

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-151-157

УДК 616.932:579.25

Н.Б. Челдышова, З.Л. Девдариани

Сравнительный анализ экспрессии основных генов вирулентности у различных штаммов *Vibrio cholerae* O1

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

Цель – сравнительное изучение экспрессии основных генов вирулентности у штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. **Материалы и методы.** В качестве модельных использовали природные токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара (J89, Пакистан, 1969 г.), типичного (M-887, Астрахань, 1970 г.) и генетически измененного (301, Таганрог, 2011 г.) штаммов биовара Эль Тор. Штаммы выращивали в оптимальных для продукции холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей условиях. Исследование роста штаммов проводили на бульоне LB при комнатной температуре с определением количества клеток на спектрофотометре Biowave DNA (Biochrome Ltd., Великобритания). Определение экспрессии генов осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. **Результаты и обсуждение.** Изучена экспрессия структурных (*ctxA*, *tcpA*) и регуляторных (*toxR*, *toxT*, *tcpP*, *tcpH*) генов вирулентности у штаммов холерного вибриона классического биовара, типичного и генетически измененного штаммов биовара Эль Тор. Выявлены значительные различия по времени и уровню максимальной экспрессии указанных генов у штаммов классического и Эль Тор биоваров. Установлено, что экспрессия генов *ctxA* и *toxR* у штамма геноварианта достигала своего максимума на 1–3 ч раньше других штаммов. При этом уровень экспрессии гена *ctxA* соответствовал уровню классического штамма. Максимальная экспрессия гена *toxR* у штамма геноварианта была выше, чем у типичного Эль Тор и классического штаммов, а также имела четкую обратную корреляцию с экспрессией гена *ctxA*. Экспрессия генов *tcpA*, *toxT* и *tcpH* у штамма классического биовара достигала максимума на 1–2 ч раньше, чем у штаммов биовара Эль Тор. Указанные различия следует учитывать при проведении научно-исследовательских работ, связанных с изучением экспрессии основных генов вирулентности.

Ключевые слова: холерный вибрион, геноварианты, экспрессия генов вирулентности.

Корреспондирующий автор: Челдышова Надежда Борисовна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Челдышова Н.Б., Девдариани З.Л. Сравнительный анализ экспрессии основных генов вирулентности у различных штаммов *Vibrio cholerae* O1. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:151–157. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-151-157

Поступила 23.12.2021. Отправлена на доработку 01.03.2022. Принята к публ. 22.03.2022.

N.B. Cheldyshova, Z.L. Devdariani

Comparative Analysis of Expression of the Main Virulence Genes in Various *Vibrio cholerae* O1 Strains

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

Abstract. The aim of the work was a comparative study of the expression of the main virulence genes in *Vibrio cholerae* strains of the classical biovar, typical and genetically modified strains of *V. cholerae*, El Tor biovar. **Materials and methods.** Natural toxigenic strains of *V. cholerae* O1, classical biovar (J89, Pakistan, 1969), typical (M-887, Astrakhan, 1970) and genetically modified (301, Taganrog, 2011) strains of the El Tor biovar were used as model ones. The strains were grown under optimum conditions for the production of cholera toxin and toxin-coregulated pili. The assessment of strain growth was carried out in LB broth at room temperature with determination of the cells number on a Biowave DNA spectrophotometer (Biochrome Ltd., UK). Determination of gene expression was performed using real-time PCR with reverse transcription. **Results and discussion.** The expression of structural (*ctxA*, *tcpA*) and regulatory (*toxR*, *toxT*, *tcpP*, *tcpH*) virulence genes has been investigated in *V. cholerae* strains of the classical biovar, typical and genetically modified strains of the El Tor biovar. Significant differences have been revealed in terms of time and level of maximum expression of these genes in strains of classical and El Tor biovars. It was found that *ctxA* and *toxR* genes expression in the genovariant strain reached its maximum 1–3 h earlier than in the other strains. At the same time, the level of *ctxA* gene expression corresponded to the level of the classical strain. The maximum expression of the *toxR* gene in the genovariant strain was higher than in typical El Tor and classical strains, and also had a clear inverse correlation with *ctxA* gene expression. Expression of the *tcpA*, *toxT*, and *tcpH* genes in the classical biovar strain reached its maximum 1–2 h earlier than in the El Tor biovar strains. These differences should be taken into account when conducting research work related to the study of the expression of the main virulence genes.

Key words: *Vibrio cholerae*, genovariants, expression of virulence genes.

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

Corresponding author: Nadezhda B. Cheldyshova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Cheldyshova N.B., Devdariani Z.L. Comparative Analysis of Expression of the Main Virulence Genes in Various *Vibrio cholerae* O1 Strains. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 3:151–157. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-151-157

Received 23.12.2021. Revised 01.03.2022. Accepted 22.03.2022.

