

Б.Н.Мишанькин, О.В.Дуванова, Л.В.Романова, Е.С.Шипко, А.С.Водопьянов

МЕМБРАННЫЙ БЕЛОК *OmpT* ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ОМПТИНОВ СЕМЕЙСТВА *VIBRIONACEAE*

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону,
Российская Федерация

В работе рассматривается состояние проблемы омптинов энтеробактерий, их структура и функции, а также возможная роль в патогенезе вызываемых ими инфекций. У холерного вибриона выделен и очищен с помощью дифференциального центрифугирования и колоночной хроматографии пориновый белок наружных мембран *OmpT* с молекулярной массой около 40 кДа, синтез которого находится под контролем сложной системы регуляции. Он не содержит в своем составе цистеина, наделен протеолитической активностью с широкой субстратной специфичностью: способен гидролизовать фибрин, протамин, желатин, активировать плазминоген человека в плазмин, что обеспечивает известные преимущества вибрионам во время пребывания в кишечнике чувствительного хозяина. Сравнительный компьютерный анализ аминокислотной последовательности показал, что белок *OmpT* холерного вибриона лишь отдаленно родственен омптинам энтеробактерий (13 % идентичности и сходства) и возможно принадлежит к новому классу поринов семейства *Vibrionaceae*.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, омптин, плазминоген, плазмин, порин.

B.N.Mishan'kin, O.V.Duvanova, L.V.Romanova, E.S.Shipko, A.S.Vodop'yanov

Cholera *Vibrio* Membrane Protein *OmpT* as an Ompitin Belonging to *Vibrionaceae* Family

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Concerned are the issues related to enterobacteria oмпtins, their structure and functionality, as well as alternative role in pathogenesis of the infections induced by them. Isolated from cholera vibrio, and later purified using differential centrifugation and column chromatography has been porin protein of the *OmpT* outer membranes, with the molar mass of approximately 40 kDa. Synthesis of porin is under control of the complex regulatory system. It does not contain cysteine, but possesses proteolytic activity with broad substrate specificity: it hydrolyzes fibrin, protamin, gelatine; transduces human plasminogen into plasmin, which provides for the well-known advantages for the vibrios in the intestine of a susceptible host. Comparative computer-assisted analysis of amino acid sequence has revealed that cholera vibrio *OmpT* protein relates to the oмпtins of enterobacteria as a far-remotely one, and has 13 % identity and similarity to it. *OmpT* protein is probably affiliated to a new class of porins of the family *Vibrionaceae*.

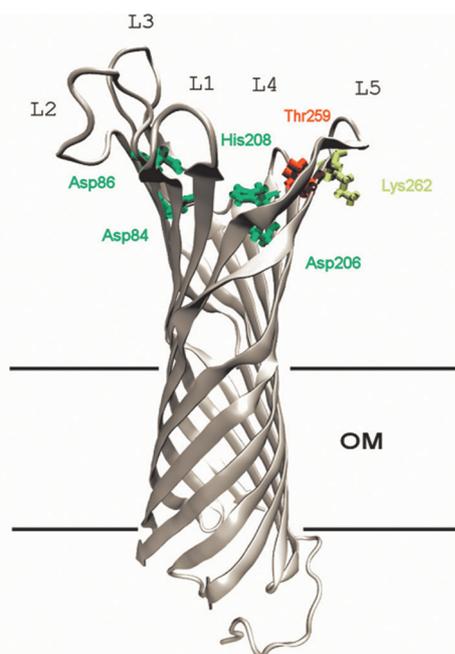
Key words: *Vibrio cholerae*, oмпitin, plasminogen, plasmin, porin.

