

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-73-79

УДК 616.932:579.222

О.В. Дуванова, О.А. Подойницына, Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, Е.С. Шипко, В.Д. Кругликов, О.С. Чемисова, А.К. Носков

Алкилсульфатаза холерных вибрионов

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

Цель работы – изучение структуры гена алкилсульфатазы (*asu*) у штаммов *Vibrio cholerae* различных серогрупп, а также сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей алкилсульфатаз с использованием различных методов биоинформационного анализа. **Материалы и методы.** В работе использовали 483 штамма *V. cholerae* серогрупп O1, O139 и nonO1/nonO139. Поиск гена, его копийность и локализацию проводили с помощью программы Blast. Нуклеотидную и соответствующую аминокислотную последовательности гена, а также его структуру изучали с помощью биоинформационного анализа. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina). Ферментативную активность детектировали с использованием среды, подтверждая наличие/отсутствие гена методом ПЦР *in vitro* и *in silico*. **Результаты и обсуждение.** Проведен биоинформационный анализ нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательностей гена *asu* и изучена его структура. В структуре гена выявлено четыре функциональных домена. В бета-лактамазном домене обнаружена консервативная аминокислотная последовательность -НАНАДН- у всех штаммов холерных вибрионов, входящая в Zn^{2+} -связывающий мотив. Установлено, что алкилсульфатаза холерных вибрионов относится к семейству Zn^{2+} -зависимых- β -лактамаз. Blast-анализ выявил сходство нуклеотидных и аминокислотных последовательностей алкилсульфатаз представителей *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 (*ctxAB⁺tcpA⁺*) с представителями родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, что совпало с данными 3D-моделирования структур аминокислотных последовательностей фермента алкилсульфатазы у этих микроорганизмов. Биоинформационный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей алкилсульфатаз у холерных вибрионов выявил их консервативность у токсигенных штаммов и наличие ряда единичных мутаций в гене *asu* у атоксигенных. Наличие или отсутствие гена *asu* установлено методом ПЦР *in vitro* и *in silico* и подтверждено результатами, полученными с помощью программы Blast. Промоделировано, что наличие/отсутствие гена *asu* коррелирует со способностью/неспособностью штаммов O139-серогруппы гидролизовать додецилсульфат натрия (SDS) на среде. Эти данные могут быть использованы в изучении механизмов, лежащих в основе адаптации/персистенции и патогенности холерных вибрионов.

Ключевые слова: холерный вибрион, ген алкилсульфатазы (*asu*), додецилсульфат натрия (SDS).

Корреспондирующий автор: Дуванова Ольга Викторовна, e-mail: olga_duvanova@mail.ru.

Для цитирования: Дуванова О.В., Подойницына О.А., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Шипко Е.С., Кругликов В.Д., Чемисова О.С., Носков А.К. Алкилсульфатаза холерных вибрионов. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 3:73–79. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-73-79
Поступила 06.02.2023. Отправлена на доработку 20.02.2023. Принята к публ. 22.02.2023.

O.V. Duvanova, O.A. Podoinitsyna, R.V. Pisanov, S.O. Vodop'yanov, A.S. Vodop'yanov, E.S. Shipko, V.D. Kruglikov, O.S. Chemisova, A.K. Noskov

Alkyl Sulfatase of Cholera Vibrios

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

Abstract. The aim of the work was to study the structure of the alkyl sulfatase (*asu*) gene in *Vibrio cholerae* strains of various serogroups, as well as to compare nucleotide and amino acid sequences of alkyl sulfatases using various methods of bioinformatic analysis. **Materials and methods.** 483 strains of *V. cholerae* O1, O139 and nonO1/nonO139 serogroups were employed in the work. The search for the gene, its recurrence, and localization was carried out applying the Blast software. The nucleotide and corresponding amino acid sequences of the gene, as well as its structure, were studied using bioinformatic analysis. Sequencing was performed on the MiSeq (Illumina) platform. The enzymatic activity was detected using a medium, confirming the presence/absence of the gene by PCR *in vitro* and *in silico*. **Results and discussion.** Bioinformatic analysis of the nucleotide and corresponding amino acid sequences of the *asu* gene has been carried out and its structure investigated. Four functional domains have been identified. In the beta-lactamase domain, a conservative amino acid sequence -НАНАДН- has been found in all strains of cholera vibrios, which is part of the Zn^{2+} binding motif. It has been established that the alkyl sulfatase of cholera vibrios belongs to the family of Zn^{2+} -dependent β -lactamases. Blast analysis has revealed the similarity of nucleotide and amino acid sequences of alkyl sulfatases in representatives of *V. cholerae* O1 and O139 serogroups (*ctxAB⁺tcpA⁺*) and representatives of the genera *Aeromonas* and *Pseudomonas*, which is in the line with the data of 3D modeling of the amino acid sequence structures of the alkyl sulfatase enzyme in these microorganisms. The bioinformatic analysis of nucleotide and amino acid sequences of alkyl sulfatases in cholera vibrios has showed the conservativeness of these sequences in toxigenic strains and the presence of a number of single mutations in the *asu* gene in atoxigenic ones. The presence or absence of the *asu* gene has been established by PCR *in vitro* and *in silico* and confirmed by the results obtained using the Blast program. It is demonstrated that the presence/absence of the *asu* gene correlates with the ability/inability of O139 strains to hydrolyze SDS on the medium. These results can be used in studying mechanisms of cholera vibrios adaptation, persistence and pathogenicity.