Cheldyshova N.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>

Холерный вибрион, являющийся этиологическим агентом холеры, обладает рядом факторов вирулентности, основными из которых являются холерный токсин (ХТ), вызывающий профузную диарею, и токсин-корегулируемые пили адгезии (ТКПА), необходимые для колонизации вибрионами тонкого кишечника человека. ХТ кодируется генами оперона *ctxAB*, расположенного на профаге СТХφ. За синтез ТКПА отвечают гены кластера *tcpA-F*, расположенные на острове патогенности VPI-1 (от *Vibrio pathogenicity island*) [1, 2]. На том же острове располагаются и регуляторные гены (*tcpP*, *tcpH* и *toxT*), которые совместно с регуляторным геном *toxR*, а также генами оперона *ctxAB* и кластера генов *tcpA-F* входят в генную сеть вирулентности холерного вибриона [3, 4]. Регуляция генов вирулентности у холерного вибриона происходит по каскадному типу. Непосредственным активатором транскрипции генов *ctxA* и *tcpA* является белок ToxT, кодируемый одноименным геном. Экспрессия гена *toxT* регулируется двумя трансмембранными белками, продуктами генов *toxR* и *tcpP*. Активация белков ToxR и TcpP происходит под влиянием белков ToxS и TcpH соответственно [5–7]. Гены *toxRS* экспрессируются конституативно, в то время как экспрессия генов оперона *tcpPH* стимулируется продуктами генов *aphA* и *aphB* [8]. На активность белков ToxR и TcpP также оказывают влияние различные факторы внешней среды [8, 9]. Следует отметить, что регуляция генов ХТ и ТКПА у штаммов *Vibrio cholerae* классического и Эль Тор биоваров несколько отличается. В первую очередь это касается белка ToxR, который у классических штаммов может регулировать экспрессию генов оперона *ctxAB* как опосредованно через белок ToxT, так и непосредственно, в то время как у штаммов вибриона Эль Тор для активации данных генов обязательно требуется белок ToxT [9]. Кроме того, между биоварами существуют различия и в активации транскрипции оперона *tcpPH* белком AphB, вызванные различиями в промоторной области оперона у штаммов двух биоваров [10].

Локализация основных генов вирулентности холерного вибриона на мобильных генетических элементах способствует его постоянной изменчивости. Так, первые шесть пандемий холеры (с 1817 по 1923 год) были вызваны штаммами *V. cholerae* классического биовара; возбудителем седьмой пандемии, начавшейся в 1961 г., стал биовар Эль Тор, штаммы которого приобрели основные гены вирулентности. В 90-х гг. прошлого столетия произошло сразу два значительных события. Во-первых, генетическая структура вибрионов Эль Тор претерпела серьезные изменения, способствовавшие появлению новых генетически измененных штаммов (геновариантов) с повышенной вирулентностью. Во-вторых, появился новый возбудитель холеры, *V. cholerae* O139-серогруппы, который вызвал эпидемии холеры в Индии и Бангладеш, а впоследствии распространился на другие азиатские страны. Высказывалось

даже предположение, что появление штаммов O139-серогруппы станет началом восьмой пандемии холеры [11]. Однако эти опасения не оправдались, и на сегодняшний день геноварианты практически полностью вытеснили других возбудителей холеры [2, 12, 13].

Геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор обладают рядом генетических особенностей, отличающих их от типичных штаммов. Одним из основных отличий генетически измененных штаммов является замена в их геноме профага СТХφ^{Eltor} на СТХφ^{Class}, несущий ген В-субъединицы ХТ классического типа (*ctxB1* вместо *ctxB3*), СТХφ гибридного типа (*ctxB1*, *rstR^{Eltor}*) или СТХφ с геном *ctxB7* [12, 14]. Продукция ХТ геновариантами значительно выше, чем у типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, и приближается к таковой у классических штаммов [15]. Другой особенностью геновариантов, доминирующих в настоящее время, является наличие однонуклеотидной синонимичной замены (A/G в положении 266 п.н. от начала гена) в гене *tcpA*, кодирующем синтез основной субъединицы ТКПА. Новый аллель *tcpA* был обозначен как *tcpAET^{CIRS}* [16]. Изменения коснулись и островов пандемичности VSP-I и VSP-II, которые утратили ряд генов [16, 17]. Эти и другие изменения в структуре генома геновариантов привели к повышению их вирулентности и эпидемического потенциала по сравнению с типичными вибрионами Эль Тор. В настоящее время геноварианты являются основным возбудителем холеры, которые с 2011 по 2020 год вызвали свыше 4,4 млн случаев холеры в различных странах мира [14]. Однако если исследования экспрессии генов вирулентности у классических и типичных вибрионов Эль Тор ранее уже проводились [18–21], то экспрессия генов вирулентности у генетически измененных штаммов изучена еще недостаточно. В частности, до сих пор нет точных данных о времени максимальной экспрессии основных генов вирулентности у различных штаммов холерного вибриона. В связи с этим целью данного исследования явилось сравнительное изучение экспрессии основных структурных и регуляторных генов вирулентности у штаммов *V. cholerae* классического биовара, типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Материалы и методы

