

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-20-26

УДК 616.932:579

А.Ю. Кураташвили¹, Н.А. Плеханов¹, Л.В. Карпунина², С.П. Заднова¹**Системы устойчивости к фагам в штаммах *Vibrio cholerae***¹ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;²ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова», Саратов, Российская Федерация

Цель обзора – анализ литературных данных о системах устойчивости штаммов *Vibrio cholerae* к литическим холерным фагам. Холерные фаги присутствуют как в воде открытых водоемов, так и выделяются совместно с возбудителем из организма больных холерой. Механизмы молекулярной защиты *V. cholerae* от фагов подобны данным системам других бактерий, действуют на всех этапах фаговой инфекции и включают следующие стадии: предотвращение адсорбции фага, деградация фаговых нуклеиновых кислот и ингибирование процесса формирования частиц фага. Блокирование взаимодействия фага с бактериальной клеткой происходит в результате модификации рецепторов, продукции внеклеточных полисахаридов, создающих физический барьер между фагами и поверхностью клетки. Если ДНК фага все же проникла в клетки, то она уничтожается посредством ферментов рестрикции-модификации, а также с помощью адаптивной иммунной системы CRISPR-Cas. Наиболее многочисленными являются механизмы блокирования формирования фаговых частиц в клетках. Данный процесс происходит при участии фагоиндуцируемых PLE-островов, системы исключения бактериофагов BREX и abortивной Abi-инфекции, включающей антифаговую сигнальную систему на основе циклических олигонуклеотидов (CBASS) и систему токсин-антитоксин. При Abi-инфекции зараженные фагом клетки самоуничтожаются и погибают раньше, чем формируются зрелые частицы фага, что способствует сохранению популяции *V. cholerae*. Молекулярные механизмы ряда антифаговых систем еще до конца не выяснены, что указывает на необходимость дальнейшего изучения взаимоотношений фаг – хозяин.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, антифаговые системы, система CRISPR-Cas, PLE-острова, BREX-система, Abi-инфекция.

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

Для цитирования: Кураташвили А.Ю., Плеханов Н.А., Карпунина Л.В., Заднова С.П. Системы устойчивости к фагам в штаммах *Vibrio cholerae*. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 2:20–26. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-20-26

Поступила 06.02.2024. Отправлена на доработку 20.02.2024. Принята к публ. 15.04.2024.

A.Yu. Kuratashvili¹, N.A. Plekhanov¹, L.V. Karpunina², S.P. Zadnova¹**Systems of Phage Resistance in *Vibrio cholerae* Strains**¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;²Saratov State University of Genetics, Biotechnology, and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the review is to analyze the literature data on systems of resistance to lytic cholera phages in *Vibrio cholerae* strains. Cholera phages are both present in the water of open reservoirs and isolated together with the pathogen from cholera patients. The mechanisms of molecular protection of *V. cholerae* from phages are similar to these systems of other bacteria, act at all stages of phage infection and include the following stages: prevention of phage adsorption, degradation of phage nucleic acids and inhibition of the formation of phage particles. Blocking the interaction of a phage with a bacterial cell occurs as a result of modification of receptors and the production of extracellular polysaccharides that create a physical barrier between the phages and the cell surface. If the phage DNA does enter the cells, it is destroyed by restriction-modification enzymes, as well as by the adaptive immune system CRISPR-Cas. The most numerous are the mechanisms for blocking the formation of phage particles in cells. This process occurs with the participation of phage-inducible PLE islands, the BREX bacteriophage exclusion system and abortive Abi infection, including the cyclic oligonucleotide-based anti-phage signaling system (CBASS) and the toxin-antitoxin system. During Abi infection, cells infected with the phage self-destruct and die before mature phage particles are formed, which contributes to the preservation of the *V. cholerae* population. The molecular mechanisms of a number of anti-phage systems have not yet been fully elucidated, which indicates the need for further study of the phage-host relations.

Key words: *Vibrio cholerae*, anti-phage systems, CRISPR-Cas system, PLE islands, BREX system, Abi infection.

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

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

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

Citation: Kuratashvili A.Yu., Plekhanov N.A., Karpunina L.V., Zadnova S.P. Systems of Phage Resistance in *Vibrio cholerae* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 2:20–26. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-20-26

Received 06.02.2024. Revised 20.02.2024. Accepted 15.04.2024.

Kuratashvili A.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>
Plekhanov N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Zadnova S.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Бактериофаги (фаги) являются одним из компонентов внешней среды, постоянно воздействующих на бактериальные клетки. Холерным фагам, которые также часто выделяются совместно с возбудителем от больных холерой, принадлежит важная роль в генетическом разнообразии штаммов холерного вибриона. Совместное существование вибрионов и фагов и необходимость взаимного приспособления являются значимым фактором эволюции как патогена, так и фагов. Бактерии приобретают различные механизмы устойчивости к фагам посредством мутаций и горизонтального переноса генов, в свою очередь фаги легко развивают устойчивость ко многим бактериальным защитным системам. Показано, что антифаговые гены могут составлять более 10 % бактериального генома, а их анализ позволяет выявлять генетические различия между близкородственными штаммами. Ряд структур, включающих гены устойчивости к фагам, у холерного вибриона изучены достаточно подробно. Однако обнаруживаются новые системы, защищающие клетки от фагов. Высказывается предположение, что одна из причин длительного существования возбудителя холеры обусловлена его способностью противостоять фагам в результате выработки различных стратегий резистентности [1–3]. Механизмы устойчивости штаммов *Vibrio cholerae* к фагам нацелены практически на все этапы фаговой инфекции: на предотвращение адсорбции (изменение фаговых рецепторов, продукция внеклеточных полисахаридов), деградацию фаговых нуклеиновых кислот (системы рестрикции-модификации, CRISPR-Cas-системы), ингибирование процесса продукции частиц фага (PLE-острова, системы BREX, Abi, CBASS, токсин-антитоксин). Изучение антифаговых систем расширяет наши знания о генетическом разнообразии штаммов холерного вибриона. Кроме того, в связи с появлением бактерий, устойчивых к большому числу антибиотиков, активно развивается направление по использованию фагов для лечения и профилактики холеры. При этом, несмотря на присутствие у холерного вибриона большого количества антифаговых систем, разработано несколько препаратов на основе «фагового коктейля», которые способны уничтожить фаги, и предлагаются в качестве лечебных [4, 5]. Таким образом, анализ данных о системах устойчивости штаммов *V. cholerae* к литическим фагам представляет как научный, так и практический интерес.

