

А.Б.Мазрухо, Е.В.Монахова, О.В.Дуванова, Б.Н.Мишанькин, В.Д.Кругликов

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕРМИНИРОВАННОСТИ ТВИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

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

Холерные вибрионы различных серогрупп изучены на наличие гена *cef* (CHO cell elongating factor) и активности по отношению к твинам и трибутирину с использованием ХДС-агара, приготовленного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей. Установлено, что все *cef*-позитивные штаммы гидролизуют твины 20, 40, 60, 80, 85 и все, кроме токсигенных *V. cholerae* O139, расщепляют трибутирин. Нетоксигенные *cef*-негативные штаммы O139 серогруппы, напротив, активны только по отношению к последнему. По-видимому, твиназная активность холерных вибрионов, отчасти, обусловлена Cef, а способность к гидролизу трибутирина – результат совокупного действия Cef и других ферментов. Показана эффективность применения ХДС-агара для определения данных признаков.

*Ключевые слова:* холерный вибрион, твиназа, CHO cell elongating factor.

A.B.Mazrukho, E.V.Monakhova, O.V.Duvanova, B.N.Mishan'kin, V.D.Kruglikov

### Analysis of Genetic Determination of *Vibrio cholerae* Tweenase Activity

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

Studied are *Vibrio cholerae* of different serogroups on the presence of *cef* (CHO cell elongating factor) gene and activity against tweens and tributyrin using HDS-agar, prepared on the basis of bakery yeast pancreatic digest. Determined is the fact that all *cef*-positive strains hydrolyze tweens 20, 40, 60, 80, 85 and all but toxigenic *V. cholerae* O139, hydrolyze tributyrin. In contrast, non-toxicogenic *cef* negative strains of O139 serogroup, are active only against the latter. Apparently, the tweenase activity of *Vibrio cholerae* is provided, partly, by Cef, and the ability to hydrolyze tributyrin is the result of combined activity of Cef and other ferments. Shown is the efficiency of HDS-agar application to determine these characteristics.

*Key words:* *Vibrio cholerae*, tweenase, CHO cell elongating factor.

Холерные вибрионы обладают широким спектром ферментативной активности, обеспечивающей им конкурентоспособность и возможность адаптации к различным экологическим нишам. Субстратами для роста и размножения вибрионов могут служить разнообразные органические соединения, в т.ч. содержащие эфирные связи. К числу последних принадлежат твины (сложные моноэфиры многоатомных спиртов и жирных кислот, относящихся к классу неионогенных поверхностно-активных веществ), которые могут использоваться даже в качестве единственного источника углерода [3]. Установлено, что практически все холерные вибрионы в той или иной степени обладают способностью гидролизовать твины 20, 40, 60, 80 [3]. Исключение составляют полностью лишённые этой способности нетоксигенные водные штаммы O139 серогруппы [1]. Однако до настоящего времени исследования твиназной активности *Vibrio cholerae* проводились лишь по фенотипу вне связи с какими-либо генами, ответственными за ее проявление. В 2000 г. В.А. McCardell и соавт. был описан Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов. Помимо цитотонической активности по отношению к культурам клеток, давшей название этому фактору, он способен гидролизовать р-нитрофениловые эфиры жирных кислот с длиной цепи от 2 до 14 атомов углерода [6]. Ранее нами была показана и твиназная активность рекомбинантных белков Cef холерных ви-

брионов различных серогрупп, а также способность Cef представителей O1 и неO1/неO139 серогрупп (но не *V. cholerae* O139) к гидролизу трибутирина [4].

Цель работы состояла в детекции гена *cef* в ДНК холерных вибрионов различных серогрупп и сравнительном изучении их твиназной активности с использованием питательной среды на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей.

Объектами исследования служили 260 штаммов *V. cholerae* O1, 40 штаммов O139 и 40 штаммов неO1/неO139 серогрупп. ПЦР-детекцию гена *cef* проводили с помощью сконструированных нами праймеров [4]. В качестве субстратов использовали твины 20, 40, 60, 80, 85 и трибутирин, которые добавляли, как описано ранее [1, 4], к среде ХДС-агар следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,05 % (по аминному азоту); NaCl – 4,0 г; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 6,0 г; агар-агар микробиологический – 12,0 г; вода дистиллированная – до 1 л; pH готовой среды 7,8±0,2.

Биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей липаз и эстераз проводили с помощью пакета компьютерных программ Vector NTI 11 (www.informax.com).

Полученные результаты показали, что ген *cef* присутствовал в геномах всех штаммов, кроме включенных в исследование 22 нехолерогенных *V. cholerae* O139, выделенных из водных источни-

ков внешней среды.

В опытах с использованием в качестве основы ХДС-агара все *cef*-позитивные вибрионы, включая токсигенные клинические штаммы *V. cholerae* O139, гидролизovali твины 20, 40, 60, 80 и 85, тогда как ни один из водных *cef*-негативных штаммов O139 серогруппы не обладал твиназной активностью. Следует отметить, что на этой среде нам удалось выявить активность по отношению к твину 80 у токсигенных штаммов O139 серогруппы, которая ранее не наблюдалась при использовании других сред. По-видимому, некоторое несовпадение представленных в литературе данных о спектрах твиназной активности холерных вибрионов [1, 3] также связано с использованием разными авторами неодинаковых питательных сред и концентраций субстратов. Наши данные показали, что ХДС-агар является адекватной средой, позволяющей дифференцировать штаммы холерных вибрионов по этой активности. Что касается трибутирина, то все штаммы, включая водные *cef*-негативные *V. cholerae* O139, гидролизovali этот субстрат, однако у последних зоны просветления среды вокруг колоний были намного меньше, чем у остальных штаммов, содержащих ген *cef*. Поскольку трибутирин является субстратом, традиционно используемым для определения не только эстеразной, но и липазной активности [5, 7], эти результаты навели нас на мысль о том, что у *cef*-негативных штаммов гидролиз трибутирина осуществляется другой липазой(ами), а у *cef*-позитивных вибрионов O1 и неO1/неO139 серогрупп наблюдался эффект совокупного действия других липаз/эстераз и *Cef*. На обеих хромосомах *V. cholerae* *eltor* N16961 мы выявили 20 генов известных и предполагаемых липаз и эстераз и провели поиск в их продуктах консервативного пентапептида GX SXG, который входит в состав субстрат-связывающего домена липаз. Серин в его центре играет ключевую роль в связывании с субстратом [5]. Оказалось, что GX SXG присутствует в молекулах трех белков, гены которых локализованы на большой хромосоме – предполагаемой эстеразы/липазы YbfF (AAF95343.1) и двух протеин-глутамат-метилэстераз CheB (AAF95208.1 и AAF94558.1), а также четырех белков, гены которых локализованы на малой хромосоме – липазы, входящей в состав Hly-локуса (AAF96133.1), липазы семейства GD XG (AAF96394.1), «липазоподобного белка» (AAF96652.1) и обозначенного как предполагаемая липаза белка Cef (AAF96761.1). Анализ, проведенный нами с помощью программы AlignX, не выявил значительной гомологии между ними (кроме двух CheB, которые близки друг другу, но далеко не идентичны). Субстратная специфичность большинства липаз/эстераз (содержащих пентапептид GX SXG) холерных вибрионов не изучена, но мы не исключаем, что, по крайней мере, часть из них активна по отношению к трибутирину. В таком случае вполне понятна более слабая активность *cef*-негативных штаммов по сравнению с *cef*-позитивными, у которых она усилена присутствием *Cef*. С другой

стороны, с этих позиций не удается объяснить высокую активность по отношению к трибутирину токсигенных штаммов O139, поскольку продуцируемый ими *Cef* разлагает только твины, но не трибутирин [4]. Возможно, это связано с повышенным уровнем синтеза одной из других липаз/эстераз, одновременной экспрессией нескольких кодирующих их генов, либо с более активным транспортом продукта(ов) во внеклеточное пространство.