Исследование бактериальных штаммов, условий культивирования проводилось на природных токсигенных штаммах *V. cholerae* O1: одном штамме классического биовара (J89 (СТХφ^{Class}), Пакистан, 1969 г., источник выделения неизвестен) и двух штаммах *V. cholerae* биовара Эль Тор: типичном (M-887 (СТХφ^{Eltor}), Астрахань, 1970 г., выделен от больного) и генетически измененном (301 (СТХφ гибридного типа), Таганрог, 2011 г., выделен из внешней среды). Для выделения РНК штаммы выращивали в оптимальных для продукции ХТ и ТКПА условиях: клас-

сический штамм и геновариант биовара Эль Тор – на бульоне LB (рН 6,8) при температуре 30 °С с аэрацией, типичный Эль Тор – на бульоне АК1, рН 7,6, при температуре 37 °С [19].

Исследование ростовых свойств штаммов осуществляли на бульоне LB при комнатной температуре с определением количества клеток через 2, 3, 4 и 5 ч культивации при помощи сканирующей спектрофотометрии на приборе Biowave DNA (Biochrome Ltd., Великобритания).

Выделение РНК вели набором Promega Total RNA Isolation System (Promega, США) по протоколу производителя. Качественную и количественную оценку выделенной РНК осуществляли при помощи сканирующей спектрофотометрии на приборе Biowave DNA (Biochrome Ltd., Великобритания).

Обратная транскрипция проводилась набором реактивов «Реверта» («АмплиСенс», Россия) по соответствующему протоколу.

ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием амплификатора Rotor-Gene Q

(QIAGEN, Германия), как описано ранее [22]. Ген «домашнего хозяйства» *recA*, экспрессия которого отличается постоянством и не зависит от условий внешней среды, использован как ген-нормализатор. Праймеры и зонды приведены в табл. 1.

Нормализацию и обсчет результатов вели при помощи программного обеспечения Rotor-Gene 1.8.17.5, методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [24]. Для статистической обработки данных использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Как известно, максимальная экспрессия генов наблюдается в логарифмической фазе роста, которая у холерных вибрионов наступает примерно через 2–3 ч от начала культивирования и продолжается около 7–9 ч [25]. В то же время в протоколах к наборам для выделения РНК рекомендуется брать на исследование штаммы, подрощенные на соот-

Таблица 1 / Table 1

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованных для определения относительной экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae*

Nucleotide sequences of primers and probes used to determine the relative expression of structural and regulatory *V. cholerae* genes

Праймеры и зонды Primers and probes	Нуклеотидная последовательность 5' – 3' The nucleotide sequence 5' – 3'	Авторы Authors
recAel-F recAel-R recAel-probe	ACGGGTAACCTCAAGCAATC TATCCAAACGAACAGAAGCG (FAM)–CCACTGGCGGTAACGCACTGA-(BHQ1)	[22]
ctxA-F ctxA-R ctxA-probe	TGCCAAGAGGACAGAGTGAG ATCCATCATCGTGCCTAACA (FAM)–TCCCGTCTGAGTTCCTCTTGCAATG-(BHQ1)	
recAcl-RT1 recAcl-RT2 recAcl-probe	5'-CGCTTCTGTTTCGTTTGGATA-3' 5'-TGATACGGGTTTCGTTACCA-3' (FAM)–CGCCTTCTTTGATTGCGCCA-(BHQ1)	Рассчитаны авторами Calculated by the authors
tcpAel-F tcpAel-R tcpAel-probe	CGCTGAGACCACCCATA GAAGAAGTTTGTAAGAAGAACACG (FAM)–AGAAAACCGTCAAGAGGGT-(BHQ1)	
tcpAcl-RT1 tcpAcl-RT2 tcpAcl-probe	5'-TTCGACAGAATATGACCAAGG-3' 5'-TACTAGCAGCTGTCGATCA-3' (FAM)–TTGCACTGACACAGACATACCGTGG-(BHQ1)	[23]
toxR-F toxR-R toxR-probe	CGGAACCGTTTTGACGTATT CTCGCAATGATTTGCATGAC (FAM)–TTAACCCAAGCCATTTGAC-(BHQ1)	
toxT-F toxT-R toxT-probe	TGATGATCTTGATGCTATGG GACTGATATGCAATCTGTT (FAM)–GCGTAATTGGCGTTGGGCAGAT-(BHQ1)	
tcpPel-RT1 tcpPel-RT2 tcpPel-probe	5'-ACCTTTGGTGGAATGAATGC-3' 5'-GGGCAAGGATGATATTCACAGA-3' (FAM)–TGCACAAGATCCAATGAAGCCAGA-(BHQ1)	Рассчитаны авторами Calculated by the authors
tcpPcl-RT2 tcpPcl-probe tcpHcl-RT1	5'-CGGCTTCATTGGATCTTGT-3' (FAM)–CCCGATAACCTTTGGTGGAACGA-(BHQ1) 5'-ATCCAATGTTTGGCTTACCC-3'	
tcpHel-RT1 tcpHel-RT2 tcpHel-probe	5'-TGTAACGATCATCGCACTCC-3' 5'-GGTCTGGGTAAGCCAAACAT-3' (FAM)–CATCAATAATCATGTGCCGTGCG-(BHQ1)	
tcpHcl-RT1 tcpHcl-RT2 tcpHcl-probe	5'-ATCCAATGTTTGGCTTACCC-3' 5'-CATTGTAATCACGGCTCACAT-3' (FAM)–CATTGCCAGATCCTAGCTCTCAGAAGC-(BHQ1)	

