гена *rpoS*, а также подвижность клеток и способность к формированию биопленки. У штаммов с дефектными генами *phoB/phoR* наблюдается как выраженное снижение скорости роста на средах с недостаточным содержанием фосфора и повышение чувствительности к низким значениям pH среды, так и увеличение устойчивости к осмотическому и температурному стрессам. Протеомный анализ данных штаммов выявил сниженную экспрессию генов, участвующих в энергетических процессах, а также в транспорте и метаболизме аминокислот. Система PhoB/PhoR регулирует формирование биопленки и ее деградацию независимо от работы гена *hapR* [41, 53].

На формирование биопленки также может оказывать влияние сильно варьирующаяся в водных экосистемах концентрация ионов кальция. Показано, что высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде подавляют

экспрессию генов, необходимых для формирования биопленки. В первую очередь снижается транскрипция регуляторных генов *vpsR* и *vpsT*, которые позитивно регулируют транскрипцию структурных генов *vps*-оперона, ответственных за биосинтез и продукцию экзополисахарида [54]. Кроме того, уменьшается экспрессия белков RbmA, RbmC, RbmF, Var1, которые играют важную роль в поддержании и стабилизации сложной трехмерной структуры биопленки. Добавление  $\text{Ca}^{2+}$  в среду выращивания приводит к уменьшению толщины биопленки, плотности покрытия клетками субстрата, а также подавляет формирование микроколоний и, в конечном счете, может индуцировать распад биопленки.

Значительное влияние на экспрессию генов *vps*-оперона оказывает изменение осмолярности среды. Несмотря на важную роль осмопротекторов в выживании *V. cholerae*, механизмы их продукции в ответ на повышение осмолярности до конца не изучены. Показана важная роль транскрипционного регулятора CosR (от англ. Compatible solute regulator), который является негативным регулятором биосинтеза осмопротектора эктоина. В условиях повышенной концентрации соли (эстуарии, мелкие пересыхающие водоемы) CosR активирует процесс формирования биопленки, но подавляет экспрессию генов, ответственных за подвижность, независимо от его функции в качестве регулятора эктоина. В условиях низкого содержания NaCl (например, в речной воде) повышается активность другого регулятора – OsmR (от англ. Osmolarity controlled regulator), относящегося к семейству IclR (Isocitratelase) транскрипционных регуляторов, присутствующих у различных грамотрицательных и грамположительных бактерий. Белок OsmR увеличивает подвижность, но подавляет формирование биопленки, снижая транскрипцию генов *vps* [43, 55].

Показано, что в водной среде холерный вибрион, находясь в составе биопленки, способен утилизировать гемоглобин морских беспозвоночных [56], что подтверждает необходимость присутствия ионов железа для успешного протекания процессов ее образования. Исследование S. Craig, посвященное работе системы утилизации и транспорта железа у *V. cholerae*, наглядно показывает важность ионов  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  для биопленкообразования [14]. Так, у штамма *V. cholerae* N16961, культивируемого в условиях дефицита железа, значительно снижалась способность образовывать биопленку. Однако экспериментально полученные штаммы, имеющие единичные мутации в генах *irgA* и *vctA* (синтез и продукция энтеробактина), *vibB* и *viuA* (синтез и транспорт вибриобактина), *hutR*, *hasR*, *hutA* (транспорт гема) и *fbp* (транспорт ионов железа), образовывали биопленку. В то же время у штаммов с дефектной структурой *ryh*-регулона, в состав которого входят гены, кодирующие железосодержащие белки, участвующие в цикле трикарбоновых кислот, а также белки, связанные с подвижностью и хемотаксисом, по сравнению с

исходным штаммом, способность образовывать биопленку снижалась более чем в пять раз. Необходимо отметить, что кроме ионов железа ряд других ионов двухвалентных металлов также оказывают влияние на возможность *V. cholerae* формировать биопленку. Так, например, *ruh*-дефектные штаммы восстанавливали способность образовывать биопленку при добавлении в среду культивирования ионов  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $Co^{2+}/Co^{3+}$ . Предположительно, эти соединения являются кофакторами ферментов, работающих на разных этапах формирования биопленки [56].