Key words: cholera vibrio, alkyl sulfatase (*asu*) gene, sodium dodecylsulfate (SDS).

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Olga V. Duvanova, e-mail: olga_duvanova@mail.ru.

Citation: Duvanova O.V., Podoinitsyna O.A., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., Shipko E.S., Kruglikov V.D., Chemisova O.S., Noskov A.K. Alkyl Sulfatase of Cholera Vibrios. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 3:73–79. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-73-79

Received 06.02.2023. Revised 20.02.2023. Accepted 22.02.2023.

Duvanova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>
Podoinitsyna O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9996-4189>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>
Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Shipko E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>
Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>
Chemisova O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Развитие цивилизации сопровождается неизбежным загрязнением окружающей среды. Целевое назначение поверхностно-активных веществ (ПАВ) обуславливает попадание значительного их объема в сточные, грунтовые воды, поверхностные водоемы, а также почву, где они могут аккумулироваться в пищевых цепях, оказывая неблагоприятное воздействие на живые организмы. В окружающей среде ксенобиотики могут воздействовать на генетический аппарат организмов, вызывать их гибель, нарушать равновесие природных процессов в биосфере. Изучение путей их деструкции с помощью микроорганизмов чрезвычайно важно для организации санитарно-гигиенических мероприятий и мер по охране природы, что на сегодняшний день является приоритетным направлением политики, проводимой в Российской Федерации. Биологическая деструкция ПАВ, включая лаурилсульфат (додецилсульфат) натрия (SDS), микроорганизмами является объектом пристального внимания российских и зарубежных исследователей [1–3].

Для холерных вибрионов характерна высокая адаптационная пластичность, которая связана с их жизненным циклом (lifestyle) и функционированием ферментативного комплекса, участвующего в деструкции ПАВ, в состав которого входит фермент – алкилсульфатаза (алкилсульфогидролаза), относящийся к классу гидролаз и действующий на сульфозфирные связи алкилсульфатов. В результате гидролиза сульфозфирной связи образуется неорганический сульфат и высший (первичный) спирт додеканол-1. Алкилсульфатаза обнаружена у эукариотических, прокариотических организмов, грибов. Известно, что этот фермент выполняет важную роль в метаболизме клеток и патогенезе [4]. Отмечена его значительная роль в превращениях соединений, содержащих серу, а следовательно, в круговороте этого жизненно важного элемента в природе. SDS, используемый в качестве субстрата алкилсульфатаз, может использоваться в качестве единственного источника углерода, наделяя микроорганизмы дополнительными преимуществами в выживании в различных экосистемах [5, 6].

Принимая во внимание существование у холерного вибриона группы ферментов, участвующих в утилизации ПАВ, постоянно присутствующих в объектах окружающей среды, и в связи с возрастающим антропогенным воздействием перспективными

являются исследования ферментов-деструкторов, включая алкилсульфатазу холерных вибрионов, сведения о которой в настоящее время фрагментарны. Ранее установлено, что холерные вибрионы способны гидролизовать SDS. Исключение составляют полностью лишенные этой способности атоксигенные водные штаммы O139-серогруппы. Однако до настоящего времени исследования алкилсульфатазной активности *Vibrio cholerae* проводились лишь по фенотипу с детекцией гена, ответственного за ее проявление [7], вне связи с изучением его структуры. **Целью** исследования явилось изучение структуры гена алкилсульфатазы (*asu*) у штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, а также сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей алкилсульфатаз с использованием различных методов биоинформационного анализа.

Материалы и методы

В работе использовали 483 штамма *V. cholerae* различных серогрупп и разной токсигенности.

Способность вибрионов гидролизовать SDS изучали на ранее сконструированной среде [8]. Использовали 43 штамма *V. cholerae cholerae* O1 и El Tor биоваров (*ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁺tcpA⁺*), выделенных из различных источников; 42 штамма *V. cholerae* O139-серогруппы, выделенных из клинического материала (17 *ctxAB⁺tcpA⁺*), и 25 (*ctxAB⁺tcpA⁺*) – из воды поверхностных водоемов (рек: Дон, Темерник, Москва, Ока, Обь, Иня); 24 штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139-серогрупп, выделенных из клинического материала (*ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁺tcpA⁺*), и 6 штаммов *ctxAB⁺tcpA⁺*, выделенных из рыб Азовского моря в 2011 г. Наличие/отсутствие гена алкилсульфатазы (*asu*) выявляли методом ПЦР *in vitro* [7] и *in silico*, используя программу Virtual PCR [9].