Омптины – семейство протеаз наружных мембран, идентифицированное у многих представителей патогенных для человека или растений энтеробактерий [12]. Эти специализированные белки участвуют в преодолении врожденных неспецифических защитных сил чувствительного хозяина, способствуя колонизации его отдельных органов. У *Vibrio cholerae* упоминания об омптинах мы не встретили, хотя в последнее время внимание исследователей к мембранному белку *OmpT* значительно увеличилось [4, 6, 19, 26]. В настоящем сообщении мы попытались суммировать имеющиеся данные о белке *OmpT* возбудителя холеры в сравнении с омптинами других бактерий, чтобы лучше понять его значение для биологии вибрионов.

Свое название омптины получили благодаря детальной характеристике *OmpT* (outer membrane protein – белок наружной мембраны) белка кишечной палочки, кристаллическую структуру которого с разрешением в 2,6 Å изучили L.Vandeputte-Rutten *et al.* [30]. Полученные координаты были использованы при моделировании омптинов из других источников,

включая *Pla* из *Yersinia pestis*. Структура *OmpT* представлена вазообразным β-бочонком длиной в 70 Å с 10 антипараллельными β-цепями, удерживаемые четырьмя короткими периплазматическими поворотами и пятью внеклеточными петлями (рисунок). Он простирается наружу на 40 Å от липидного бислоя, а его внешне расположенные петли локализируются как раз над краем коровой области липополисахарида (ЛПС). Каталитические остатки находятся в полости, которая сверху ограничена мобильными короткими петлями. Для проявления своей ферментативной активности *OmpT* нуждается в щелочном значении pH и ЛПС с полностью ацилированным липидом А, который, видимо, индуцирует конформационные изменения в белке, необходимые для формирования «нативной геометрии» активного центра протеазы [10]. О смещении плазминогеном нуклеофильной молекулы воды в активном центре, свободном от ЛПС *Pla Y. pestis*, сообщают и другие исследователи [7].

Омптины близки друг к другу по своей структуре, проявляя до 50 % идентичности, состоят из 290–301 аминокислотного остатка и характеризуются



Модель структуры β -бочонка омпитина *Pla* из *Y. pestis* по Kukkonen M. и Korhonen T. [13]:

OM – наружная мембрана, L1–L5 – поверхностные петли, Asp84, Asp86, Asp206 и His208 – каталитические остатки

ся отсутствием или низким содержанием цистеина. Функционально омпиты являются протеазами и до недавнего времени входили в состав 18S семейства сериновых протеаз, отличавшихся каталитической триадой Ser-Asp-His. Однако при изучении их кристаллической структуры в каталитическом сайте была обнаружена пара аспаргатов, в связи с чем семейство омпитинов было реклассифицировано в семейство 23A аспаргат-протеаз [13]. Сайты расщепления в белковых или пептидных субстратах для *OmpT* и других омпитинов идентифицированы в виде консенсусных последовательностей (Arg/Lys)(Arg/Lys) – Ala [5].

Считается, что биологическая функция омпитинов состоит в поддержании жизненного цикла (life style) конкретного хозяина. Так, показано, что экспрессия активности гена *pla* в составе плазмиды pPCP1 влияет на инвазивность чумного микроба при подкожном заражении мышей, тогда как делеция гена ведет к увеличению значений LD_{50} *Y. pestis* с 50 до 10^7 бактерий, не влияя при этом на результаты внутривенного заражения [23]. В то же время экспрессия гена *pla* особенно не отражалась на вирулентности *Y. pseudotuberculosis* pPCP⁺ при подкожном заражении мышей [14]. *Pla* активирует плазминоген, переводя его в плазмин, и эффективно инактивирует ингибитор α_2 -антиплазмин млекопитающих, что важно для активации проколлагеназ, участвующих в разрушении тканевых барьеров. Наличие полной структуры кора ЛПС – необходимое условие для активации плазминогена клетками *Y. pestis* [1].

Центральная роль активации плазминогена в патогенезе чумы была продемонстрирована J.D.Gogen *et al.* [8] в опытах с использованием *Plg*-дефицитных

мышей, которые оказались в сотни раз более устойчивыми к чумной инфекции по сравнению с нормальными животными.

