

Н.А.Плеханов, С.П.Заднова

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ МАННОЗОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ ПИЛЕЙ АДГЕЗИИ У РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР**

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

**Цель работы.** Провести сравнительный структурный и функциональный анализ генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей у типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор. **Материалы и методы.** В работе использовали типичные и генетически измененные штаммы холерного вибриона биовара Эль Тор, выделенные на территории Российской Федерации в период с 1970 по 2012 год из объектов внешней среды и от больных. Были применены микробиологические и молекулярно-генетические методы, анализ данных полногеномного секвенирования. **Результаты и выводы.** Методом ПЦР установлено присутствие гена *mshA*, кодирующего основную субъединицу MSHA пилей, у всех исследуемых штаммов. При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности генов, входящих в *msh* кластер, у типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, установлена идентичность нуклеотидной последовательности гена *mshA* у всех исследованных штаммов. При этом у штаммов геновариантов, изолированных в период их появления (1988, 1993, 1994 гг.), структура остальных генов *msh* оперона идентична типичным Эль Тор вибрионам. В то же время, начиная с 1997 г., в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в последовательности генов, участвующих в сборке и секреции MSHA пилей, выявлены SNP, которые не оказывают влияния на биосинтез данных пилей адгезии, но их появление, возможно, явилось следствием адаптации штаммов геновариантов к разным условиям существования.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, геноварианты, MSHA, SNP.

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

N.A.Plekhanov, S.P.Zadnova

**Structural-Functional Analysis of the Genes, Encoding Biosynthesis of Mannose-Sensitive Hemagglutinating Pili of Adhesion in Different *Vibrio cholerae* El Tor Strains**

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

**Objective** of the study is to conduct comparative structural and functional analysis of the genes, encoding biosynthesis of mannose-sensitive hemagglutinating pili in typical *V. cholerae* El Tor strains and genovariants. **Materials and methods.** Utilized were typical and genetically altered strains of cholera vibrio, biovar El Tor, isolated in the territory of the Russian Federation between 1970 and 2012 from ambient environment objects and from patients. Applied were microbiological and molecular-genetic methods, as well as analysis of the data on the whole genome sequencing. **Results and conclusions.** Using PCR assay the presence of *mshA* gene, encoding basic sub-unit of MSHA pili, has been detected in all of the tested strains. Comparative analysis of the nucleotide sequence of the genes, included into *msh* cluster, has revealed identity of the nucleotide sequence of *mshA* gene, both in typical *V. cholerae* strains and genovariants. Thereat, in strains of genovariants, isolated at the time of their emergence (1988, 1993, 1994), the structure of the other genes in *msh* operon is identical to typical El Tor vibrios. At the same time, since 1997, in strains of *V. cholerae* El Tor genovariants, in the sequence of the genes, involved in the assembly and secretion of MSHA pili, identified have been the SNPs, which do not influence biosynthesis of these pili, but their occurrence, probably, was due to adaptation of the genovariant strains to varying living conditions.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, genovariants, MSHA, SNP.

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

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

**Citation:** Plekhanov N.A., Zadnova S.P. Structural-Functional Analysis of the Genes, Encoding Biosynthesis of Mannose-Sensitive Hemagglutinating Pili of Adhesion in Different *Vibrio cholerae* El Tor Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:75–78. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-75-78

В настоящее время причиной заболевания холерой являются токсигенные штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Данные изоляты, впервые появившиеся в 90-х годах XX столетия, заменили типичные штаммы Эль Тор вибрионов, которые вызвали начало текущей, 7-й пандемии холеры [3, 8]. Геноварианты в настоящее время получили глобальное распространение в мире [9] и с 1993 г. завозятся в Российскую Федерацию, вызывая

вспышки и единичные случаи заболевания [2].