Полногеномное секвенирование 463 штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 (*ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁺tcpA⁺*), выделенных из различных источников в период с 1974 по 2022 г. и полученных из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» Ростовского-на-Дону противочумного института, проведено в 2019–2022 гг. на платформе MiSeq (Illumina) с использованием набора Nextera DNA Flex, картридж на 500 циклов. Проверка качества ридов проводилась с помощью программы FastQC [10]. Для очистки ридов использовали программу для

филтрации данных Trimmomatic [11], сборка осуществлялась *de novo* программой-сборщиком SPAdes (v.3.11.1) [12]. Поиск гена алкилсульфатазы, определение его копийности и локализации у исследуемых штаммов проводили с помощью программы blastn 2.5.0 (нуклеотидный BLAST – Basic local alignment search tool) [13]. В ходе анализа была создана база данных, содержащая все исследуемые штаммы, а в качестве запроса задана нуклеотидная последовательность алкилсульфатазы *V. cholerae* N16961. Множественное выравнивание для гена алкилсульфатазы реализовано с использованием программы mafft [14]. Построение филогенетических деревьев осуществляли с помощью FastTree [15].

3D-моделирование структуры фермента алкилсульфатазы штаммов *V. cholerae* El Tor 16961, *Pseudomonas aeruginosa* 2019CK-00034, *Aeromonas jandaei* Aer_On5M осуществляли с использованием веб-ресурса SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>).

Анализ филогенетического распределения аминокислотной последовательности алкилсульфатазы у 463 секвенированных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 осуществляли с помощью программы Cytoscape [16].

Сравнение нуклеотидной и аминокислотной последовательностей проводили среди 11 штаммов *V. cholerae* O1, 9 штаммов *V. cholerae* O139, 1 штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139-серогрупп (*ctxAB⁺tcpA⁺*/*ctxAB⁻tcpA⁻*). Также в исследование были взяты нуклеотидные последовательности штаммов *V. cholerae* O139 из базы данных NCBI: FC1817, FC2271, FC2273, FC1877 (*ctxAB⁺tcpA⁺*). Номер проекта PRJNA385889 и нуклеотидные последовательности штаммов *V. cholerae* O139: 4295STDY6534200 (*ctxAB⁻tcpA⁻*), RIMD 2214315 (*ctxAB⁻tcpA⁻*).

Для сравнения аминокислотной последовательности алкилсульфатазы *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 (*ctxAB⁺tcpA⁺*) с таковой у других видов бактерий из базы данных NCBI взяты: *Caulobacter crescentus* CB15, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551, *M. tuberculosis* H37Rv, *Escherichia coli* K12 (NP_313093.2), *E. coli* EDL933, *E. coli* (NP_418507.1), *Saccharomyces cerevisiae* S288C (NP_014478.1), MBL fold metallo-hydrolase *Aeromonas jandaei* FDAARGOS 986. В качестве референса рассматривалась последовательность гена алкилсульфатазы штамма *V. cholerae* N16961.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что в базе данных NCBI указаны штаммы холерных вибрионов, у которых нуклеотидная последовательность гена алкилсульфатазы располагалась на второй хромосоме, однако нами определено, что хромосома, обозначенная в таких случаях как вторая, на самом деле таковой не являлась. Рассмотрены три атоксигенных штамма: *V. cholerae* strain Env-390 chromosome 2 (номер в

базе данных NCBI CP013014.1), *V. cholerae* strain 2012Env-9 chromosome 2 (NCBI CP012998.1), *V. cholerae* strain GXFL1-4 chromosome 2 (NCBI CP090387.1), для которых ген алкилсульфатазы обнаружен на второй хромосоме. Также изучены два токсигенных штамма – *V. cholerae* O395 (номер в базе данных NCBI CP045719.1) и *V. cholerae* strain ICDC-VC661 (NCBI CP012667.1) – с такой же особенностью. Несмотря на то, что хромосома, несущая последовательность гена алкилсульфатазы, у пяти рассматриваемых штаммов была обозначена в базе данных как вторая, но соответствовала размеру около 3 Mb, содержала ген коллагеназы (*VC1650*), располагающийся на первой хромосоме, а также остров патогенности VPI-I и профаг ϕ CTX (только для токсигенных штаммов). Указанные гены всегда располагаются на большей хромосоме холерных вибрионов. Таким образом, установлено, что ген, отвечающий за продукцию алкилсульфатазы, расположен на первой хромосоме.

Информация о алкилсульфатазе *V. cholerae* O1 El Tor N16961 содержится в GenBank под номером AWA79104.1. Кодированный ее ген *VC0783* находится на первой (большей) хромосоме, обеспечивая образование продукта в 660 аминокислотных остатков.

Проведенное сравнение нуклеотидных последовательностей, кодирующих алкилсульфатазу, среди представителей токсигенных и нетоксигенных секвенированных штаммов *V. cholerae*, относящихся к серогруппам O1, O139 и nonO1/nonO139, выявило, что гену алкилсульфатазы токсигенных штаммов как O1, так и O139-серогруппы свойственна высокая степень консервативности.

В сравниваемой группе, состоящей из двадцати штаммов, одиннадцать относились к токсигенным и являлись представителями как O1, так и O139-серогруппы. У всех одиннадцати нуклеотидная последовательность алкилсульфатазы была на 100 % идентичной. На рис. 1 эта группа штаммов образовала кластер, выделенный желтым цветом. У атоксигенных штаммов O1-серогруппы, а также у nonO1/nonO139 и R-вариантов в гене алкилсульфатазы присутствовали единичные нуклеотидные замены, от 13 до 22 нуклеотидов у разных штаммов. Часть замен были синонимичны и не вносили изменений в аминокислотную последовательность. Вместе с тем обнаружены два единичных нуклеотидных полиморфизма, находящихся в позиции 77 и 275 и ведущих к изменению двух аминокислот (26-й и 92-й), при этом у алкилсульфатазы всех токсигенных штаммов в данных участках расположены изолейцин и лейцин соответственно, а у всех нетоксигенных штаммов вследствие замен T77C и T275G образуются треонин и аргинин. Помимо этих двух отличий между алкилсульфатазами токсигенных и атоксигенных вибрионов, в группе атоксигенных штаммов встречались и другие аминокислотные замены, количество которых отличалось от штамма к штамму и составляло один, три, либо четыре SNP.