Pla наделен адгезивной функцией, опосредующей связывание бактерий с ламинином и протеогликаном базальных мембран, а также с внеклеточным матриксом из клеточных линий эпителия и легких человека. Ламинин не гидролизуется *Pla*, но является хорошим субстратом для плазмина после активации *Plg* [9, 15]. *Pla* деградирует белки комплемента, включая C3, C3b и C4b [25], что в итоге снижает интенсивность опсонофагоцитоза и хемотаксиса фагоцитов в места инфекции, способствуя системному распространению *Y. pestis*.

Интересно, что хотя продукт гена *OmpT* *E. coli* и проявляет невысокую способность к активации плазминогена и не расщепляет α_2 -антиплазмин, небольшие структурные модификации в виде мутационных укорочений его поверхностных петель 3 и 4 до размеров *Pla*, а также замещение некоторых остатков вблизи активного центра резко меняют субстратную специфичность белка, позволяя авторам [12] рассматривать этот факт в качестве примера возможного «эволюционного превращения белка жизнеобеспечения (housekeeping protein) в фактор вирулентности». К тому же *OmpT* и *PgtE* *Salmonella enterica* способны протеолитически расщеплять α -, но не β -спиральные катионактивные антимикробные пептиды (дефензины, кателицидины, протамины) животных и растений, что повышает выживаемость бактерий и их устойчивость к факторам врожденного иммунитета хозяина [29, 22].

Холерный вибрион уникален по своей способности вызывать мировые пандемии среди диареегенных патогенов бактериальной природы. Он существует в свободноживущем состоянии, но способен колонизировать тонкий кишечник человека и высвобождать холерный токсин, приводящий к потенциально смертельной секреторной диарее в случае отсутствия надлежащего лечения. Эти две формы – водное окружение и кишечник человека – и составляют суть его жизненного цикла. Во время пребывания в желудочно-кишечном тракте, благодаря координированной экспрессии генов, он преодолевает врожденные защитные силы чувствительного хозяина (кислотное значение pH желудка, желчь, катионактивные белки и др.). Немалую роль здесь играют и регулируемые геном *toxR* белки внешней мембраны *OmpU* и *OmpT*, синтез которых хотя и не является необходимым для экспрессии факторов вирулентности, но остается важным для выполнения ряда функций, способствующих сохранению холерных вибрионов в кишечнике и окружающей среде [2].

Наружные мембраны *V. cholerae* содержат восемь белков, из которых *OmpT* и *OmpU* являются тримерными поринами с разным диаметром пор, контролирующими ток гидрофильных растворов [26]. Их транскрипция регулируется трансмембранным модулятором *ToxR*, стимулирующим экспрес-

сию *OmpU* и подавляющим *OmpT* [20]. Сведения о возможном участии этих пориновых белков в патогенезе холеры весьма противоречивы [23, 24]. Резкое подавление транскрипции мембранного белка *OmpT* по *ToxR*-независимому типу было отмечено в условиях кислотного стресса, хотя экспрессия *OmpU* при этом не менялась, обеспечивая толерантность вибрионов к кислоте [18]. Помимо повышенной осмолярности (0,4 М *NaCl*), положительным регулятором гена *ompT* оказался цАМФ-связывающий белок (*CRP*), активирующий транскрипцию по механизму «образования петли» [16], но подавляющий при этом координированную экспрессию генов *ctx* и *tcpA* [27]. И хотя содержание *OmpU* может достигать 30–60 % от суммарного белка наружных мембран [18], сыворотки волонтеров после экспериментального заражения клетками штаммов *V. cholerae* 395 или E7946 содержали сопоставимые количества антител к *OmpU* и *OmpT* [28]. Это свидетельствует о существовании дополнительных регуляторов экспрессии гена *ompT*, возможно, в виде некодирующих малых РНК (*sРНК*) типа *VrrA*, влияющих через взаимодействие с *mРНК* на пост-трансляционную модуляцию экспрессии генов в зависимости от условий среды окружения (стресс, температура культивирования и др.) [26]. Тем более что имеются данные об усилении выражения генов *ompT* (VC1854), *ompA* (VC2213) и *ompS* (VC1028) у вариантов *V. cholerae*, дефектных по шаперону *hfq*, связывающему *sРНК* и *mРНК* [6, 31]. Возможно, это объясняется присутствием у O1 вибрионов белка, родственного белку *OmpT*, в роли которого может выступать пориновый белок *VC0972* (хитопорин), как это описано в случае с геном *ompU* и его паралога *VCA1008* [21]. Отмечена позитивная регуляция экспрессии *ompT V. cholerae* под влиянием *Fur* и ионов железа в результате прямого связывания *Fur* с промотором гена *ompT* [4].