Цель работы – анализ литературных данных о системах устойчивости штаммов *V. cholerae* к литическим холерным фагам.

Предотвращение адсорбции фага. Первый этап взаимодействия фага с бактериальной клеткой включает специфическое связывание с рецептором на поверхности клетки-хозяина. В качестве рецепторов фаги используют различные поверхностные структуры: пили, белки внешней мембраны, О-антигены липополисахарида. При изучении рецепторов для типизирующих VP1 – VP5 холерных фагов выявлено, что фаг VP5 взаимодействует с белком внешней мембраны OmpW, VP4 – с O1-антигеном, VP2 использует в качестве рецепторов мембранные белки системы секреции II типа EpsD и EpsM, а рецепторами для фага VP3 являются несколько поверхностных структур (белок внешней мембраны TolC, коровые олигосахариды липополисахарида, O1-антиген) [6–10]. Долгое время не были выявлены рецепторы для фага VP1. В 2021 г. F. Fan *et al.* установили, что данный фаг взаимодействует с мембранным белком, обозначенным как VcpQ (*V. cholerae* polyQ protein). Штаммы, лизирующиеся фагом VP1, содержат белок VcpQ, включающий 46 аминокислотных остатков глутаминовой кислоты. Если происходила модификация белка VcpQ (количество глутамина уменьшалось), то адсорбция фага снижалась или полностью прекращалась [11].

Нами при изучении механизмов устойчивости штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор к холерному диагностическому фагу эльтор исследована структура гена *vcpQ* и аминокислотная последовательность белка VcpQ у 17 токсигенных штаммов, содержащих гены *ctxAB*, кодирующие биосинтез холерного токсина, завезенных в РФ в 1970–2014 гг., и 20 нетоксигенных (*ctxAB*⁻) штаммов, изолированных от больных и из воды открытых водоемов в 1981–2020 гг. В результате установлено, что 76,5 % токсигенных и 30 % нетоксигенных штаммов содержали в белке VcpQ 46 остатков глутамина, у остальных его количество варьировало от 12 до 44 (рис. 1). Однако присутствие глутамина в белке VcpQ не коррелировало с чувствительностью изученных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор к фагу эльтор. Устойчивые к данному фагу штаммы имели интактный белок VcpQ, содержащий 46 остатков глутамина, а у ряда лизирующихся данным фагом изолятов протеин VcpQ включал меньшее количество глута-

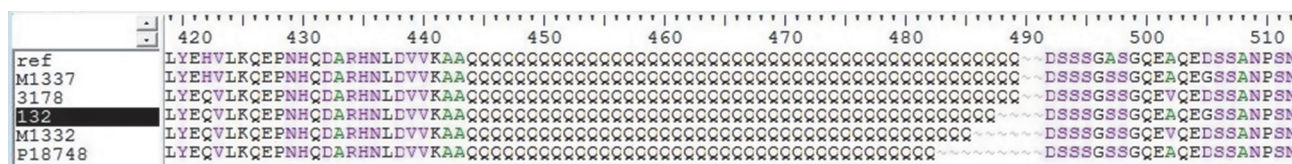


Рис. 1. Вариабельность аминокислотной последовательности белка VcpQ у некоторых нетоксигенных (*ctxAB*⁻) штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор (собственные данные)

Fig. 1. Variability of the amino acid sequence in the VcpQ protein in some non-toxicogenic (*ctxAB*⁻) strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor (own data)

мина. Полученные данные показывают, что данный белок не является рецептором для диагностического холерного фага эльтор.

Среди большого количества выявленных литических фагов *V. cholerae* хорошо изученными являются три фага: ICP1, ICP2 и ICP3. Фаг ICP1 впервые выделен в 1992 г. в Индии от больного. В дальнейшем установлено, что данный фаг очень часто изолируется из внешней среды, а также от больных в Бангладеш [12–15]. Установлено, что в качестве рецептора фаги ICP1 и ICP3 используют O1-антиген. Фаг ICP2 прикрепляется к белку внешней мембраны OmpU. Показано, что при модификации O1-антигена штаммы *V. cholerae* становятся устойчивыми к фагам ICP1 и ICP3. При этом у резистентных к фагам ICP штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор снижаются вирулентные свойства. Как известно, O1-антиген используется вибрионами в качестве адгезина при прикреплении к эпителиоцитам кишечника, а в результате его модификации колонизирующая способность вибрионов уменьшается и штаммы становятся менее вирулентными [16, 17].