В 2004 г. F.H. Yildiz *et al.* [57] высказали предположение, что регуляторная система, обеспечивающая синтез экзополисахарида и формирование биопленки, функционирует не только при нахождении холерного вибриона во внешней среде, но и в организме человека и связана с системой, контролирующей продукцию факторов патогенности. B.W. Lim *et al.* [58], а впоследствии и другие исследователи, экспериментально подтвердили данное предположение, установив, что c-di-GMP, являющийся положительным регулятором транскрипции генов *vps* и увеличивающий синтез экзополисахарида и формирование биопленки, контролирует также продукцию факторов вирулентности у *V. cholerae*. Непосредственное участие в развитии инфекционного процесса принимает и QS-система – при низкой плотности клеточной популяции наблюдается продукция холерного токсина и токсин-корректируемых пилей адгезии. Дальнейший рост микробной популяции приводит к увеличению концентрации AI и к подавлению биосинтеза факторов патогенности. Кроме того, высокое содержание AI стимулирует продукцию растворимой гемагглютинин/протеазы, которая способствует отделению клеток холерного вибриона от рецепторов эпителиоцитов кишечника и выходу их во внешнюю среду.

Таким образом, в последние годы сделаны большие успехи в изучении молекулярных механизмов образования биопленки возбудителем холеры и ее роли в сохранении патогена в окружающей среде и развитии инфекционного процесса. Однако многие вопросы остаются открытыми. В том числе не до конца изучены сигналы внешней среды и макроорганизма, индуцирующие ее образование. Неполными являются данные о формировании биопленки *in vivo* и ее участие в развитии инфекционного процесса. Актуальным также является поиск соединений, влияющих на работу регуляторных систем и подавляющих образование биопленки, что может привести к развитию нового направления в лечении и профилактике холеры.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

## References / Список литературы

1. Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int. Microbiol.* 2006; 9(1):21–8. PMID: 16636986.

2. Faruque S.M., Biswas K., Udden S.M., Ahmad Q.S., Sack D.A., Nair G.B., Mekalanos J.J. Transmissibility of cholera: *in vivo*-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(16):6350–5. DOI: 10.1073/pnas.0601277103.
3. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae*: Genomics and molecular biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK: Horizon Scientific Press; 2008. 218 p.
4. Alam A., Larocque R.C., Harris J.B., Vanderspurt C., Ryan E.T., Qadri F., Calderwood S.B. Hyperinfectivity of human-passaged *Vibrio cholerae* can be modeled by growth in the infant mouse. *Infect. Immun.* 2005; 73(10):6674–9. DOI: 10.1128/IAI.73.10.6674-6679.2005.
5. Augustin M., Ali-Vehmas T., Atroshi F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *J. Pharm. Pharmacol. Sci.* 2004; 7(1):55–64.
6. Chavez-Dozal A., Gorman C., Erken M., Steinberg P.D., McDougald D., Nishiguchi M.K. Predation response of *Vibrio fischeri* biofilms to bacterivorous protists. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(2):553–8. DOI: 10.1128/AEM.02710-12.
7. Watnick P.J., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34(3):586–95. PMID: 10564499. PMCID: PMC2860543.
8. Meibom K.L., Blokesch M., Dolganov N.A., Wu C.Y., Schoolnik G.K. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science.* 2005; 310(5755):1824–7. DOI: 10.1126/science.1120096.
9. Wong G.C. Three-dimensional architecture of *Vibrio cholerae* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113(14):3711–3. DOI: 10.1073/pnas.1603016113.
10. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(7):4028–33. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4028.
11. Kim 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. DOI: 10.1038/nature04249.
12. Van Dellen K.L., Watnick P.I. The *Vibrio cholerae* biofilm: a target for novel therapies to prevent and treat cholera. *Drug Discovery Today Dis. Mech.* 2006; 3(2):261–6. DOI: 10.1016/j.ddmec.2006.06.013.
13. Hung D.T., Shakhnovich E.A., Pierson E., Mekalanos J.J. Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science.* 2005; 310(5748):670–4. DOI: 10.1126/science.1116739.
14. Craig S.A. Regulation of biofilm formation and outer membrane protein expression in *Vibrio cholerae* by iron [dissertation]. Austin: The University of Texas; 2008. (Cited 18 Jan 2019). Available from: <https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/17845>.
15. Srivastava D., Hsieh M.L., Khataokar A., Neiditch M.B., Waters C.M. Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 2013; 90(6):1262–76. DOI: 10.1111/mmi.12432.
16. Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., Yildiz F.H. Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J. Bacteriol.* 2006; 188(10):3600–13. DOI: 10.1128/JB.188.10.3600-3613.2006.
17. Jonson G., Lebens M., Holmgren J. Cloning and sequencing of *Vibrio cholerae* mannose-sensitive haemagglutinin pilin gene: localization of *mshA* within a cluster of type 4 pilin genes. *Mol. Microbiol.* 1994; 13(1):109–18. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00406.x.
18. Roelofs K.G., Jones C.J., Helman S.R., Shang X., Orr M.W., Goodson J.R., Galperin M.Y., Yildiz F.H., Lee V.T. Systematic identification of cyclic-di-GMP binding proteins in *Vibrio cholerae* reveals a novel class of cyclic-di-GMP-binding ATPases associated with Type II secretion systems. *PLoS Pathog.* 2015; 11(10):e1005232. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005232.
19. Fong J.C., Syed K.A., Klose K.E., Yildiz F.H. Role of *Vibrio* polysaccharide (*vps*) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology.* 2010; 156(Pt 9):2757–69. DOI: 10.1099/mic.0.040196-0.
20. Yildiz F.H., Dolganov N.A., Schoolnik G.K. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS(ETR)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* 2001; 183(5):1716–26. DOI: 10.1128/JB.183.5.1716-1726.2001.
21. Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3):109–18. DOI: 10.1016/j.tim.2008.12.004.
22. Fong J.C., Karplus K., Schoolnik G.K., Yildiz F.H. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3):1049–59. DOI: 10.1128/JB.188.3.1049-1059.2006.
23. Casper-Lindley C., Yildiz F.H. VpsT is a transcriptional