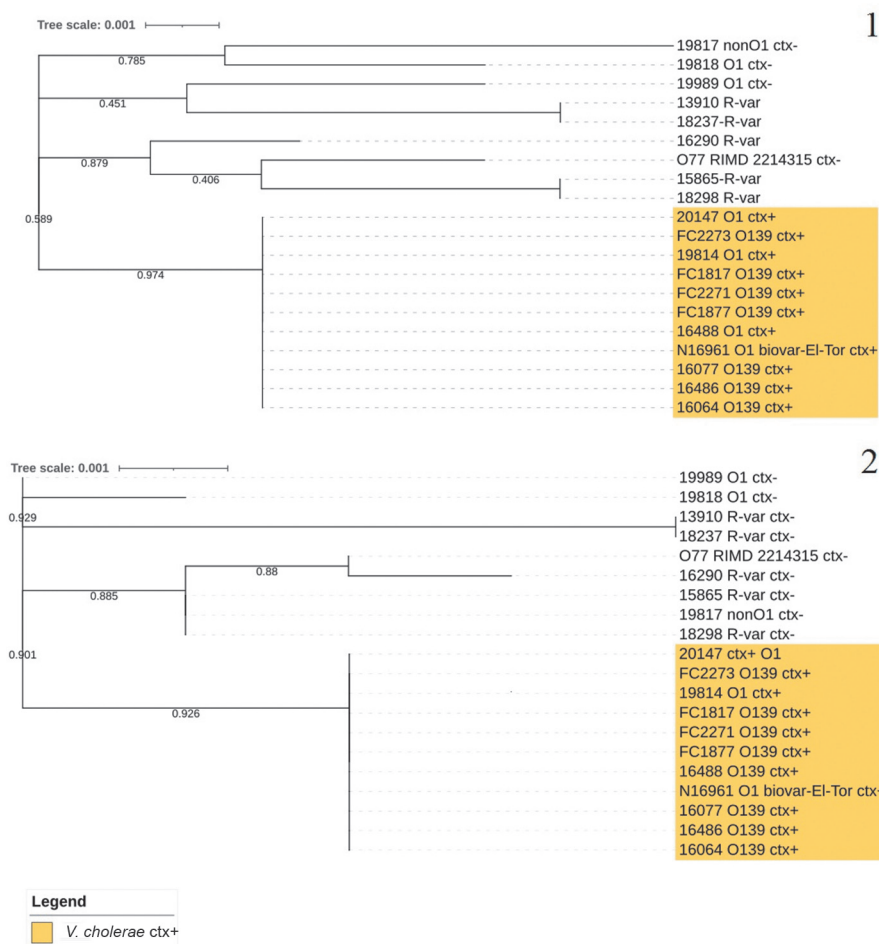


Рис. 1. Дендрограмма с представленными нуклеотидными (1) и аминокислотными (2) последовательностями штаммов:

V. cholerae серогрупп O1, O139 и nonO1/nonO139 (*ctxAB*⁺*tcpA*⁺/*ctxAB**tcpA*⁻)

Fig. 1. Dendrogram presenting nucleotide (1) and amino acid (2) sequences of the strains:

V. cholerae O1, O139 and nonO1/nonO139 (*ctxAB*⁺*tcpA*⁺/*ctxAB**tcpA*⁻) serogroups

Проведенный биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей алкилсульфатаз у холерных вибрионов различных серогрупп выявил разделение исследованных токсигенных и атоксигенных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1, O139 и nonO1/nonO139 (рис. 1). Установлено, что аминокислотная последовательность алкилсульфатазы штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 (*ctxAB*⁺*tcpA*⁺) отличалась от аминокислотной последовательности атоксигенных (*ctxAB**tcpA*⁻) штаммов серогрупп O1, nonO1/nonO139 и R-вариантов, образуя отдельный кластер, что полностью совпадает с результатами анализа их нуклеотидных последовательностей.

Согласно данным Blast-анализа, наибольшее сходство аминокислотной последовательности ал-

килсульфатазы штаммов холерных вибрионов выявлено с представителями рода *Aeromonas* (63,51 %) и *Pseudomonas* (56,83 %). При сравнении аминокислотной последовательности алкилсульфатаз у микроорганизмов, относящихся к разным таксономическим группам (*V. cholerae* серогрупп O1 и O139, *Aeromonas jandaei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus*), удалось обнаружить наибольшее сходство между алкилсульфатазами представителей *V. cholerae* серогрупп O1, O139 с генотипом *ctxAB*⁺*tcpA*⁺, выделенных из клинического материала, и *Aeromonas jandaei* FDAARGOS 986, а также *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (рис. 2).