ветствующих средах в течение 2–3 ч, когда штаммы еще не успели достигнуть максимума экспрессии, что часто приводит к ошибкам в определении реального уровня экспрессии генов. В связи с этим перед исследованием экспрессии генов вирулентности у различных токсигенных штаммов *V. cholerae* мы определили их ростовые свойства. Установлено, что у типичного штамма Эль Тор экспоненциальное увеличение численности клеток наблюдалось уже к 2 ч культивации. У штамма геноварианта и штамма классического биовара логарифмическая фаза роста наблюдалась позже, между 4 и 5 ч культивации соответственно.

Таким образом, штаммы классического биовара и геноварианта вступали в логарифмическую фазу роста позже типичных вибрионов Эль Тор.

Учитывая полученные данные, выделение РНК производилось нами через 3, 4, 5 и 6 ч после культивации штаммов в оптимальных для экспрессии указанных генов условиях, описанных ранее. Выделение РНК на более ранних сроках было невозможно, так как штаммы не достигали необходимого по протоколу количества клеток.

На первом этапе работы мы исследовали экспрессию двух структурных генов вирулентности: гена *ctxA*, ответственного за синтез А субъединицы ХТ и обуславливающего его токсическую функцию, а также гена *tcpA*, кодирующего основную субъединицу ТКПА.

Исследование экспрессии гена *ctxA* у штаммов классического, типичного и генетически измененного штаммов биовара Эль Тор показало значительные различия по времени и максимальному уровню. Так, у классического штамма (J-89) экспрессия гена *ctxA* начиналась с 5 относительных единиц (о.е.) и увеличивалась скачкообразно, образуя плато между 4 и 5 ч и достигая максимума (23,17 о.е.) к 6 ч культивации (рис. 1, А, красный график). У штаммов биовара Эль Тор экспрессия гена *ctxA* начиналась с более низкого уровня (1 о.е.). Однако если у типичного штамма (М-887) она увеличивалась в геометрической прогрессии, достигая максимума (8,12 о.е.) к 6 ч культивации (рис. 1, А, синий график), то у штамма геноварианта (301) кривая экспрессии резко поднималась вверх между 4 и 5 ч, практически достигая уровня классического штамма (22,5 о.е.), и снижалась к 6 ч культивации (рис. 1, А, зеленый график).

Экспрессия гена *tcpA* у типичного и генетически измененного штаммов биовара Эль Тор практически не отличалась (рис. 1, В, синий и зеленый графики). Начальные уровни экспрессии составляли около 1 о.е., максимальная экспрессия наблюдалась в 6 ч культивации и составляла $(4,5 \pm 0,2)$ о.е. В отличие от них, для классического штамма были характерны более высокие значения экспрессии как в начале культивации (около 3 о.е.), так и на максимуме, который наблюдался на 1 ч раньше, чем у штаммов биовара Эль Тор, и составил 5 о.е. (рис. 1, В, красный график).

Таким образом, экспрессия структурных генов вирулентности холерного вибриона у штаммов классического и Эль Тор биоваров значительно отличалась. В то же время между типичным штаммом биовара Эль Тор и геновариантом различия наблюдались лишь по экспрессии гена *ctxA*. Уровень максимальной экспрессии гена *ctxA* у классического штамма и штамма геноварианта был примерно в 2,8 раза выше, чем у типичного штамма Эль Тор. Вероятно, подобное усиление экспрессии гена *ctxA* у геновариантов по сравнению с типичными штаммами Эль Тор связано с заменой у них профага СТХФ^{ElTor} на СТХФ гибридного типа. Экспрессия гена *tcpA* у типичного и измененного штаммов биовара Эль Тор практически не отличалась. Следует также отметить, что у классического штамма уровень максимальной экспрессии гена *tcpA* хоть и был незначительно выше такового у штаммов Эль Тор, но наблюдался на 1 ч раньше.