Как известно, *V. cholerae* является не только патогеном человека, но и естественным обитателем пресных и соленых водоемов. В связи с этим особую важность представляют исследования механизмов выживания возбудителя во внешней среде. Переход из организма человека в водную среду сопровождается различными изменениями в клетках. В том числе снижается продукция факторов вирулентности,

но активно начинают экспрессироваться гены факторов адаптации, способствующие выживанию патогена в данной среде обитания. Показано, что уже на поздней стадии инфекции увеличивается экспрессия генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии (MSHA) [5, 10, 14]. MSHA пили располагаются на поверхности бактериальной клетки и участвуют в первом этапе формирования биопленки – прикреплении микроорганизма к субстрату. При отсутствии продукции данных пилей биопленка не образуется [12, 13]. В составе биопленки холерные вибрионы защищены от действия различных повреждающих факторов внешней среды и могут длительное время сохраняться в воде открытых водоемов. По данным литературы, геноварианты так же, как и типичные Эль Тор вибрионы, содержат *msh* оперон, но сведения о его структуре у штаммов геновариантов, изолированных в разные годы, а также сравнительной продукции ими MSHA пилей отсутствуют. В то же время изучение механизмов адаптации штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, способствующих их выживанию во внешней среде, позволят понять причины их селективного преимущества в современный период.

Учитывая важную роль MSHA пилей в выживании холерного вибриона во внешней среде, цель нашего исследования состояла в проведении сравнительного структурного и функционального анализа генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии у типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

### Материалы и методы

Исследования были проведены на 41 штамме *V. cholerae*, выделенном на территории Российской Федерации от больных и из внешней среды в период с 1970 по 2012 год (табл. 1). Штаммы хранили в лиофилизированном виде в Государственной коллекции патогенных бактерий. Культуру выращивали на агаре и бульоне LB (рН 7,2) в течение 18–24 ч при 37 °С.

Продукцию MSHA-пилей определяли с использованием эритроцитов I группы человека, учитывая максимальное разведение культуры, дающее видимую агглютинацию [4].

Наличие гена *mshA* выявляли методом ПЦР по описанной ранее методике [1]. Анализ данных полногеномного секвенирования штаммов проводили с помощью пакета программ DNASTAR SeqMan pro.

### Результаты и обсуждение

Согласно данным литературы, биосинтез MSHA пилей кодирует 17 генов, объединенных в два оперона (структурный и секреторный) и расположенных на острове персистенции EPI (от англ. *environmental persistence island*) на большой хромосоме [6]. При этом кроме гена *mshA*, кодирующего основную субъ-

единицу маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии, в указанный оперон входят гены *mshB-Q*, ответственные за сборку и транспортирование пилей на поверхность клеток. Так, белок MshE (52,5 kDa) выполняет функцию АТФазы, MshJ относится к белкам системы секреции II типа и совместно с MshN участвует в сборке и секреции MSHA пилей [6, 7].

На первом этапе работы проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов, входящих в *msh* оперон, у штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, полные геномы которых депонированы в базе данных NCBI. Для анализа были взяты типичный штамм *V. cholerae* M818 биовара Эль Тор (Саратов, 1970, LANM00000000.1) и штаммы геновариантов, изолированные в разные годы на эндемичной территории и завезенные в Россию и сопредельные государства, – *V. cholerae* P13762 (Узбекистан, 1988, LQYD00000000.1), M1275 (Дагестан, 1993, LRAF00000000.1), M1293 (Дагестан, 1994, JFFW00000000.1), P17644 (Ачинск, 1997, JRTW00000000.1), M1429 (Башкирия, 2002, LAEM00000000.1), P18899 (Мурманск, 2006, LAKM00000000.1), L3226 (Москва, 2010, JDVX00000000), секвенированные в лаборатории геномного и протеомного анализа РосНИПЧИ «Микроб». Из базы данных NCBI также были

Таблица 1

Штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор, использованные в работе

Штамм	Место выделения	Год выделения
Типичные штаммы Эль Тор вибрионов		
M712; M713	Московская область	1970
M736, M738	Пермь	1970
M818	Саратов	1970
M886; M887; M890	Астрахань	1970
M1011, M1013	Башкирия	1972
M582	Калмыкия	1974
M642	Астрахань	1975
C402	Ставрополь	1990
M1259; M1261	Пермь	1990
Геноварианты		
M1275; M1297	Дагестан	1993
M1264; M1272; M1298; M1299	Краснодар	1993
M1270	Татарстан	1993
M1293; M1295	Дагестан	1994
M1268, M1269	Магнитогорск	1994
M1266	Пермь	1994
P17644; P17647	Ачинск	1997
P17645	Иркутск	1997
M1326	Дагестан	1998
M1344; M1345	Казань	2001
M1429	Башкирия	2004
M1430	Тверь	2005
P18899	Мурманск	2006
L3225; L3226, L4150	Москва	2010
301	Таганрог	2011
M1509	Москва	2012