Для анализа аминокислотной последовательности алкилсульфатазы штаммов *V. cholerae* серогрупп

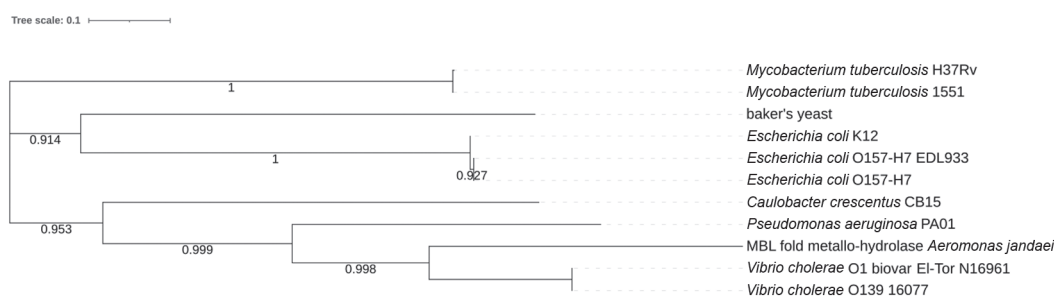


Рис. 2. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей штаммов *V. cholerae* серогрупп O1, O139, *Aeromonas jandaei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus*

Fig. 2. Phylogenetic analysis of amino acid sequences in *V. cholerae* O1, O139 strains, *Aeromonas jandaei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus*

O1 и O139, выделенных из различных источников в период с 1974 по 2022 г. и полученных из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов», взяты 463 геномные последовательности штаммов, секвенированных нами в 2019–2022 гг. В результате проведенного анализа с помощью программы Cytoscape выявлено, что штаммы распределились на 4 группы: 1-я группа – 315 штаммов с генотипами *ctxAB⁺tcpA⁺/ctxAB⁻tcpA⁺*, pI 5,85 (изоэлектрическая точка), заряд молекулы -11,52, совпадающие с данными, характерными для штамма *V. cholerae* El Tor 16961; 2-я группа – 56 штаммов с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁻*, pI 5,92, заряд молекулы -10,52; 3-я группа – 28 штаммов с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁻*, pI 5,79, заряд молекулы -12,51; 4-я группа – 64 штамма представлены генотипом *ctxAB⁻tcpA⁻*, pI 5,92, заряд молекулы -10,79. Учитывая полученные данные, можно предположить, что 1-я группа (по аминокислотной последовательности алкилсульфатазы) холерных вибрионов O1 и O139, в которую вошло 315 штаммов с генотипом *ctxAB⁺tcpA⁺/ctxAB⁻tcpA⁺*, pI 5,85 и зарядом молекулы -11,52, по некоторым свойствам будет отличаться от алкилсульфатаз 2–4-й групп с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁻*, проявляя при этом сходство с аминокислотной последовательностью алкилсульфатазы из штамма *V. cholerae* El Tor 16961 (рис. 3).

Анализ филогенетического распределения 463 секвенированных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 по структуре аминокислотной последовательности не исключает наличие у холерных вибрионов нескольких алкилсульфатаз с разными свойствами, что требует проведения дальнейших исследований.

Выполненный компьютерный анализ нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательностей гена алкилсульфатазы показал, что молекулярный вес белка алкилсульфатазы штамма *V. cholerae* O1 El Tor N16961 составляет 73 kDa, pI 5,85, заряд молекулы -11,52. Следует отметить, что 3D-структура аминокислотной последовательности алкилсульфатазы штамма *V. cholerae* O1 El Tor N16961, предсказанная с помощью 3D-моделирования представляет собой димер, подобно алкилсульфатазе из штамма *Pseudomonas aeruginosa* 2019CK-00034, проявляя при этом идентичность и с 3D-структурой штамма *Aeromonas jandaei* Aer_On5M (рис. 4).

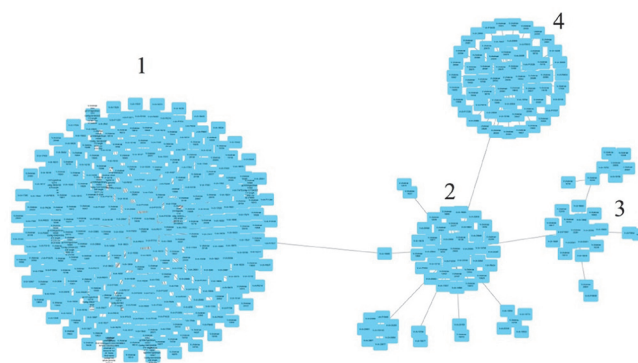


Рис. 3. Результат филогенетического распределения 463 штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 по структуре аминокислотной последовательности алкилсульфатазы.