Показано, что повышение устойчивости штаммов *V. cholerae* к фагам может происходить в результате функционирования системы quorum sensing (QS) – механизма, в котором экспрессия генов зависит от плотности бактериальной популяции и накопления в среде определенных химических сигнальных молекул – аутоиндукторов. У холерного вибриона хорошо изученными являются две системы QS. Первая включает аутоиндуктор CAI-1 и сенсорный белок CqsS, вторая – аутоиндуктор AI-2 и сенсорный белковый комплекс LuxPQ. Экспериментально доказано, что при добавлении CAI-1 и AI-2 в смешанные культуры с фагами выживаемость *V. cholerae* увеличивалась, а титр фага резко снижался. При этом наблюдаемый эффект влияния аутоиндукторов был опосредован QS-зависимой продукцией растворимой геммагглютинин протеазы (HAP), а также изменением структуры фаговых рецепторов. Аутоиндукторы репрессируют экспрессию генов, необходимых для биосинтеза O1-антигена липополисахарида, который фаги используют в качестве рецептора, а продуцируемая во внешнюю среду HAP лизирует холерные фаги [18].

Еще одной стратегией защиты *V. cholerae* от фагов является продукция так называемых «ловушек», в роли которых выступают везикулы наружной мембраны (ВНМ). ВНМ имеют сферическую форму и включают периплазму клеток, окруженную мембраной, состав которой идентичен бактериальной клетке, в том числе в ней содержится O1-антиген, белки Omp внешней мембраны. Экспериментально доказано, что активная продукция ВНМ защищает популяцию *V. cholerae* от действия всех трех фагов ICP. Учитывая, что фаги ICP1, ICP2, ICP3 входят в состав препарата для фаготерапии, необходимо предусматривать возможность выработки ВНМ как бактериального механизма, который может повлиять на результат лечения фагами [19].

Помимо изменения поверхностных рецепторов, резистентность к фагу может быть также достигнута за счет продукции внеклеточного полисахаридного матрикса – ключевого компонента бактериальной биопленки, защищающей клетки от неблагоприятных факторов внешней среды. Стоит отметить, что формирование биопленки и продукция экзополисахарида также регулируется системой QS. Слой полисахаридов обеспечивает физический барьер между фагами и поверхностью клетки, маскируя фаговые рецепторы. Однако некоторые фаги приобрели способность разрушать полисахариды с помощью ферментов (полисахараз и лиаз). Так, экспериментально доказано, что лиаза, продуцируемая фагом JA1, нарушает структуру капсульного полисахарида штамма *V. cholerae* AI-1838 O139-серогруппы, чем и объясняется способность данного фага специфически лизировать штаммы указанной серогруппы [20].

Таким образом, адсорбция фага на поверхности клетки-хозяина является одним из наиболее важных этапов фаговой инфекции. В связи с этим для проведения эффективной фаготерапии необходимы знания о рецепторах, используемых фагами. Для сохранения рецепторов в интактном состоянии, а также исключения возможности патогена к продукции экзополисахарида, необходимо предварительно блокировать систему QS [21, 22].

Дегградация фаговых нуклеиновых кислот.

Если ДНК фага все-таки попала в клетку, она уничтожается с помощью ферментов рестрикции-модификации (RM) и с использованием адаптивной иммунной системы CRISPR-Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR associated proteins). RM является наиболее распространенной формой активной защиты бактерий от фагов. Данные системы подразделяются на четыре класса (I–IV) и включают гены, кодирующие эндонуклеазу рестрикции и метилтрансферазу или только эндонуклеазу. Эндонуклеазы фрагментируют экзогенную ДНК. Для того чтобы предотвратить неизбежное действие ферментов на собственную ДНК, бактерии синтезируют метилтрансферазы для ее модификации. Системы рестрикции-модификации выявлены как в токсигенных штаммах *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, так и в нетоксигенных изолятах данных серогрупп. Так, в геноме токсигенных штаммов в составе острова патогенности VPI-2 обнаружена система RM I типа, а в составе ICE SXT-элемента – RM I и II типов [1, 23]. Стоит отметить, что расположение систем рестрикции-модификации на мобильных генетических элементах способствует их передаче другим бактериям в результате горизонтального переноса.

CRISPR/Cas-система функционирует как бактериальная приобретенная иммунная система, запасающая вирусный генетический материал и предотвращающая последующее заражение бактерий фагами [24]. Данные системы делятся на два класса (1 и 2), шесть типов (I–VI), которые включают раз-

личное количество подтипов. CRISPR/Cas-локусы, как правило, состоят из прямых повторов длиной 21–48 п.н., разделенных неповторяющимися спейсерами (26–72 п.н.), и различного количества генов *cas* (от 4 до 20). Чем большее количество фагов заражают клетку-хозяина и чем разнообразнее приобретенные спейсеры, тем эффективнее бактерии защищаются от заражения разными фагами. Гены CRISPR/Cas-системы идентифицированы в штаммах *V. cholerae* O1 классического биовара, а также в геномах нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор и расположены преимущественно на геномных островах и транспозоноподобных элементах [25].

Ингибирование образования фаговых частиц.