Различия в экспрессии структурных генов вирулентности у штаммов классического и Эль Тор вибрионов могут быть связаны и с экспрессией регуляторных генов *toxR*, *toxT*, *tcpP* и *tcpH*, контролирующих по каскадному типу транскрипцию генов вирулентности *ctxA* и *tcpA*. В связи с этим на втором

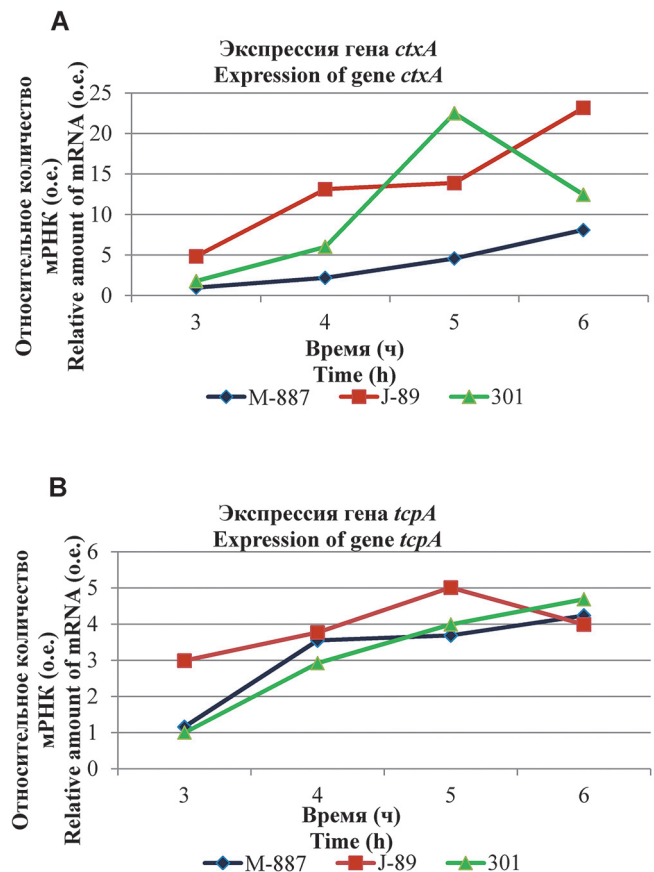


Рис. 1. Экспрессия структурных генов вирулентности *ctxA* (А) и *tcpA* (В) у штаммов *V. cholerae* классического (J-89, красный график) и Эль Тор биоваров (типичный штамм – М-887, синий график; геновариант – 301, зеленый график)

Fig. 1. Expression of structural virulence genes *ctxA* (A) and *tcpA* (B) genes in *V. cholerae* strains of classical (J-89, red curve) and El Tor biovars (typical strain – M-887, blue curve; genovariant – 301, green curve)

этапе работы мы исследовали экспрессию указанных регуляторных генов.

Оказалось, что экспрессия гена *toxR* у штамма классического биовара *V. cholerae* была достаточно низкой (1–1,3 о.е.) на всем протяжении исследований (рис. 2, А, красный график), что согласуется с данными других авторов [18], согласно которым указанный ген не имеет существенного значения для экспрессии структурных генов вирулентности. В то же время экспрессия этого гена у типичного штамма Эль Тор, начавшись на том же уровне, что и у классического штамма, резко выростала к 4 ч, достигая максимума (1,95 о.е.), а затем снова снижалась до 1,5 о.е. (рис. 2, А, синий график). Особенно высокой (в 1,3–1,9 раза выше, чем у типичного и классического штаммов, соответственно) оказалась экспрессия гена *toxR* у штамма геноварианта (рис. 2, А, зеленый график). Она обратно коррелировала с экспрессией гена *ctxA*. В 3 ч, когда экспрессия гена *ctxA* была минимальной, уровень экспрессии гена *toxR* у штамма 301 был максимально высоким и составил около 2,5 о.е., однако с 4 до 5 ч, когда транскрипция гена *ctxA* повышалась, экспрессия гена *toxR* снижалась до уровня типичного штамма, показав новый рост к 6 ч культивации, когда уровень транскрипции гена *ctxA* резко снижался. Косвенно это может говорить об авторегуляции гена *toxR*, которая, видимо, наиболее четко прослеживается у штамма геноварианта. Однако данное предположение требует проведения более детального исследования.

Экспрессия гена *toxT* у классического штамма, в отличие от гена *toxR*, была, наоборот, достаточно высокой (5,5 о.е.) уже с 3 ч культивации, достигая максимума (12,7 о.е.) к 5 ч (рис. 2, В, красный график). У типичного штамма М-887 и штамма геноварианта 301 уровень максимальной экспрессии гена *toxT* был в 1,5–2,4 раза ниже соответственно, чем у классических штаммов, и достигал своего максимума только к 6 ч культивации (см. рис. 2, В, синий и зеленый графики).