1 – 1-я группа штаммов с генотипами *ctxAB⁺tcpA⁺/ctxAB⁻tcpA⁺*; 2 – 2-я группа штаммов с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁻*; 3 – 3-я группа штаммов с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁻*; 4 – 4-я группа штаммов с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁻*

Fig. 3. The result of phylogenetic distribution of 463 *V. cholerae* O1 and O139 strains according to the structure of the amino acid sequence of alkyl sulfatase:

1 – group I of the strains with genotypes (*ctxAB⁺tcpA⁺/ctxAB⁻tcpA⁺*); 2 – group II of strains with genotype (*ctxAB⁻tcpA⁻*); 3 – group III of the strains with genotype (*ctxAB⁻tcpA⁻*); 4 – group IV of the strains with genotype (*ctxAB⁻tcpA⁻*)

В настоящее время идентифицированы различные семейства сульфатаз: α -формилглицин-зависимые сульфатазы; сульфатазы, принадлежащие к Fe(II) α -кетоглутарат-зависимому дезоксигеназному семейству; и сульфатазы семейства металло- β -лактамаз [2]. С помощью биоинформационного анализа обнаружено, что структура гена алкилсульфатазы холерного вибриона состоит из четырех функциональных доменов: домен семейства бета-лактамаз – lactamase_B (1/1); домен PTS_EIIB фосфотрансферазной системы – phosphotransferase system, EIIB; домен SCP2 семейства стерол-трансферазы – SCP-2 sterol transfer family и домен UL42-DNA полимеразы процессирующего фактора – DNA polymerase processivity factor (UL42).

В бета-лактамазном домене как у штамма *V. cholerae* El Tor 16961, так и у 19 исследованных штаммов холерных вибрионов серогрупп O1 (*ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁻tcpA⁻*), O139 (*ctxAB⁺tcpA⁺*) и nonO1/nonO139 (*ctxAB⁻tcpA⁻*) обнаружена консервативная аминокислотная последовательность -НАНАДН- (рис. 5), входящая в Zn^{2+} -связывающий мотив, характерный для бактериальных алкилсульфатаз, относящихся к семейству Zn^{2+} -зависимых- β -лактамаз.

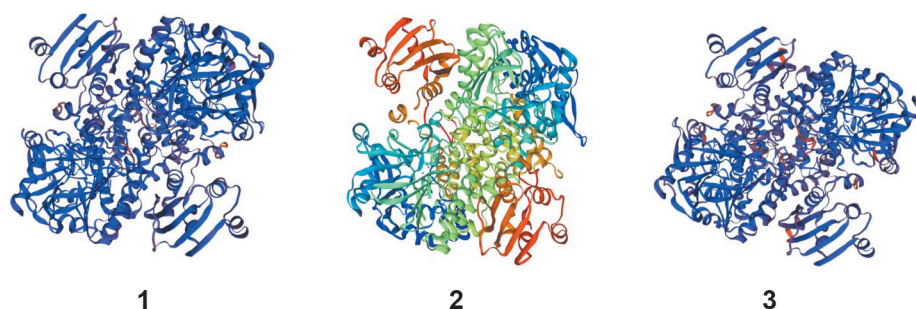


Рис. 4. 3D-структура алкилсульфатазы штаммов:

1 – *V. cholerae* El Tor 16961; 2 – *Pseudomonas aeruginosa* 2019CK-00034; 3 – *Aeromonas jandaei* Aer_On5M

Fig. 4. 3D structure of alkyl sulfatase in the strain of:

1 – *V. cholerae* El Tor 16961; 2 – *Pseudomonas aeruginosa* 2019CK-00034; 3 – *Aeromonas jandaei* Aer_On5M

1. V-ch 16064 O139 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
2. V-ch 16486 O139 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
3. V-ch 16077 O139 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
4. V-ch N16961 O1 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
5. V-ch 18237-R-var ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
6. V-ch 16488 O1 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
7. V-ch 20147 O1 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
8. V-ch 18298 R-var ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
9. V-ch R-var 13910 ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
10. V-ch 19818 O1 ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
11. V-ch strain FC1877 O139 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
12. V-ch strain FC2271 O139 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
13. V-ch 16290 R-var ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
14. V-ch strain FC1817 O139 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
15. V-ch 19814 O1 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
16. V-ch 19989 O1 ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
17. V-ch O77 RIMD 2214315 ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
18. V-ch 19817 nonO1 ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
19. V-ch 15865 R-var ctx-	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D
20. V-ch strain FC2273 O139 ctx+	L	G	E	R	P	V	K	A	V	V	S	H	A	H	A	D	H	F	G	G	V	K	G	I	V	S	Q	E	Q	V	D

Рис. 5. Выявление консервативной последовательности в составе Zn^{2+} -связывающего мотива бета-лактамазного домена у штаммов *V. cholerae* серогрупп O1, O139, nonO1/nonO139

Fig. 5. Identification of a conservative sequence in the Zn^{2+} -binding motif of the betalactamase domain in *V. cholerae* strains O1, O139, nonO1/nonO139 serogroups

В структуре бета-лактамазного домена у штамма *Pseudomonas aeruginosa* [17] был обнаружен Zn^{2+} -связывающий мотив – (THxHxDHxGG-102-E-18-AE-44-H). По данным компьютерного анализа нами выявлен сходный Zn^{2+} -связывающий мотив – (SHxHxDHxGG-102-E-17-AE-44-H) у штамма *V. cholerae* El Tor 16961. У штаммов, взятых из базы NCBI: *Pseudomonas mendocina* S5.2, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, *P. alcaligenes* strain NEB 585, – данный мотив был также практически идентичен – (THxHxDHxNG-100-E-17-AE-42-H), а у *Aeromonas schubertii* ATCC 43700 он был полностью идентичен мотиву из штамма *V. cholerae* El Tor 16961 – (SHxHxDHxGG-102-E-17-AE-44-H). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что алкилсульфатаза холерных вибрионов относится к семейству Zn^{2+} -зависимых- β -лактамаз.