Одним из механизмов устойчивости бактерий к фагам является наличие систем, блокирующих репликацию фагов. Так, у токсигенных штаммов *V. cholerae* O1-серогруппы выявлены фагоиндуцируемые PLE-острова (Phage inducible chromosomal island-like elements) размером 19 kb, используемые для защиты от фага ICP1 [26]. Первоначально было выявлено 5 типов данных мобильных генетических элементов, в настоящее время описано 10. Показано, что каждый тип PLE доминировал в штаммах *V. cholerae*, выделенных в определенный период времени, при этом в одном штамме содержался только один тип PLE-острова. При этом в штаммах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных после 2018 г., данные острова отсутствуют. Некоторые из PLE-островов выявлены в штаммах, циркулировавших короткое время, и больше затем не встречались. Так, PLE6 присутствовал только в одном штамме, выделенном в Бангладеш в 1987 г., а PLE10 – в четырех штаммах, изолированных от одного больного на данной территории в 2017 г. PLE5 обнаруживается в штаммах *V. cholerae* классического биовара. PLE8 был в штаммах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, циркулировавших во Вьетнаме в 1995 и 2004 гг. Наиболее распространенным является остров PLE4, обнаруженный в штаммах *V. cholerae*, вызвавших осложнения в 1994–2005 гг. в разных странах мира [26, 27]. Данный тип PLE выявлен и нами при анализе штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, завезенных в 1993–1999 гг. на территорию РФ и Украины [28].

PLE-острова включают гены, способствующие функционированию их как мобильных генетических элементов (*int* – интегразы, *repA* – фактор инициации репликации); консервативные гены, характерные для всех типов PLE-островов (*capR* – подавляет морфогенез капсида фага, *nixI* – кодирует нуклеазу, препятствующую репликации фага, *lidI* – способствует лизису клеток холерного вибриона); гены с неизвестной функцией, а также вариабельные участки, характерные для определенного типа PLE-острова. При попадании фага ICP1 в клетки происходит активная экспрессия нуклеазы NixI, которая расщепляет генетический материал фага ICP1 [29]. Параллельно происходит вырезание PLE-элемента из хромосомы, образование его репликативной формы и формирова-

ние фаговых частиц, содержащих генетический PLE-материал. Зараженные клетки в итоге лизируются, но процесс распространения фага ICP1 на соседние бактерии останавливается, что способствует сохранению популяции штаммов *V. cholerae* [30–32].

В 2015 г. T. Goldfarb *et al.* сообщили об обнаружении у *Bacillus cereus* новой системы уничтожения фагов – BREX (Bacteriophage exclusion), придающей устойчивость к широкому кругу вирулентных и умеренных фагов [33]. Действие данной системы основано на блокировании репликации ДНК фага по невыясненному пока механизму. Гены BREX-системы обнаружены в геноме многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в том числе и у холерного вибриона. Данная защитная система разделена на 6 основных типов, в каждом из которых содержится от 4 до 8 генов, при этом наиболее распространенным является 1-й тип. Гены *pglZ* (*brxZ*), кодирующий щелочную фосфатазу, и *pglY* (*brxC*), ответственный за продукцию АТФазы, являются консервативными и присутствуют в каждом из шести типов BREX-системы [34]. У токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор гены BREX-системы 1-го типа обнаружены в составе «пятой горячей точки» ICE SXT-элементов [1].

Абортивная иммунная инфекция Abi (abortive infection) – одна из стратегий борьбы с фагами, при которой инфицированная клетка вырабатывает вещества, которые способствуют ее гибели. Abi активируется на стадии образования фаговых частиц. Подавляя собственный метаболизм и останавливая рост, что в конечном итоге приводит к апоптозу, клетка блокирует процесс созревания и высвобождения фаговых частиц. Abi-инфекция происходит с использованием антифаговой сигнальной системы на основе циклических олигонуклеотидов CBASS (Cyclic oligonucleotide based anti-phage signaling system) и системы токсин-антитоксин (ТА). Гены, кодирующие CBASS-систему *V. cholerae*, расположены на острове пандемичности VSP-I и включают оперон из четырех генов: *capV* (*vc0178*), *dncV* (*vc0179*), *cap2* (*vc0180*), *cap3* (*vc0181*). При проникновении фага в клетку активируется транскрипция гена *dncV*, кодирующего олигонуклеотид циклазу DncV, и в клетке начинается синтез 3'3'-циклических олигонуклеотидов (сGAMP), которые стимулируют транскрипцию другого гена – *capV*. Продуктируемая фосфолипаза CapV разрушает клеточную оболочку собственной клетки, что способствует ее гибели. Белок Cap2 усиливает, а Cap3 подавляет синтез сGAMP, воздействуя на С-концевую участок белка DncV. Показано, что транскрипция *dncV* и *capV* происходит только при высокой плотности бактериальной популяции и активируется в ответ на нарушение биосинтеза фолата [2].

Системы токсин-антитоксин состоят из двух генов, кодирующих токсин и антитоксин, и по структуре последних классифицируются на три типа. Наиболее распространенными являются системы

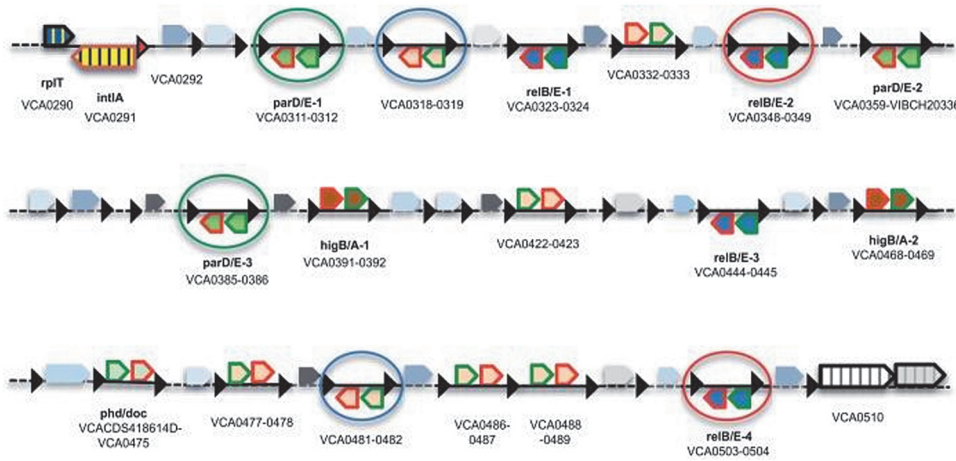


Рис. 2. Распределение различных кассет, кодирующих системы токсин-антитоксин, в суперинтегрене референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 биовара Эль Тор. Пятиугольниками, обрмленными зеленым цветом, обозначены анти-токсины, красным – токсины [36]