Экспрессия генов *tcpP* и *tcpH* у геноварианта и типичного штамма Эль Тор практически не различалась и была в 2–2,5 раза ниже, чем у штамма классического биовара (рис. 2, С, D). Максимальная экспрессия гена *tcpP* у всех трех штаммов отмечалась уже к 3 ч культивации (рис. 2, С). Уровень максимальной экспрессии гена *tcpH* наблюдался позже: к 4 ч у классического штамма и к 6 ч у штаммов биовара Эль Тор (рис. 2, D).

Таким образом, уровень экспрессии генов *toxT*, *tcpP* и *tcpH* у штаммов биовара Эль Тор был значительно ниже, чем у классического штамма, что согласуется с сообщениями других исследователей [18–20]. Это свидетельствует о ведущей роли указанных генов в регуляции экспрессии генов *ctxA* и *tcpA*, а следовательно, и в продукции ХТ и ТКПА у штамма классического биовара.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что максимальная экспрессия большинства генов вирулентности у штаммов классического и Эль Тор

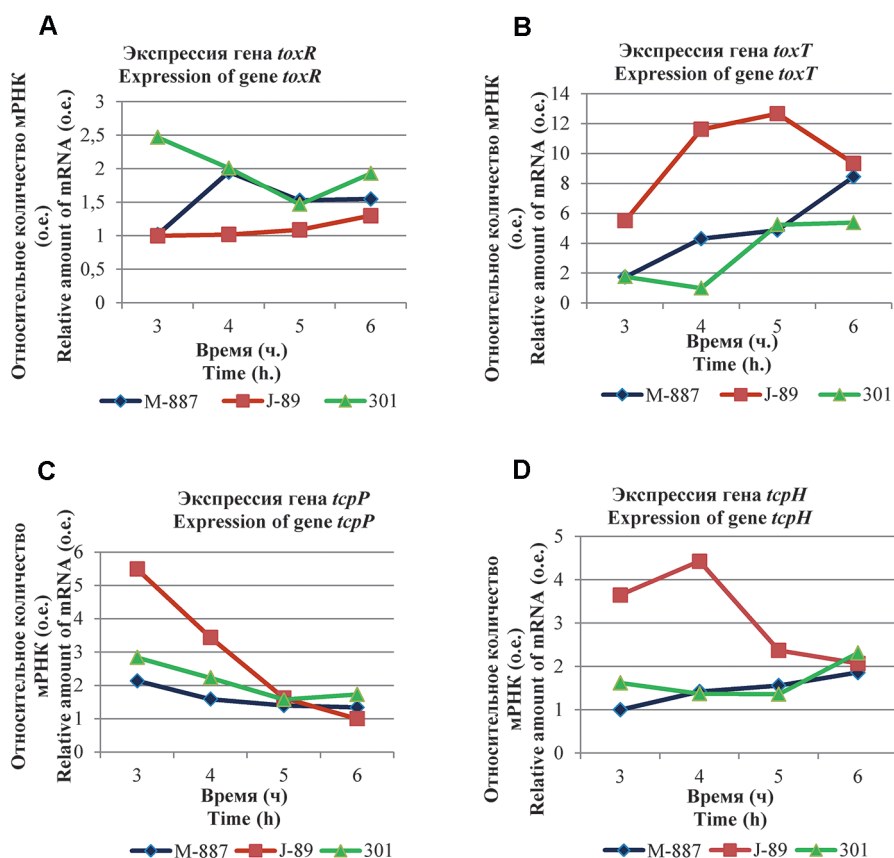


Рис. 2. Экспрессия регуляторных генов *toxR* (A), *toxT* (B), *tcpP* (C) и *tcpH* (D) у штаммов *V. cholerae* классического (J-89) и Эль Тор биоваров (типичный штамм – М-887, геновариант – 301)

Fig. 2. Expression of regulatory genes *toxR* (A), *toxT* (B), *tcpP* (C) and *tcpH* (D) in *V. cholerae* strains of classical (J-89) and El Tor biovars (typical strain – M-887, genovariant – 301)

Таблица 2 / Table 2

Время максимальной экспрессии генов вирулентности у штаммов *V. cholerae*
 The time of maximum expression of virulence genes in strains of *V. cholerae*

Штамм <i>V. cholerae</i> <i>V. cholerae</i> strain	Биовар Biovar	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	<i>toxR</i>	<i>toxT</i>	<i>tcpP</i>	<i>tcpH</i>
J-89	Классический Classical	6*	5	6	5	3	4
M-887	Эль Тор типичный El Tor typical	6	6	4	6	3	6
301	Эль Тор геновариант El Tor genovariant	5	6	3	6	3	6

Примечание: * – время, ч

Note: * – time, h

биоваров наблюдалась в разное время (табл. 2). Так, экспрессия генов *ctxA* и *toxR* у штамма геноварианта достигала своего максимума на 1–3 ч раньше других штаммов. Наибольшая экспрессия генов *tcpA*, *toxT* и *tcpH* у штамма классического биовара наблюдалась на 1–2 ч раньше, чем у штаммов биовара Эль Тор. При этом время достижения наибольшего уровня экспрессии этих генов у вибрионов Эль Тор совпадало. Лишь у гена *tcpP* максимальный уровень экспрессии фиксировался в 3 ч культивации у всех трех штаммов.