- regulator required for expression of vps biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* 2004; 186(5):1574–8. DOI: 10.1128/JB.186.5.1574-1578.2004.
24. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):593–633. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.
25. Srivastava D., Harris R.C., Waters C.M. Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of *vpsT* and *aphA* in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(22):6331–41. DOI: 10.1128/JB.01567-11.
26. Conner J.G., Zamorano-Sánchez D., Park J.H., Sondermann H., Yildiz F.H. The ins and outs of cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017; 36:20–9. DOI: 10.1016/j.mib.2017.01.002.
27. Waters C.M., Bassler B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2005; 21:319–46. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.
28. Federle M.J., Bassler B.L. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(9):1291–9. DOI: 10.1172/JCI20195.
29. Miller M.B., Skorupski K., Lenz D.H., Taylor R.K., Bassler B.L. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell.* 2002; 110(3):303–14. PMID: 12176318.
30. Higgins D.A., Pomianek M.E., Kraml C.M., Taylor R.K., Semmelhack M.F., Bassler B.L. The major *Vibrio cholerae* auto-inducer and its role in virulence factor production. *Nature.* 2007; 450(7171):883–6. DOI: 10.1038/nature06284.
31. Jung S.A., Chapman C.A., Ng W.L. Quadruple quorum-sensing inputs control *Vibrio cholerae* virulence and maintain system robustness. *PLoS Pathog.* 2015; 11(4):e1004837. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004837.
32. Lenz D.H., Mok K.C., Lilley B.N., Kulkarni R.V., Wingreen N.S., Bassler B.L. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell.* 2004; 118(1):69–82. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.009.
33. Hammer B.K., Bassler B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2003; 50(1):101–4. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x.
34. Teschler J., Zamorano-Sanchez D., Utada A.S., Warner C.J.A., Wong G.C.L., Lenington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13:255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.
35. Colwell R.R., Spira W.M. The ecology of *Vibrio cholerae*. In: Barua D., Greenough W.B., editors. *Cholera. Current Topics in Infectious Disease.* Springer, Boston, MA; 1992. P. 107–27.
36. Zegans M.E., Becker H.I., Budzik J., O'Toole G. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol.* 2002; 21(5–6):415–20. DOI: 10.1089/10445490260099700.
37. Haugo A.J., Watnick P.I. *Vibrio cholerae* CytR is a repressor of biofilm development. *Mol. Microbiol.* 2002; 45(2):471–83. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03023.x.
38. Pruzzo C., Tarsi R., Lleó M.M., Signorello C., Zampini M., Pane L., Colwell R.R., Canepari P. Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water. *Environ. Microbiol.* 2003; 5(10):850–8. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00498.x.
39. Hung D.T., Zhu J., Sturtevant D., Mekalanos J.J. Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59(1):193–201. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04846.x.
40. Bilecen K., Yildiz F.H. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(8):2015–29. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x.
41. Pratt J.T., McDonough E., Camilli A. PhoB regulates motility, biofilms, and cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(21):6632–42. DOI: 10.1128/JB.00708-09.
42. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009; 11(7):1034–43. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x.
43. Shikuma N.J., Yildiz F.H. Identification and characterization of OsrR, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(13):4082–96. DOI: 10.1128/JB.01540-08.
44. Landini P., Antoniani D., Burgess J.G., Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 86(3):813–23. DOI: 10.1007/s00253-010-2468-8.
45. Houot L., Chang S., Pickering B.S., Absalon C., Watnick P.I. The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. *J. Bacteriol.* 2010; 192(12):3055–67. DOI: 10.1128/JB.00213-10.
46. Kotrba P., Inui M., Yukawa H.J. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J. Biosci. Bioeng.* 2001; 92(6):502–17. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80308-X.
47. Ymele-Leki P., Houot L., Watnick P.I. Mannitol and the mannitol-specific enzyme IIB subunit activate *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(15):4675–83. DOI: 10.1128/AEM.01184-13.
48. Begley M., Gahan C.G., Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005; 29(4):625–51. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.09.003.
49. Koestler B.J., Waters C.M. Intestinal GPS: bile and bicarbonate control cyclic di-GMP to provide *Vibrio cholerae* spatial cues within the small intestine. *Gut. Microbes.* 2014; 5(6):775–80. DOI: 10.4161/19490976.2014.985989.
50. Koestler B.J., Waters C.M. Bile acids and bicarbonate inversely regulate intracellular cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2014; 82(7):3002–14. DOI: 10.1128/IAI.01664-14.
51. Mueller R.S., Beyhan S., Saini S.G., Yildiz F.H., Bartlett D.H. Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(11):3504–16. DOI: 10.1128/JB.01240-08.
52. Correll D.L. Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. *Poult. Sci.* 1999; 78(5):674–82. DOI: 10.1093/ps/78.5.674.
53. Lery L.M., Goulart C.L., Figueiredo F.R., Verdoorn K.S., Einicker-Lamas M., Gomes F.M., Machado E.A., Bisch P.M., von Kruger W.M. A comparative proteomic analysis of *Vibrio cholerae* O1 wild-type cells versus a *phoB* mutant showed that the PhoB/PhoR system is required for full growth and rpoS expression under inorganic phosphate abundance. *J. Proteomics.* 2013; 86:1–15. DOI: 10.1016/j.jpro.2013.04.038.
54. Bilecen K., Yildiz F.H. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(8):2015–29. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x.
55. Shikuma N.J., Davis K.R., Fong J.N., Yildiz F.H. The transcriptional regulator, CosR, controls compatible solute biosynthesis and transport, motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(5):1387–99. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02805.x.
56. Mey A.R., Payne S.M. Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol. Microbiol.* 2001; 42(3):835–49. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02683.x.
57. Yildiz F.H., Liu X.S., Heydorn A., Schoolnik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(2):497–515. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04154.x.
58. Lim B., Beyhan S., Meir J., Yildiz F.H. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2006; 60(2):331–48. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05106.x.

# Authors:

Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritsky A.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

# Об авторах:

Плеханов Н.А., Заднова С.П., Критский А.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 15.01.19.

Отправлена на доработку 30.01.19.

Принята к публ. 31.01.19.