Fig. 2. Distribution of various cassettes encoding toxin-antitoxin systems in the superintegron of the reference strain *V. cholerae* N16961 O1 biovar El Tor. Pentagons framed in green indicate antitoxins, red – toxins [36]

2-го типа, в которой токсин и антитоксин являются белками. Данные системы не только участвуют в защите от фагов, но и выполняют множество других функций в клетках, в том числе контролируют рост бактерий, формирование биопленки, участвуют в поддержании стабильности генома. Когда фаги инфицируют бактерии, более нестабильный анти-токсин расщепляется раньше, чем токсин, который накапливается в клетке и фрагментирует не только генетический материал фагов, но и разрушает собственную ДНК бактерий, что приводит к остановке роста, лизису клеточных мембран и гибели клеток. Первоначально у *V. cholerae* было выявлено 13 систем ТА 2-го типа, в настоящее время описано 19 [35–37]. При этом только одна пара генов (*vc0814-0815*) расположена на первой (большой) хромосоме, другие присутствуют на второй (малой) хромосоме в составе суперинтегрона (рис. 2). Установлено, что большинство систем ТА активны и функции большинства кодируемых ими токсинов установлены, не функционирующей является система, кодируемая генами *vca0422-0423*. Так, показано, что ParE из кассеты ParDE, присутствующей на хромосоме в трех копиях (*vca0311-0312*, *vca0359-vibch20336*, *vca0385-0386*), вызывает деградацию ДНК. Токсин RelE из системы RelBE (*vca0323-0324*, *vca0348-0349*, *vca0444-0445*, *vca0503-0504*) расщепляет мРНК, что ингибирует трансляцию и является летальным для клеток.

Таким образом, холерные вибрионы используют многочисленные стратегии сопротивления инфекции литическими фагами, а последние, в свою очередь, приобретают механизмы для преодоления этой устойчивости, что способствует эволюции как бактерий, так и фагов. Молекулярные механизмы ряда антифаговых систем еще до конца не выяснены, что указывает на необходимость дальнейшего изучения взаимоотношений фаг – хозяин. Понимание механизмов взаимной адаптации между возбудителем и высокоспецифичным фагом может внести вклад в повышение эффективности назначаемой фаговой терапии и преодоление устойчивости бактерий к фагам.

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. LeGault K.N., Hays S.G., Angermeyer A., McKitterick A.C., Johura F.T., Sultana M., Ahmed T., Alam M., Seed K.D. Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern phage-pathogen conflicts. *Science*. 2021; 373(6554):eabg2166. DOI: 10.1126/science.abg2166.
2. Severin G.B., Ramliden M.S., Ford K.C., Van Alst A.J., Sanath-Kumar R., Decker K.A., Hsueh B.Y., Chen G., Yoon S.H., Demey L.M., O’Hara B.J., Rhoades C.R., DiRita V.J., Ng W.-L., Waters C.M. Activation of a *Vibrio cholerae* CBASS anti-phage system by quorum sensing and folate depletion. *mBio*. 2023; 14(5):e0087523. DOI: 10.1128/mbio.00875-23.
3. Tumban E., editor. Bacteriophages. Methods and Protocols. New York: Humana Press; 2024. 429 p.
4. Yen M., Camilli A. Mechanisms of the evolutionary arms race between *Vibrio cholerae* and Vibriophage clinical isolates. *Int. Microbiol.* 2017; 20(3):116–20. DOI: 10.2436/20.1501.01.292.
5. Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Синельник Е.А., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погожова М.П., Аноприенко А.О., Пасюкова Н.И. Оценка безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:160–2. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-160-162.
6. Zhang J., Li W., Zhang Q., Wang H., Xu X., Diao B., Zhang L., Kan B. The core oligosaccharide and thioredoxin of *Vibrio cholerae* are necessary for binding and propagation of its typing phage VP3. *J. Bacteriol.* 2009; 191(8):2622–9. DOI: 10.1128/JB.01370-08.
7. Xu J., Zhang J., Lu X., Liang W., Zhang L., Kan B. O antigen is the receptor of *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor typing phage VP4. *J. Bacteriol.* 2013; 195(4):798–806. DOI: 10.1128/JB.01770-12.
8. Xu D., Zhang J., Liu J., Xu J., Zhou H., Zhang L., Zhu J., Kan B. Outer membrane protein OmpW is the receptor for typing phage VP5 in the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype. *J. Virol.* 2014; 88(12):7109–11. DOI: 10.1128/JVI.03186-13.
9. Fan F., Li X., Pang B., Zhang C., Li Z., Zhang L., Li J., Zhang J., Yan M., Liang W., Kan B. The outer-membrane protein TolC of *Vibrio cholerae* serves as a second cell-surface receptor for the VP3 phage. *J. Biol. Chem.* 2018; 293(11):4000–13. DOI: 10.1074/jbc.M117.805689.
10. Sun H., Liu M., Fan F., Li Z., Fan Y., Zhang J., Huang Y., Li Z., Li J., Xu J., Kan B. The Type II secretory system mediates phage infection in *Vibrio cholerae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11:662344. DOI: 10.3389/fcimb.2021.662344.
11. Fan F., Li Z., Wang J., Diao B., Liang W., Kan B. A PolyQ membrane protein of *Vibrio cholerae* acts as the receptor for phage infection. *J. Virol.* 2021; 95(6):e02245-20. DOI: 10.1128/JVI.02245-20.
12. Seed K.D., Bodi K.L., Kropinski A.M., Ackermann H.-W., Calderwood S.B., Qadri F., Camilli A. Evidence of a dominant lineage of *Vibrio cholerae*-specific lytic bacteriophages shed by cholera patients over a 10-year period in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2011; 2(1):2:e00334-10. DOI: 10.1128/mBio.00334-10.