Следует отметить, что уровень экспрессии гена *ctxA*, ответственного за синтез холерного токсина, у штамма геноварианта был значительно выше, чем у типичного штамма Эль Тор, приближаясь по данной характеристике к штамму классического биовара, что в совокупности с более ранним достижением максимальной экспрессии этого гена свидетельствует о повышенной вирулентности штамма геноварианта. Указанные особенности, несомненно, связаны с приобретением геновариантами профага СТХФ гибридного типа, однако большое влияние на данный процесс, вероятно, оказало и повышение экспрессии регуляторного гена *toxR*, максимальная экспрессия которого наблюдалась уже к 3 ч культивации и была несколько выше остальных штаммов. О влиянии гена *toxR* на повышение экспрессии гена *ctxA* указывает и наличие статистически значимой обратной корреляции в экспрессии указанных генов ($p < 0,01$). В то же время экспрессия генов *tcpA*, *tcpP* и *tcpH* у штамма геноварианта была на уровне типичных штаммов, а гена *toxT* – даже ниже этого уровня. Все это указывает на то, что ведущая роль в регуляции структурных генов вирулентности *ctxA* и *tcpA* у штамма геноварианта принадлежит гену *toxR*.

В целом полученные результаты говорят о значительных отличиях в уровне и времени максимальной экспрессии генов вирулентности у различных эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* O1, что следует учитывать при проведении научно-исследовательских работ, связанных с изучением экспрессии основных генов вирулентности.

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

Список литературы

- Karaolis D.K., Somara S., Maneval D.R. Jr., Johnson J.A., Kapur J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*. 1999; 399(6734):375–9. DOI: 10.1038/20715.
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителей холеры. *Генетика*. 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.
- Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007; 75(12):5542–9. DOI: 10.1128/IAI.01094-07.
- Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Щелканова Е.Ю., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Влияние делеции профага СТХФ возбудителя холеры на экспрессию регуляторных генов, контролирующих вирулентность и образование биопленки. *Генетика*. 2017; 53(3):284–97. DOI: 10.7868/S0016675817020114.
- DiRita V.J., Parsot C., Jander G., Mekalanos J.J. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1991; 88(12):5403–7. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5403.
- Hase C.C., Mekalanos J.J. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(2):730–4. DOI: 10.1073/pnas.95.2.730.
- Krukoni E.S., Yu R.R., Dirita V.J. The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/TcpX virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol. Microbiol.* 2000; 38(1):67–84. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02111.x.
- Li N., Zheng Y., Shi M., Xue Y., Zhang T., Ji S., Yang M. TcpP L152A constitutively activating virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Curr. Microbiol.* 2019; 76(5):583–9. DOI: 10.1007/s00284-019-01659-y.
- Hung D.T., Mekalanos J.J. Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(8):3028–33. DOI: 10.1073/pnas.0409559102.
- Kovacikova G., Skorupski K. Differential activation of the *tcpPH* promoter by AphB determines biotype specificity of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(11):3228–38. DOI: 10.1128/JB.182.11.3228-3238.2000.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
- Nair G.B., Faruque S.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., Sultana J., Dac Cam P., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(6):987–8. DOI: 10.3201/eid1406.080129.
- Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Левченко Д.А., Янович Е.Г., Водолянов А.С., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И., Подойницына О.А. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
- Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., Asakura M., Yamasaki S., Nair G.B., Takeda Y. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.