Таким образом, на основании полученных результатов с использованием «природной модели» – *cef*-негативных вибрионов O139 – можно с уверенностью заключить, что твиназная активность *V. cholerae*, отчасти, обусловлена продуктом гена *cef*. Однако, принимая во внимание принципиальные отличия в структуре геномов водных авирулентных холерных вибрионов O139 серогруппы от всех остальных представителей вида *V. cholerae* [2] и отсутствие в GenBank полной нуклеотидной последовательности таких штаммов, остается вероятность того, что у вибрионов O1, неO1/неO139 и токсигенных штаммов O139 серогруппы твиназной активностью обладают и другие вышеупомянутые ферменты. Для окончательного ответа на этот вопрос необходимы дальнейшие исследования, направленные на выявление генов других эстераз и липаз, определение их экспрессии и субстратной специфичности, а также получение делеционных мутантов, дефектных по гену *cef*, и сравнение их эстеразной активности с изогенными штаммами. Во избежание получения ложноотрицательных результатов при проведении таких исследований в качестве основы сред с твинами и трибутирином может быть рекомендован ХДС-агар, использование которого позволяет получать четкие и однозначные данные.

Широкое распространение гена *cef* среди клинических и водных штаммов различных серогрупп и достаточно высокий уровень его экспрессии позволяют полагать, что данный фактор может вносить свой вклад в выживаемость холерных вибрионов в открытых водоемах и сточных водах, которые в настоящее время значительно загрязнены органическими веществами. В этой связи представляет интерес и тот факт, что ген *cef* (VCA0863) локализован на малой хромосоме в непосредственной близости к гену транспортного белка длинноцепочечных жирных кислот (VCA0862), которые могут образоваться в результате расщепления различных субстратов за счет активности *Cef*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дуванова О.В., Шиманюк Н.Я., Мишанькин Б.Н. Способность расщеплять твин 20 как дифференциальный тест для вибрионов O139 серовара различного происхождения. Клини. и лаб. диагн. 2000; 5:48–9.
2. Ерошенко Г.А., Осин А.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов вирулентных и авирулентных штаммов *Vibrio cholerae* O139. Мол. генет. 2004; 2:11–16.
3. Кузьмиченко И.А., Грачева И.В., Плотников О.П. Деструктивная активность и рост холерного вибриона в присутствии твинов. Пробл. особо опасных инф. 2001; 1(81):101–5.
4. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Миронова А.В. и др. Клонирование гена

цитотонического фактора Cef (CHO-cell elongating factor) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli* и его экспрессия под контролем P<sub>BAD</sub>-промотора. Биотехнология. 2005; 5:12–8.

5. *Faustinella F., Smith L.C., Semenkovich C.F., Chan L.* Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase. Evidence that serine 132 is essential for enzyme catalysis. J. Biol. Chem. 1991; 15:9481–5.

6. *McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V.* Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. Microb. Pathogen. 2000; 29(1):1–8.

7. *Singh R., Gupta N., Goswami V.K., Gupta R.* A simple activity staining protocol for lipases and esterases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006; 70:679–82.

**References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)**

1. *Duvanova O.V., Shimanyuk N.Ya., Mishan'kin B.N.* [The ability to digest tween 20 as a differential test for vibrios of O139 serovar of different origin]. Klin. Lab. Diagnost. 2000; 5:48–9.

2. *Eroshenko G.A., Osin A.V., Shchelkanova E.Yu., Smirnova N.I.* [Comparative analysis of genomes of virulent and avirulent strains of *Vibrio*

*cholerae* O139]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2004; 2:11–6.

3. *Kuz'michenko I.A., Gracheva I.V., Plotnikov O.P.* [Destructive activity and growth of cholera vibrio in the presence of tweens]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2001; (81):101–5.

4. *Monakhova E.V., Lomov Yu.M., Pisanov R.V., Alekseeva L.P., Markina O.V., Mironova A.V. et al.* [Cloning of *Vibrio cholerae* CHO-cell elongating factor gene in *Escherichia coli* and its expression under the control of P<sub>BAD</sub>-promoter]. Biotechnologia. 2005; 5:12–8.

**Authors:**

*Mazrukho A.B., Monakhova E.V., Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Kruglikov V.D.* Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru

**Об авторах:**

*Мазрухо А.Б., Монахова Е.В., Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д.* Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 11.05.12.