13. Angermeyer A., Das M.M., Singh D.V., Seed K.D. Analysis of 19 highly conserved *Vibrio cholerae* bacteriophages isolated from environmental and patient sources over a twelve-year period. *Viruses*. 2018; 10(6):299. DOI: 10.3390/v10060299.

14. McKitterick A.C., LeGault K.N., Angermeyer A., Alam M., Seed K.D. Competition between mobile genetic elements drives optimization of a phage-encoded CRISPR-Cas system: insights from a natural arms race. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2019; 374(1772):20180089. DOI: 10.1098/rstb.2018.0089.

15. Boyd C.M., Angermeyer A., Hays S.G., Barth Z.K., Patel K.M., Seed K.D. Bacteriophage ICP1: a persistent predator of *Vibrio cholerae*. *Annu. Rev. Virol.* 2021; 8(1):285–304. DOI: 10.1146/annurev-virology-091919-072020.

16. Seed K.D., Faruque S.M., Mekalanos J.J., Calderwood S.B., Qadri F., Camilli A. Phase variable O antigen biosynthetic genes control expression of the major protective antigen and bacteriophage receptor in *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Pathog.* 2012; 8(9):e1002917. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002917.

17. Beckman D.A., Waters C.M. *Vibrio cholerae* phage ICP3 requires O1 antigen for infection. *Infect. Immun.* 2023; 91(9):e0002623. DOI: 10.1128/iai.00026-23.

18. Hoque M.M., Naser I.B., Bari S.M.N., Zhu J., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Quorum regulated resistance of *Vibrio cholerae* against environmental bacteriophages. *Sci. Rep.* 2016; 6:37956. DOI: 10.1038/srep37956.

19. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.

20. Linnerborg M., Weintraub A., Albert M.J., Widmalm G. Depolymerization of the capsular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O139 by a lyase associated with the bacteriophage JA1. *Carbohydr. Res.* 2001; 333(4):263–9. DOI: 10.1016/S0008-6215(01)00159-8.

21. Laanto E. Overcoming bacteriophage resistance in phage therapy. *Methods Mol. Biol.* 2024; 2738:401–10. DOI: 10.1007/978-1-0716-3549-0_23.

22. Murugesan J., Mubarak S.J., Vedagiri H. Design of novel anti-quorum sensing peptides targeting LuxO to combat *Vibrio cholerae* pathogenesis. *In Silico Pharmacol.* 2023; 11(1):30. DOI: 10.1007/s40203-023-00172-2.

23. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002; 148(Pt. 11):3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.

24. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5):317–27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.

25. McDonald N.D., Regmi A., Morreale D.P., Borowski J.D., Boyd E.F. CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in *Vibrio* species. *BMC Genomics*. 2019; 20(1):105. DOI: 10.1186/s12864-019-5439-1.

26. O'Hara B.J., Barth Z.K., McKitterick A.C., Seed K.D. A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome. *PLoS Genet.* 2017; 13(6):e1006838. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006838.

27. Angermeyer A., Hays S.G., Nguyen M.H.T., Johura F.T., Sultana M., Alam M., Seed K.D. Evolutionary sweeps of subviral parasites and their phage host bring unique parasite variants and disappearance of a phage CRISPR-Cas system. *mBio*. 2022; 13(1):e0308821. DOI: 10.1128/mbio.03088-21.

28. Zadnova S.P., Pleshchikov N.A., Spirina A.Yu., Швиденко И.Г., Савельев В.Н. Выявление фагоиндуцируемых мобильных генетических элементов в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 2:112–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-112-119.

29. LeGault K.N., Barth Z.K., DePaola P., Seed K.D. A phage parasite deploys a nicking nuclease effector to inhibit viral host replication. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50(15):8401–17. DOI: 10.1093/nar/gkac002.

30. McKitterick A.C., Seed K.D. Anti-phage islands force their target phage to directly mediate island excision and spread. *Nat. Commun.* 2018; 9(1):2348. DOI: 10.1038/s41467-018-04786-5.

31. Barth Z.K., Silvas T.V., Angermeyer A., Seed K.D. Genome replication dynamics of a bacteriophage and its satellite reveal strategies for parasitism and viral restriction. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(1):249–63. DOI: 10.1093/nar/gkz1005.

32. Netter Z., Boyd C.M., Silvas T.V., Seed K.D. A phage satellite tunes inducing phage gene expression using a domesticated endonuclease to balance inhibition and virion hijacking. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(8):4386–401. DOI: 10.1093/nar/gkab207.