16. Grim C.J., Choi J., Chun J., Jeon Y.-S., Taviani E., Hasan N.A., Haley B., Huq A., Colwell R.R. Occurrence of the *Vibrio cholerae* seventh pandemic VSP-I island and a new variant. *OMICS*. 2010; 14(1):1–7. DOI: 10.1089/omi.2009.0087.
17. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(11):4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.
18. Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., Yildiz F.H. Differences in gene expression between the classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3633–42. DOI: 10.1128/IAI.01750-05.
19. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P.M. Differential expression of the *ToxR* regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype – specific over *toxT* expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996; 93(15):7991–5. DOI: 10.1128/IAI.01750-05.
20. Lee S.H., Hava D.L., Waldor M.K., Camilli A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell*. 1999; 99(6):625–34. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81551-2.
21. Murley Y.M., Behari J., Griffin R., Calderwood S.B. Classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* differ in timing of transcription of *tcpPH* during growth in inducing conditions. *Infect. Immun.* 2000; 68(5):3010–4. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3010-3014.2000.
22. Крицкий А.А., Чельдышова Н.Б., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Разработка алгоритма определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *Vibrio cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 3:53–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-53-57.
23. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5):1457–66. DOI: 10.1128/AEM.01635-06.
24. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
25. Адамов А.К., Наумшина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во Саратовского университета; 1984. 328 с.
- gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(11):3228–38. DOI: 10.1128/JB.182.11.3228-3238.2000.
11. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
12. Nair G.B., Faruque S.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.
13. Safa A., Sultana J., Dac Cam P., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(6):987–8. DOI: 10.3201/eid1406.080129.
14. Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Monakhova E.V., Levchenko D.A., Yanovich E.G., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Nepomnyashchaya N.B., Ezhova M.I., Podoinitsyna O.A. [Characteristics of the epidemiological situation on cholera in the world and in the Russian Federation in 2020 and forecast for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (1):43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
15. Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., Asakura M., Yamasaki S., Nair G.B., Takeda Y. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.
16. Grim C.J., Choi J., Chun J., Jeon Y.-S., Taviani E., Hasan N.A., Haley B., Huq A., Colwell R.R. Occurrence of the *Vibrio cholerae* seventh pandemic VSP-I island and a new variant. *OMICS*. 2010; 14(1):1–7. DOI: 10.1089/omi.2009.0087.
17. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(11):4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.
18. Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., Yildiz F.H. Differences in gene expression between the classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3633–42. DOI: 10.1128/IAI.01750-05.
19. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P.M. Differential expression of the *ToxR* regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype – specific over *toxT* expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996; 93(15):7991–5. DOI: 10.1128/IAI.01750-05.
20. Lee S.H., Hava D.L., Waldor M.K., Camilli A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell*. 1999; 99(6):625–34. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81551-2.
21. Murley Y.M., Behari J., Griffin R., Calderwood S.B. Classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* differ in timing of transcription of *tcpPH* during growth in inducing conditions. *Infect. Immun.* 2000; 68(5):3010–4. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3010-3014.2000.
22. Kritsky A.A., Cheldyshova N.B., Tuchkov I.V., Smirnova N.I. [Development of the algorithm for identification of the level of *Vibrio cholerae ctxA* and *toxR* gene expression using RT-PCR with real-time hybridization-fluorescent registration of results]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:53–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-53-57.
23. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5):1457–66. DOI: 10.1128/AEM.01635-06.
24. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
25. Adamov A.K., Naumshina M.S. [Cholera Vibrios]. Saratov: Publishing House of the Saratov University; 1984. 328 p.

References

1. Karaolis D.K., Somara S., Maneval D.R. Jr., Johnson J.A., Kaper J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*. 1999; 399(6734):375–9. DOI: 10.1038/20715.
2. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Agafonov D.A., Shashkova A.V., Cheldyshova N.B., Cherkasov A.V. [Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements of natural strains of cholera pathogens]. *Genetika [Genetics]*. 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.
3. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007; 75(12):5542–9. DOI: 10.1128/IAI.01094-07.
4. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan'T.A., Shchelkanova E.Yu., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Kutuyev V.V. [Effect of deletion of the CTXφ prophage of the cholera causative agent on the expression of regulatory genes that control virulence and biofilm formation]. *Genetika [Genetics]*. 2017; 53(3):284–97. DOI: 10.7868/S0016675817020114.
5. DiRita V.J., Parsot C., Jander G., Mekalanos J.J. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1991; 88(12):5403–7. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5403.
6. Hase C.C., Mekalanos J.J. *TcpP* protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(2):730–4. DOI: 10.1073/pnas.95.2.730.
7. Krukons E.S., Yu R.R., DiRita V.J. The *Vibrio cholerae* *ToxR*/*TcpP*/*ToxT* virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol. Microbiol.* 2000; 38(1):67–84. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02111.x.
8. Li N., Zheng Y., Shi M., Xue Y., Zhang T., Ji S., Yang M. *TcpP* L152A constitutively activating virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Curr. Microbiol.* 2019; 76(5):583–9. DOI: 10.1007/s00284-019-01659-y.
9. Hung D.T., Mekalanos J.J. Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a *ToxT*-independent manner. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(8):3028–33. DOI: 10.1073/pnas.0409559102.
10. Kovacicova G., Skorupski K. Differential activation of the *tcpPH* promoter by *AphB* determines biotype specificity of virulence

Authors:

Cheldyshova N.B., Devdariani Z.L. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Чельдышова Н.Б., Девдариани З.Л. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.