Ген алкилсульфатазы впервые идентифицирован в 2009 г. в составе полного генома *V. cholerae* MJ-1236, размер нуклеотидной последовательности гена составил 1983 п.н. Для данного участка нами ранее были сконструированы праймеры, специфичность и универсальность которых была подтверждена *in silico* на штаммах *V. cholerae* M66-2, O395, *V. cholerae* O1 biovar El Tor N16961.

Сконструированные праймеры позволили выявить ген алкилсульфатазы у штаммов O1 *V. cholerae cholerae* и El Tor, nonO1/nonO139 (*ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁻tcpA⁺*; *ctxAB⁻tcpAB⁻*), *V. cholerae* O139-серогруппы (*ctxAB⁺tcpA⁺*) и подтвердить методами ПЦР *in vitro* и *in silico* результаты, полученные с использованием созданной нами ранее среды, с помощью которой не только удалось обнаружить алкилсульфатазу у штаммов холерных вибрионов с разными генотипами и выделенными из различных источников (клинический материал, вода поверхностных водоемов, органы рыб), но и предложить способ дифференциации токсигенных холерных вибрионов O139-серогруппы от атоксигенных [8]. Наличие/отсутствие гена алкилсульфатазы коррелировало со способностью/неспособностью штаммов O139-серогруппы гидролизовать SDS на среде. Присутствие гена *asu* подтверждено методами ПЦР *in vitro* и *in silico*, а также с помощью программы Blast.

Роль алкилсульфатазы у штаммов холерных вибрионов, выделенных из клинического материала, предстоит выяснить в дальнейшем, учитывая, что бактериальные алкилсульфатазы, осуществляя десульфатацию муцина, могут принимать участие в ремоделировании гликанов, влияя при этом на взаимодействие микро- и макроорганизмов [18].

Выявленная у холерных вибрионов разных серогрупп и генотипов способность гидролизовать SDS благодаря наличию фермента алкилсульфатазы обеспечивает штаммы источником углерода и серы, способствуя повышению их персистентного потенциала в различных экологических нишах. Некоторые холерные вибрионы с генотипом *ctxAB⁺tcpA⁺*, способные к продукции алкилсульфатазы как фермента-деструктора, возможно, могут принимать участие в биоремедиации ПАВ, присутствующих в объектах окружающей среды, обеспечивая им большую конкурентоспособность и возможность адаптации к различным условиям в связи с возрастающим антропогенным воздействием. Результаты представленных исследований структуры гена алкилсульфатазы у штаммов *Vibrio cholerae* серогрупп O1, O139 и nonO1/nonO139, а также сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей алкилсульфатаз с использованием различных методов биоинформационного анализа позволили не только получить новые данные, но и обозначить перспективы дальнейшего изучения фермента у штаммов *V. cholerae*, что будет способствовать расшифровке механизмов, лежащих в основе их адаптации/персистенции и патогенности.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Вальшев А.В., Вальшева Н.А. Разрушение анионного поверхностно-активного вещества (додецилсульфата натрия) микроорганизмами окружающей среды. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2018; 4. 4 с. [Электронный ресурс]. URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-4/>

Articles/VAV-2018-4.pdf (дата обращения 21.12.2022). DOI: 10.24411/2304-9081-2019-14023.

2. Sun L., Chen P., Su Y., Cai Z., Ruan L., Xu X., Wu Y. Crystal structure of thermostable alkylsulfatase SdsAP from *Pseudomonas* sp. *S9. Biosci. Rep.* 2017; 37(3):BSR20170001. DOI: 10.1042/BSR20170001.

3. Toesch M., Schober M., Faber K. Microbial alkyl- and aryl-sulfatases: mechanism, occurrence, screening and stereoselectivities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 98(4):1485–96. DOI: 10.1007/s00253-013-5438-0.

4. Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2004; 43(43):5736–63. DOI: 10.1002/anie.200300632.

5. Shahbazi R., Kasra-Kermanshahi R., Gharavi S., Moosavi-Nejad Z., Borzooee F. Screening of SDS-degrading bacteria from car wash wastewater and study of the alkylsulfatase enzyme activity. *Iran. J. Microbiol.* 2013; 5(2):153–8.

6. Furmanczyk E.M., Lipinski L., Dziembowski A., Sobczak A. Genomic and functional characterization of environmental strains of SDS-degrading *Pseudomonas* spp., providing a source of new sulfatases. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1795. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01795.

7. Дуванова О.В., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Писанов Р.В. Алкилсульфатаза холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник статей Проблемной комиссии. Вып. 24. Ростов н/Д; 2011. С. 84–6.

8. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. Способ дифференциации штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы по алкилсульфатазной активности. Патент РФ № 2473697, опублик. 27.01.2013. Бюл. № 3.

9. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. Алгоритм компьютерного VNTR-типирования на основе неполных сиквенсов ДНК-штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на Гаити в 2010 г. *Здоровье населения и среда обитания.* 2013; 3:28–30.