Белковый состав наружных мембран *V. cholerae* сильно менялся в зависимости от среды выращивания: в полных средах вибрионы экспрессировали исключительно порин *OmpU*, тогда как в минимальных доминировал *OmpT*. Внесение в минимальную среду смеси из аспарагина, аргинина, глутаминовой кислоты и серина способствовало продукции *OmpU* и подавлению *OmpT*, что было обусловлено повышенным уровнем белка *ToxR*. У мутанта по *toxR*-гену изменений в профиле мембранных белков не обнаружено [19].

Согласно данным литературы и нашим данным [3], очищенный с помощью дифференциального центрифугирования и хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52 белок *OmpT* холерного вибриона имеет молекулярную массу около 40 кДа. Он состоит из 344 аминокислотных остатков, несет два сайта гликозилирования (*Asn*₆₂ и *Asn*₆₆) и 23 остатка лизина, не содержит в своем составе цистеина, проявляет всего 13 % идентичности и столько же сходства со структурой омптинов из энтеробактерий (кишечная палочка, салмонелла и чумной микроб).

Он наделен протеолитической активностью, расщепляет протамин, фибрин, желатин, казеин, коллаген и активирует плазминоген человека в плазмин. Не гидролизует плазмин-специфичный пептидный хромогенный субстрат *p*-нитроанилид трипептида For-Ala-Phe-Lys-pNa.HBr (Ренам, Россия). Чувствителен к фенолметилсульфонилфлуориду, но слабо реагирует на присутствие дитиотреитола, ЭДТА, *p*-хлормеркуриобензоата, ингибируется солями Zn^{2+} и Cu^{2+} , ϵ -аминокапроновой кислотой, мочевиной и *SDS*, что сближает его с сериновыми протеазами.

Кластерный анализ поринов с построением дендрограммы *OmpT* белков небольшой выборки бактерий из GenBank позволил разделить их на три группы, одну из которых составили *V. cholerae*, *V. furnissii* и *V. metschnikovii*, другую – омптины энтеробактерий (*Y. pestis*, *E. coli*, *S. enterica*) и *V. parahaemolyticus*, а третью – *V. vulnificus* (мол. масса – 33,9 кДа, совпадение с последовательностью *OmpT V. cholerae* – 23 %, сходство – 14,9 %). Из представителей рода *Vibrio*, только *V. cholerae cholerae*, *V. cholerae eltor* и *V. cholerae O139* реагировали в реакции преципитации в геле с антисывороткой к белку *OmpT* из холерного вибриона. Представители энтеробактерий (возбудители чумы и псевдотуберкулеза, кишечная палочка) и других вибрионов (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*) такой способностью не обладали, что согласуется с данными [17] о высокой специфичности антисывороток к белкам наружных мембран возбудителя холеры. Если принять во внимание еще и отрицательный результат исследования указанных вибрионов в ПЦР с праймерами к гену *ompT* холерного вибриона [18], то гетерогенность представителей рода *Vibrio* относительно белка *OmpT* становится очевидной.