Результаты анализа нуклеотидной последовательности генов *msh* оперона различных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор

Штамм	Место и год выделения	Гены				
		<i>mshA</i>	<i>mshE</i>	<i>mshH</i>	<i>mshJ</i>	<i>mshN</i>
M818	Саратов, 1970	–	–	–	–	–
P13762	Узбекистан, 1988	–	–	–	–	–
M1275	Дагестан, 1993	–	–	–	–	–
M1293	Дагестан, 1994	–	–	–	–	–
P17644	Ачинск, 1997	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	p:249 G=>
CIRS101	Бангладеш, 2002	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	–
M1429	Башкирия, 2002	–	p:1219 G=>A	p:1384=>G	p:560 A=>G	–
P18899	Мурманск, 2006	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	–
H1	Гаити, 2010	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	–
L3226	Москва, 2010	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	–

Примечание: «–» – последовательность гена идентична последовательности референс-штамма *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор.

взяты для сравнения полногеномные последовательности штаммов CIRS101 (Бангладеш, 2002, ACVW0000000.1), H1 (Гаити, 2010, AKNH0000000.1).

Предварительно использованные в эксперименте штаммы были протестированы на наличие гена *mshA*. При ПЦР-анализе было установлено, что в геноме всех исследуемых штаммов присутствует данный ген, что может указывать на биосинтез штаммами MSHA-пилей.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов изученных нами штаммов установлено, что последовательность гена *mshA* одинакова у всех исследованных штаммов и идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор.

У штаммов *V. cholerae* M818, P13762, M1275 и M1293 структура остальных генов *msh* оперона также полностью совпадала с референс-штаммом.

В то же время у штамма *V. cholerae* P17644, изолированного в 1997 г., выявлена делеция одного нуклеотида в гене *mshN* в позиции 255 от начала гена, а также обнаружены несинонимичные однонуклеотидные замены (SNP) в генах *mshJ* (замена А на G в позиции 560) и *mshE* (замена G на А в позиции 1307). В штаммах геновариантов, выделенных в более поздние годы и в современный период (P18899, L3226, референс-штамм геновариантов CIRS101), также присутствовали SNP в генах *mshJ* и *mshE* (табл. 2). Необходимо отметить, что аналогичные замены были обнаружены зарубежными авторами у штаммов, выделенных во время эпидемии на острове Гаити в 2010 г. [11]. Возможно, выявленные SNP могут служить генетической меткой штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенных после 1997 г.

У штамма M1429, кроме указанных SNP в *mshJ* и *mshE*, был обнаружен сдвиг рамки считывания в гене *mshH*, вызванный вставкой единичного гуанинового нуклеотида в позиции 1384, приводящий к образованию стоп-кодона.

Таким образом, в результате анализа структуры генов *msh* кластера был обнаружен ряд SNP в генах *mshE* и *mshJ*, общих для всех исследованных штаммов геновариантов, выделенных в период с 1997 по 2010 год. Структура *msh* оперона у ранее выделенных штаммов геновариантов идентична типичным штаммам *V. cholerae* биовара Эль Тор.

На следующем этапе работы была изучена экспрессия данных пилей у типичных штаммов и штаммов геновариантов. В результате установлено, что все изученные штаммы продуцировали MSHA пили. При этом значительных отличий по их продукции между типичными штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированными в начале текущей пандемии холеры (1970–1990 гг.), и штаммами геновариантов, завезенными в разные годы (1993–2010), не выявлено.