33. Goldfarb T., Sberro H., Weinstock E., Cohen O., Doron S., Charpak-Amikam Y., Afik S., Ofir G., Sorek R. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J.* 2015; 34(2):169–83. DOI: 10.15252/embj.201489455.

34. Zaworski J., Davaa O., Brandt J., Baum C., Ettwiller L., Fomenkov A., Raleigh E.A. Reassembling a cannon in the DNA defense arsenal: genetics of StySA, a BREX phage exclusion system

in *Salmonella* lab strains. *PLoS Genet.* 2022; 18(4):e1009943. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009943.

35. Pandey D.P., Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(3):966–76. DOI: 10.1093/nar/gki201.

36. Iqbal N., Guérout A.-M., Krin E., Le Roux F., Mazel D. Comprehensive functional analysis of the 18 *Vibrio cholerae* N16961 toxin-antitoxin systems substantiates their role in stabilizing the superintegron. *J. Bacteriol.* 2015; 197(13):2150–9. DOI: 10.1128/JB.00108-15.

37. Krin E., Baharoglu Z., Sismeiro O., Varet H., Coppée J.Y., Mazel D. Systematic transcriptome analysis allows the identification of new type I and type II toxin/antitoxin systems located in the superintegron of *Vibrio cholerae*. *Res. Microbiol.* 2023; 174(1-2):103997. DOI: 10.1016/j.resmic.2022.103997.

References

1. LeGault K.N., Hays S.G., Angermeyer A., McKitterick A.C., Johura F.T., Sultana M., Ahmed T., Alam M., Seed K.D. Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern phage-pathogen conflicts. *Science*. 2021; 373(6554):eabg2166. DOI: 10.1126/science.abg2166.

2. Severin G.B., Ramliden M.S., Ford K.C., Van Alst A.J., Sanath-Kumar R., Decker K.A., Hsueh B.Y., Chen G., Yoon S.H., Demy L.M., O'Hara B.J., Rhoades C.R., DiRita V.J., Ng W.-L., Waters C.M. Activation of a *Vibrio cholerae* CBASS anti-phage system by quorum sensing and folate depletion. *mBio*. 2023; 14(5):e0087523. DOI: 10.1128/mbio.00875-23.

3. Tumban E., editor. Bacteriophages. Methods and Protocols. New York: Humana Press; 2024. 429 p.

4. Yen M., Camilli A. Mechanisms of the evolutionary arms race between *Vibrio cholerae* and Bacteriophage clinical isolates. *Int. Microbiol.* 2017; 20(3):116–20. DOI: 10.2436/20.1501.01.292.

5. Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Sinel'nik E.A., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Pasyukova N.I. [Assessment of cholera bacteriophages mixture safety on an experimental animal model]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; (4):160–2. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-160-162.

6. Zhang J., Li W., Zhang Q., Wang H., Xu X., Diao B., Zhang L., Kan B. The core oligosaccharide and thioredoxin of *Vibrio cholerae* are necessary for binding and propagation of its typing phage VP3. *J. Bacteriol.* 2009; 191(8):2622–9. DOI: 10.1128/JB.01370-08.

7. Xu J., Zhang J., Lu X., Liang W., Zhang L., Kan B. O antigen is the receptor of *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor typing phage VP4. *J. Bacteriol.* 2013; 195(4):798–806. DOI: 10.1128/JB.01770-12.

8. Xu D., Zhang J., Liu J., Xu J., Zhou H., Zhang L., Zhu J., Kan B. Outer membrane protein OmpW is the receptor for typing phage VP5 in the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype. *J. Virol.* 2014; 88(12):7109–11. DOI: 10.1128/JVI.03186-13.

9. Fan F., Li X., Pang B., Zhang C., Li Z., Zhang L., Li J., Zhang J., Yan M., Liang W., Kan B. The outer-membrane protein TolC of *Vibrio cholerae* serves as a second cell-surface receptor for the VP3 phage. *J. Biol. Chem.* 2018; 293(11):4000–13. DOI: 10.1074/jbc.M117.805689.

10. Sun H., Liu M., Fan F., Li Z., Fan Y., Zhang J., Huang Y., Li Z., Li J., Xu J., Kan B. The Type II secretory system mediates phage infection in *Vibrio cholerae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11:662344. DOI: 10.3389/fcimb.2021.662344.

11. Fan F., Li Z., Wang J., Diao B., Liang W., Kan B. A PolyQ membrane protein of *Vibrio cholerae* acts as the receptor for phage infection. *J. Virol.* 2021; 95(6):e02245-20. DOI: 10.1128/JVI.02245-20.

12. Seed K.D., Bodi K.L., Kropinski A.M., Ackermann H.-W., Calderwood S.B., Qadri F., Camilli A. Evidence of a dominant lineage of *Vibrio cholerae*-specific lytic bacteriophages shed by cholera patients over a 10-year period in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2011; 2(1):2:e00334-10. DOI: 10.1128/mBio.00334-10.

13. Angermeyer A., Das M.M., Singh D.V., Seed K.D. Analysis of 19 highly conserved *Vibrio cholerae* bacteriophages isolated from environmental and patient sources over a twelve-year period. *Viruses*. 2018; 10(6):299. DOI: 10.3390/v10060299.

14. McKitterick A.C., LeGault K.N., Angermeyer A., Alam M., Seed K.D. Competition between mobile genetic elements drives optimization of a phage-encoded CRISPR-Cas system: insights from a natural arms race. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2019; 374(1772):20180089. DOI: 10.1098/rstb.2018.0089.