Выполненный сравнительный анализ 212 нуклеотидных последовательностей гена *ompT*, содержащихся в GenBank в составе контигов или полных геномов вибрионов, выделенных в разные годы и разных странах (Индия, Афганистан, Индонезия, Гаити, Бразилия и др.), показал достаточную стабильность его структуры. Изменения в виде 19 единичных нуклеотидных замен (преимущественно А на Г и Т на С) и непродолжительных вставок в один и три нуклеотида удалось зарегистрировать лишь у 31 нуклеотидной последовательности штаммов вибрионов, среди которых оказался и *V. cholerae biovar albensis* (индекс разнообразия составил 0,26). Изменения группировались больше по краям гена.

Функции белка *OmpT* в биологии холерного вибриона остаются до конца непонятными. Выяснено, что его синтез строго регулируется микробом в ответ на различные сигналы: рН и температура – через регулон *ToxR*, источники углеводов – через комплекс *cAMP-CRP* и далее через σ^E -регулон посредством *sРНК VrrA* [26]. Кроме защиты от антимикробных белков и активации плазминогена, обеспечивающих известное преимущество вибрионам в условиях кишечника чувствительного хозяина, увеличение син-

теза *OmpT* в присутствии высоких концентраций *NaCl*, пониженной (28 °C) температуре и в минимальных средах позволяет предположить его вклад в выживаемость *V. cholerae* во внешней среде. В составе мембранных пузырьков *OmpT* может принимать участие в транспорте различных бактериальных факторов (токсины, ферменты, ДНК и др.) в клетки хозяина во время колонизации кишечника [11]. Учитывая известные на сегодня свойства белка *OmpT* наружных мембран холерного вибриона, в том числе результаты сравнительного компьютерного анализа аминокислотной последовательности, его можно отнести к омптинам семейства *Vibrionaceae*, число которых будет увеличиваться по мере изучения представителей других патогенных для человека видов вибрионов рода *Vibrio*.