В результате проведенных исследований установлено, что геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор так же, как и типичные Эль Тор вибрионы, продуцируют MSHA пили, поэтому способны формировать биопленку и длительное время сохраняться во внешней среде. Анализ нуклеотидной последовательности *msh* оперона у исследованных штаммов, показал стабильное сохранение структуры гена *mshA* во всех исследованных штаммах *V. cholerae* биовара Эль Тор, что говорит о ее важной роли в работе всей *msh*-системы. При этом структура *msh* оперона в штаммах геновариантов, изолированных в период их появления (1988, 1993, 1994 гг.), идентична типичным Эль Тор вибрионам. В то же время, начиная с 1997 г., в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в последовательности генов, участвующих в сборке и секреции MSHA пилей, выявлены SNP, которые не оказывают влияние на биосинтез данных пилей адгезии, но их появление, возможно, явилось следствием адаптации штаммов геновариантов к разным условиям существования.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Осин А.В., Нефедов К.С., Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры. *Генетика*. 2005; 41:53–62.
- Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в разные периоды 7-й пандемии холеры. *Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.* 2011; 3:3–10.
- Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 3(97):5–11.
- Hanne L.F., Finkelstein R.A. Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Immun.* 1982; 36(1):209–14.
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanism of persistence of *Vibrio cholerae*. *Frontiers Microbiol.* 2013; 4(00375):1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.
- Marsh J.W., Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J. Bacteriol.* 1999; 181(4):1110–7.
- Marsh J.W., Sun D., Taylor R.K. Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the *mshG* coding sequence. *J. Infect. Immun.* 1996; 64(2):460–5.
- Nair G.B., Faruque L.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
- Schild S., Tamayo R., Nelson E.J., Qadri F., Calderwood S.B., Camilli A. Genes induced late in infection increase fitness of *Vibrio cholerae* after release into the environment. *Cell. Host. Microbe.* 2007; 2(4):64–77. DOI: 10.1016/j.chom.2007.09.004.
- Sealfon R., Gire S., Ellis C., Calderwood S., Qadri F., Hensley L., Kellis M., Ryan E.T., LaRocque R.C., Harris J.B., Sabeti P.C. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and Dominican Republic. *BMC Genomics.* 2012; 13:468. DOI: 10.1186/1471-2164-13-468.
- Teschler J.K., Zamorano-Sanchez D., Utada A.S., Warner C.J., Wong G.C., Wong R.G., Linington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix. Assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *J. Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5):255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.
- Watnick P.L., Fullner K.J., Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999; 181(11): 606–9.
- Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *J. Trends Microbiol.* 2009; 17(3):109–18. DOI: 10.1016/j.tim.2008.12.004.

## References

- Osin A.V., Nefedov K.S., Eroshenko G.A., Smirnova N.I. [Comparative analysis of El Tor cholera vibrios, isolated before and in different periods of the seventh cholera pandemic]. *Genetika*. 2005; 41:53–62.
- Smirnova N.I., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [Genetic characteristics of clinical *Vibrio cholerae* strains, imported into the territory of the Russian Federation in different periods of the 7<sup>th</sup> cholera pandemic]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 3:3–10.
- Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Goryaev A.A., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [*Vibrio cholerae* genome evolution: ways of atypical strains formation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 3(97):5–11.
- Hanne L.F., Finkelstein R.A. Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Immun.* 1982; 36(1):209–14.
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanism of persistence of *Vibrio cholerae*. *Frontiers Microbiol.* 2013; 4(00375):1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.
- Marsh J.W., Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J. Bacteriol.* 1999; 181(4):1110–7.
- Marsh J.W., Sun D., Taylor R.K. Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the *mshG* coding sequence. *J. Infect. Immun.* 1996; 64(2):460–5.
- Nair G.B., Faruque L.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
- Schild S., Tamayo R., Nelson E.J., Qadri F., Calderwood S.B., Camilli A. Genes induced late in infection increase fitness of *Vibrio cholerae* after release into the environment. *Cell. Host. Microbe.* 2007; 2(4):64–77. DOI: 10.1016/j.chom.2007.09.004.
- Sealfon R., Gire S., Ellis C., Calderwood S., Qadri F., Hensley L., Kellis M., Ryan E.T., LaRocque R.C., Harris J.B., Sabeti P.C. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and Dominican Republic. *BMC Genomics.* 2012; 13:468. DOI: 10.1186/1471-2164-13-468.
- Teschler J.K., Zamorano-Sanchez D., Utada A.S., Warner C.J., Wong G.C., Wong R.G., Linington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix. Assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *J. Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5):255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.
- Watnick P.L., Fullner K.J., Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999; 181(11): 606–9.
- Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *J. Trends Microbiol.* 2009; 17(3):109–18. DOI: 10.1016/j.tim.2008.12.004.

## Authors:

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

## Об авторах:

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

Поступила 06.10.16.