10. Yang X., Liu D., Liu F., Wu J., Zou J., Xiao X., Zhao F., Zhu B. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14:33. DOI: 10.1186/1471-2105-14-33.

11. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

12. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.

13. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3):403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

14. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(14):3059–66. DOI: 10.1093/nar/gkf436.

15. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010; 5(3):e9490. DOI: 10.1371/journal.pone.0009490.

16. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003; 13(11):2498–504. DOI: 10.1101/gr.1239303.

17. Hagelueken G., Adams T.M., Wiehlmann L., Widow U., Kolmar H., Tümmeler B., Heinz D.W., Schubert W.-D. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103(20):7631–6. DOI: 10.1073/pnas.0510501103.

18. Luis A.S., Jin C., Pereira G.V., Glowacki R.W.P., Gugel S.R., Singh S., Byrne D.P., Pudlo N.A., London J.A., Baslé A., Reihill M., Oscarson S., Eysers P.A., Czjzek M., Michel G., Barbeyron T., Yates E.A., Hansson G.C., Karlsson N.G., Cartmell A., Martens E.C. A single sulfatase is required to access colonic mucin by a gut bacterium. *Nature.* 2021; 598(7880):332–7. DOI: 10.1038/s41586-021-03967-5.

References

1. Valyshev A.V., Valysheva N.A. [Destruction of anionic surfactant (sodium dodecyl sulfate) by environmental microorganisms]. *Byulleten' Orenburgskogo Nauchnogo Tsentra Ural'skogo Otdeleniya Rossiiskoi Akademii Nauk [Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences]*. 2018; (4). 4 p. (Cited 21 Dec 2022). [Internet]. Available from: <http://elmag.uran.ru:9673/journal/Issues/2018-4/Articles/VAV-2018-4.pdf>. DOI: 10.24411/2304-9081-2019-14023.

2. Sun L., Chen P., Su Y., Cai Z., Ruan L., Xu X., Wu Y. Crystal structure of thermostable alkylsulfatase SdsAP from *Pseudomonas* sp. *S9. Biosci. Rep.* 2017; 37(3):BSR20170001. DOI: 10.1042/BSR20170001.

3. Toesch M., Schober M., Faber K. Microbial alkyl- and aryl-sulfatases: mechanism, occurrence, screening and stereoselectivities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 98(4):1485–96. DOI: 10.1007/s00253-013-5438-0.

4. Hanson S.R., Best M.D., Wong C.-H. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2004; 43(43):5736–63. DOI: 10.1002/anie.200300632.

5. Shahbazi R., Kasra-Kermanshahi R., Gharavi S., Moosavi-Nejad Z., Borzooee F. Screening of SDS-degrading bacteria from car wash wastewater and study of the alkylsulfatase enzyme activity. *Iran. J. Microbiol.* 2013; 5(2):153–8.

6. Furmanczyk E.M., Lipinski L., Dziembowski A., Sobczak A. Genomic and functional characterization of environmental strains of SDS-degrading *Pseudomonas* spp., providing a source of new sulfatases. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1795. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01795.

7. Duванова О.В., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Писанов Р.В. [Alkylsulfatase of cholera vibrios O1 and O139 serogroups]. In: [Cholera and Pathogenic for Humans Vibrios. Collection of works of the Problem Commission]. Issue 24. Rostov-on-Don; 2011. P. 84–6.

8. Duванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. [Method for differentiation between *Vibrio cholerae* O139 strains by alkyl sulfatase activity]. Patent of the Russian Federation No. 2473697, publ. 01/27/2013. Byul. No. 3.

9. Vодопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. [Algorithm of VNTR-typing based on incomplete sequences of *Vibrio cholerae* DNA strains isolated in Haiti in 2010]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2013; (3):28–30.

10. Yang X., Liu D., Liu F., Wu J., Zou J., Xiao X., Zhao F., Zhu B. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14:33. DOI: 10.1186/1471-2105-14-33.

11. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

12. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.

13. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3):403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

14. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(14):3059–66. DOI: 10.1093/nar/gkf436.

15. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010; 5(3):e9490. DOI: 10.1371/journal.pone.0009490.

16. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003; 13(11):2498–504. DOI: 10.1101/gr.1239303.

17. Hagelueken G., Adams T.M., Wiehlmann L., Widow U., Kolmar H., Tümmeler B., Heinz D.W., Schubert W.-D. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103(20):7631–6. DOI: 10.1073/pnas.0510501103.

18. Luis A.S., Jin C., Pereira G.V., Glowacki R.W.P., Gugel S.R., Singh S., Byrne D.P., Pudlo N.A., London J.A., Baslé A., Reihill M., Oscarson S., Eysers P.A., Czjzek M., Michel G., Barbeyron T., Yates E.A., Hansson G.C., Karlsson N.G., Cartmell A., Martens E.C. A single sulfatase is required to access colonic mucin by a gut bacterium. *Nature.* 2021; 598(7880):332–7. DOI: 10.1038/s41586-021-03967-5.

Authors:

Dуванова О.В., Подойницына О.А., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Шипко Е.С., Кругликов В.Д., Чемисова О.С., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького Ст., 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Дуванова О.В., Подойницына О.А., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Шипко Е.С., Кругликов В.Д., Чемисова О.С., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.