В заключение хотелось бы отметить, что само по себе широкое распространение омптинов среди бактерий указывает на вероятность того, что они могут оказаться одними из древних систем/средств защиты в мире микробов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазминогена возбудителя чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 93:49–51.
2. Заднова С.П. Функциональная роль *ToxR*-регулируемых белков внешней мембраны *Vibrio cholerae*. *Пробл. особо опасных инф.* 2004; 1(87):9–13.
3. Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В., Ерибемян А.К. Плазминоген-активирующая способность холерного вибриона и участие мембранного белка *OmpT* в этом процессе. *Защита населения и среда обитания*. 2012; 4(229):17–9.
4. Craig S.A., Carpenter C.D., Mey A.R., Wickoff E.E., Payne S.M. Positive regulation of the *Vibrio cholerae* porin *OmpT* by iron and *Fur*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(23):6505–11.
5. Dekker N., Cox R.C., Kramer R.A., Edmond M.R. Substrate specificity of the integral membrane protease *OmpT* determined by spatially addressed peptide libraries. *Biochemistry*. 2001; 40:1694–701.
6. Ding Y., Davis B.M., Waldor M.K. *Hfq* is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates σ^c expression. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(1):345–54.
7. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(28):23971–6.
8. Goguen J.D., Bugge T., Degen J.L. Role of pleiotropic effects of plasminogen deficiency in infection experiment with plasminogen-deficient mice. *Methods*. 2000; 21:179–83.
9. Kienle Z., Emody L., Svanborg C., O'Toole P.W. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138:1679–87.
10. Kramer R.A., Brandenburg K., Vandenputte-Rutten L., Werkhoven M., Gros P., Dekker N., Egmond M.R. Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease *OmpT*. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269:1746–52.
11. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005; 19:2645–55.
12. Kukkonen M., Lahteenmaki K., Suomalainen M., Kalkkinen N., Emody L., Lang H., Korhonen T.K. Protein regions important for plasminogen inactivation and inactivation of α -antiplasmin in the surface protease *Pla* of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2001; 40(5):1097–111.
13. Kukkonen M., Korhonen T.K. The omptin family of enterobacterial surface proteases/ adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294(1):7–14.
14. Kutyrev V., Mehig R.J., Motin V.L., Pokrovskaya M.S., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67(3):1359–67.
15. Lahteenmaki K., Virkola R., Saren A., Emody L., Korhonen T.K. Expression of plasminogen activator *pla* of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* 1998; 66(12):5755–62.
16. Li C.C., Crawford J.A., DiRita V.J., Kaper J.B. Molecular cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a *ToxR*-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2000; 35(1):189–203.
17. Martinez-Govea A., Ambrosio J., Gutierrez-Coogco L., Flisser A. Identification and strain differentiation of *Vibrio cholerae* by using polyclonal antibodies against outer membrane proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8(4):768–71.
18. Merrell D.S., Bailey C., Kaper J.B., Camilli A. The *ToxR*-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires *OmpU*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(9):2746–54.
19. Mey A.R., Craig S.A., Payne S.M. The effects of amino acids supplementation on porin expression and *ToxR* levels in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2012; 80(2):518–28.
20. Miller V., Mekalanos J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 1988; 170(6):2575–83.
21. Osorio C., Martinez-Wilson H., Camilli A. The *ompU* paralog *vca1008* is required for virulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2001; 186(15):5167–71.
22. Potempa J., Pike R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 2009; 1(2):70–87.
23. Provenciano D., Klose K.E. Altered expression of the *ToxR*-regulated porins *OmpU* and *OmpT* diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factors expression and intestinal colonization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(18):10220–4.
24. Provenciano 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.
25. Sodeinde O.A., Subrahmanyam Y.V., Stark K., Quan T., Bao Y., Goguen J.D. A surface protease and the invasive character of plague. *Science*. 1992; 258:1004–7.
26. Song T., Sabharwal D., Wai S.N. *VrrA* mediates *Hfq*-dependent regulation of *OmpT* synthesis in *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* 2010; 400:682–8.
27. Skorupski K., Taylor R.K. Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin-coregulated pilus in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:265–70.
28. Sperandio V., Giron J.A., Silveira W.D., Kaper J.B. The *OmpU* outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1995; 63(11):4433–8.
29. Stumpe S., Schmid R., Stefens D.L., Georgious G., Bakker E.P. Identification of *OmpT* as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(15):4002–6.
30. Vandeputte-Rutten L., Kramer R.A., Kroon J., Dekker N., Egmond M.R., Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease *OmpT* from *E. coli* suggest a novel catalytic site. *EMBO J.* 2001; 20:5033–9.
31. Vogel J., Papenfort K. Small non-coding RNA's and the bacterial outer membrane. *Curr. Opin Microbiol.* 2006; 9(6):605–11.

References

1. Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Bakhteeva I.V., Anissimov A.P. [The presence of the complete lipopolysaccharide core structure is necessary for the activation of *Yersinia pestis* plasminogen]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 93:49–51.
2. Zadnova S.P. [Functional role of *ToxR*-regulated proteins of *Vibrio cholerae* outer membrane]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2004; 1(87):9–13.
3. Shipko E.S., Mishan'kin B.N., Duванова О.В., Романова Л.В., Ерибемян А.К. [*Vibrio cholerae* plasminogen activating capacity and participation of *OmpT* membrane protein in the process]. *Zashchita Naselen. Sreda Obit.* 2012; 4(229):17–9.
4. Craig S.A., Carpenter C.D., Mey A.R., Wickoff E.E., Payne S.M. Positive regulation of the *Vibrio cholerae* porin *OmpT* by iron and *Fur*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(23):6505–11.
5. Dekker N., Cox R.C., Kramer R.A., Edmond M.R. Substrate specificity of the integral membrane protease *OmpT* determined by spatially addressed peptide libraries. *Biochemistry*. 2001; 40:1694–701.
6. Ding Y., Davis B.M., Waldor M.K. *Hfq* is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates σ^c expression. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(1):345–54.
7. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(28):23971–6.
8. Goguen J.D., Bugge T., Degen J.L. Role of pleiotropic effects of plasminogen deficiency in infection experiment with plasminogen-deficient mice. *Methods*. 2000; 21:179–83.
9. Kienle Z., Emody L., Svanborg C., O'Toole P.W. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138:1679–87.
10. Kramer R.A., Brandenburg K., Vandenputte-Rutten L., Werkhoven M., Gros P., Dekker N., Egmond M.R. Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease *OmpT*. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269:1746–52.
11. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005; 19:2645–55.
12. Kukkonen M., Lahteenmaki K., Suomalainen M., Kalkkinen N., Emody L., Lang H., Korhonen T.K. Protein regions important for plasminogen