15. Boyd C.M., Angermeyer A., Hays S.G., Barth Z.K., Patel K.M., Seed K.D. Bacteriophage ICP1: a persistent predator of *Vibrio cholerae*. *Annu. Rev. Virol.* 2021; 8(1):285–304. DOI: 10.1146/annurev-virology-091919-072020.

16. Seed K.D., Faruque S.M., Mekalanos J.J., Calderwood S.B., Qadri F., Camilli A. Phase variable O antigen biosynthetic genes control expression of the major protective antigen and bacteriophage

- receptor in *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Pathog.* 2012; 8(9):e1002917. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002917.
17. Beckman D.A., Waters C.M. *Vibrio cholerae* phage ICP3 requires O1 antigen for infection. *Infect. Immun.* 2023; 91(9):e0002623. DOI: 10.1128/iai.00026-23.
18. Hoque M.M., Naser I.B., Bari S.M.N., Zhu J., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Quorum regulated resistance of *Vibrio cholerae* against environmental bacteriophages. *Sci. Rep.* 2016; 6:37956. DOI: 10.1038/srep37956.
19. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
20. Linnerborg M., Weintraub A., Albert M.J., Widmalm G. Depolymerization of the capsular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O139 by a lyase associated with the bacteriophage JA1. *Carbohydr. Res.* 2001; 333(4):263-9. DOI: 10.1016/S0008-6215(01)00159-8.
21. Laanto E. Overcoming bacteriophage resistance in phage therapy. *Methods Mol. Biol.* 2024; 2738:401-10. DOI: 10.1007/978-1-0716-3549-0_23.
22. Murugesan J., Mubarak S.J., Vedagiri H. Design of novel anti-quorum sensing peptides targeting LuxO to combat *Vibrio cholerae* pathogenesis. *In Silico Pharmacol.* 2023; 11(1):30. DOI: 10.1007/s40203-023-00172-2.
23. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology.* 2002; 148(Pt. 11):3681-93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.
24. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5):317-27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.
25. McDonald N.D., Regmi A., Morreale D.P., Borowski J.D., Boyd E.F. CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in *Vibrio* species. *BMC Genomics.* 2019; 20(1):105. DOI: 10.1186/s12864-019-5439-1.
26. O'Hara B.J., Barth Z.K., McKitterick A.C., Seed K.D. A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome. *PLoS Genet.* 2017; 13(6):e1006838. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006838.
27. Angermeyer A., Hays S.G., Nguyen M.H.T., Johura F.T., Sultana M., Alam M., Seed K.D. Evolutionary sweeps of subviral parasites and their phage host bring unique parasite variants and disappearance of a phage CRISPR-Cas system. *mBio.* 2022; 13(1):e0308821. DOI: 10.1128/mbio.03088-21.
28. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Shvidenko I.G., Savel'ev V.N. [Detection of phage-induced mobile genetic elements in strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; (2):112-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-112-119.
29. LeGault K.N., Barth Z.K., DePaola P., Seed K.D. A phage parasite deploys a nicking nuclease effector to inhibit viral host replication. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50(15):8401-17. DOI: 10.1093/nar/gkac002.
30. McKitterick A.C., Seed K.D. Anti-phage islands force their target phage to directly mediate island excision and spread. *Nat. Commun.* 2018; 9(1):2348. DOI: 10.1038/s41467-018-04786-5.
31. Barth Z.K., Silvas T.V., Angermeyer A., Seed K.D. Genome replication dynamics of a bacteriophage and its satellite reveal strategies for parasitism and viral restriction. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(1):249-63. DOI: 10.1093/nar/gkz1005.
32. Netter Z., Boyd C.M., Silvas T.V., Seed K.D. A phage satellite tunes inducing phage gene expression using a domesticated endonuclease to balance inhibition and virion hijacking. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(8):4386-401. DOI: 10.1093/nar/gkab207.
33. Goldfarb T., Sberro H., Weinstock E., Cohen O., Doron S., Charpak-Amikam Y., Afik S., Ofir G., Sorek R. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J.* 2015; 34(2):169-83. DOI: 10.15252/embj.201489455.
34. Zaworski J., Dagva O., Brandt J., Baum C., Ettwiller L., Fomenkov A., Raleigh E.A. Reassembling a cannon in the DNA defense arsenal: genetics of StySA, a BREX phage exclusion system in *Salmonella* lab strains. *PLoS Genet.* 2022; 18(4):e1009943. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009943.
35. Pandey D.P., Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(3):966-76. DOI: 10.1093/nar/gki201.
36. Iqbal N., Guéroult A.-M., Krin E., Le Roux F., Mazel D. Comprehensive functional analysis of the 18 *Vibrio cholerae* N16961 toxin-antitoxin systems substantiates their role in stabilizing the superintegron. *J. Bacteriol.* 2015; 197(13):2150-9. DOI: 10.1128/JB.00108-15.
37. Krin E., Baharoglu Z., Sismeiro O., Varet H., Coppée J.Y., Mazel D. Systematic transcriptome analysis allows the identification of new type I and type II toxin/antitoxin systems located in the superintegron of *Vibrio cholerae*. *Res. Microbiol.* 2023; 174(1-2):103997. DOI: 10.1016/j.resmic.2022.103997.

Authors:

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

Karpunina L.V. Saratov State University of Genetics, Biotechnology, and Engineering named after N.I. Vavilov. Bld. 3, 4, Petra Stolypina Avenue, Saratov, 410012, Russian Federation.

Об авторах:

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

Карпунина Л.В. Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова. Российская Федерация, 410012, Саратов, пр-т им. Петра Столыпина, 4, стр. 3.