- gen inactivation and inactivation of α -antiplasmin in the surface protease *Pla* of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2001; 40(5):1097–111.
13. Kukkonen M., Korhonen T.K. The ompin family of enterobacterial surface proteases/ adhesines: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294(1):7–14.
 14. Kuttyrev V., Mehig R.J., Motin V.L., Pokrovskaya M.S., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67(3):1359–67.
 15. Lahteenmaki K., Virkola R., Saren A., Emody L., Korhonen T.K. Expression of plasminogen activator *pla* of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* 1998; 66(12):5755–62.
 16. Li C.C., Crawford J.A., DiRita V.J., Kaper J.B. Molecular cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a *ToxR*-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2000; 35(1):189–203.
 17. Martinez-Govea A., Ambrosio J., Gutierrez-Coogco L., Flisser A. Identification and strain differentiation of *Vibrio cholerae* by using polyclonal antibodies against outer membrane proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8(4):768–71.
 18. Merrell D.S., Bailey C., Kaper J.B., Camilli A. The *ToxR*-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires *OmpU*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(9):2746–54.
 19. Mey A.R., Craig S.A., Payne S.M. The effects of amino acids supplementation on porin expression and *ToxR* levels in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2012; 80(2):518–28.
 20. Miller V., Mekalanos J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 1988; 170(6):2575–83.
 21. Osorio C., Martinez-Wilson H., Camilli A. The *ompU* paralog *vca1008* is required for virulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2001; 186(15):5167–71.
 22. Potempa J., Pike R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 2009; 1(2):70–87.
 23. Provenciano D., Klose K.E. Altered expression of the *ToxR*-regulated porins *OmpU* and *OmpT* diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factors expression and intestinal colonization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(18):10220–4.
 24. Provenciano 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.
 25. Sodeinde O.A., Subrahmanyam Y.V., Stark K., Quan T., Bao Y., Goguen J.D. A surface protease and the invasive character of plague. *Science.* 1992; 258:1004–7.
 26. Song T., Sabharwal D., Wai S.N. *VrrA* mediates *Hfq*-dependent regulation of *OmpT* synthesis in *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* 2010; 400:682–8.
 27. Skorupski K., Taylor R.K. Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin-coregulated pilus in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:265–70.
 28. Sperandio V., Giron J.A., Silveira W.D., Kaper J.B. The *OmpU* outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1995; 63(11):4433–8.
 29. Stumpe S., Schmid R., Stefens D.L., Georgious G., Bakker E.P. Identification of *OmpT* as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(15):4002–6.
 30. Vandeputte-Rutten L., Kramer R.A., Kroon J., Dekker N., Egmond M.R., Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease *OmpT* from *E. coli* suggest a novel catalytic site. *EMBO J.* 2001; 20:5033–9.
 31. Vogel J., Papenfert K. Small non-coding RNA's and the bacterial outer membrane. *Curr. Opin Microbiol.* 2006; 9(6):605–11.

Authors:

Mishan'kin B.N., Duvanova O.V., Romanova L.V., Shipko E.S., Vodopyanov A.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В., Шипко Е.С., Водопьянов А.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 04.04.14.