

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-255>

Сравнительный анализ структуры и экспрессии регуляторного гена *vasH* системы секреции 6-го типа токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae*

Заднова С.П.[✉], Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Крицкий А.А.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Цель работы — сравнительный анализ структуры регуляторного гена *vasH* системы секреции 6-го типа и его экспрессии в токсигенных и нетоксигенных штаммах *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара.

Материалы и методы. В работе использовали 35 штаммов, выделенных от больных и из внешней среды с 1970 по 2017 г. на территории России и Украины. Анализ структуры гена *vasH* и аминокислотной последовательности белка проводили с применением программ UGENE 1.32, MEGA X, BioEdit v. 7.0.9.0. Относительный уровень экспрессии *vasH* изучали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Результаты. Установлено, что у токсигенных типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor биовара (генотип *ctxA+tcpA+*) структура гена *vasH* и аминокислотная последовательность белка *VasH* идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара. У изолятов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA* (*ctxA-tcpA-*), последовательность *vasH* является вариативной, у *ctxA-tcpA+* (за исключением одного штамма) — не отличается от референсного. Изученные токсигенные типичные штаммы и геноварианты имеют схожий относительный уровень экспрессии гена *vasH*. У изолятов, не содержащих гены *ctxA* и *tcpA*, экспрессия данного гена сопоставима с токсигенными, а у *ctxA-tcpA+* штаммов в среднем в 3,1 раза выше, чем у *ctxA-tcpA-*, и в 2,14–2,60 раза больше, чем у токсигенных.

Заключение. На модели токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, изолированных в разные периоды текущей пандемии холеры на территории России и Украины, подтверждены данные зарубежных исследователей о наличии интактного гена *vasH* у токсигенных и вариативного у изолятов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA*. В то же время показано, что у 99% изученных *ctxA-tcpA+* штаммов структура *vasH* идентична токсигенным. Экспрессия гена *vasH* обнаружена у всех изученных штаммов, при этом наибольшей она была у *ctxA-tcpA+*. Выявлено всего два нетоксигенных штамма, предположительно синтезирующих функционально неактивный белок *VasH*.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, система секреции 6-го типа, структура и экспрессия регуляторного гена *vasH*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 16 от 21.02.2022).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Заднова С.П., Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Крицкий А.А. Сравнительный анализ структуры и экспрессии регуляторного гена *vasH* системы секреции 6-го типа токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022;99(6):682–691.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-255>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-255>

Comparative analysis of the structure and expression of the *vasH* regulatory gene of type VI secretion system in toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains

Svetlana P. Zadnova[✉], Nikita A. Plekhanov, Alina Yu. Spirina, Andrey A. Kritskiy

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia

Abstract

Objective. The comparative analysis of the structure of the regulatory gene *vasH* of the type VI secretion system and its expression in toxigenic and non-toxigenic *V. cholerae* O1, biovar El Tor strains.

Materials and methods. We used 35 strains isolated from patients and from the environmental samples in the territory of Russia and Ukraine between 1970 and 2017. Analysis of the structure of the *vasH* gene and the amino acid sequence of the protein was carried out using Ugene 1.32, Mega X, and Bioedit v. 7.0.9.0. The relative level of *vasH* expression was studied by $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Results. The structure of the *vasH* gene and the amino acid sequence of VasH protein in toxigenic typical strains and genovariants of *V. cholerae* O1, El Tor biovar (genotype *ctxA+tcpA+*) have been shown to be identical to the reference *V. cholerae* n16961 O1, El Tor biovar strain. The *vasH* sequence is variable in isolates lacking *ctxA* and *tcpA* genes (*ctxA-tcpA-*), and does not differ from the reference in *ctxA-tcpA+* (with the exception of one strain). The studied toxigenic typical strains and the genovariants have a similar relative level of expression of the *vasH* gene. In isolates that do not contain the *ctxA* and *tcpA* genes, the expression of this gene is comparable to toxigenic strains, and is 3.1 times higher in *ctxA-tcpA+* strains than that of *ctxA-tcpA-* and 2.14–2.6 times higher than that of toxigenic ones.

Conclusion. The analysis of toxigenic and non-toxigenic *V. cholerae* O1, biovar El Tor strains isolated in Russia and Ukraine in different periods of the current cholera pandemic confirmed the data of foreign researchers on *vasH* gene being intact in toxigenic isolates and variable in isolates lacking *ctxA* and *tcpA* genes. Meanwhile, the structure of *vasH* gene has been shown to be identical to that of toxigenic ones in 99% of the studied *ctxA-tcpA+* strains. The expression of the *vasH* gene has been detected in all studied strains, being the highest in *ctxA-tcpA+* strains. Only two non-toxigenic strains presumably synthesizing the functionally inactive VasH protein have been identified.

Keywords: *Vibrio cholerae*, type VI secretion system, structure and expression of *vasH* regulatory gene

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (protocol No. 16, February 21, 2022).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Kritskiy A.A. Comparative analysis of the structure and expression of the *vasH* regulatory gene of type VI secretion system in toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(6):682–691.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-255>

Введение

Возбудителями холеры — особо опасной инфекционной болезни с диарейным синдромом — являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae*, содержащие гены *ctxAB* и *tcpA-F*, кодирующие основные факторы патогенности: соответственно, холерный токсин, вызывающий развитие профузной диареи, и токсин-корегулируемые пили адгезии, необходимые для первого этапа инфекционного процесса — прикрепления вибрионов к эпителиоцитам кишечника [1]. С 1961 г. продолжается седьмая пандемия холеры, вызванная типичными токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара. Постоянно происходящие эволюционные преобразования El Tor вибрионов привели к появлению в 1990-х гг. генетически изменённых штаммов (геновариантов) *V. cholerae* O1 El Tor биовара с повышенной вирулентностью [2]. Геноварианты быстро вытеснили на эндемичной территории типичные штаммы и явились причиной ряда крупных вспышек холеры в разных странах [3–5]. Типичные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара неоднократно завозились и на территорию России, а с 1993 г. все единичные случаи и вспышки холеры были вызваны геновариантами [6, 7].

Механизмы быстрого распространения геновариантов и замещения типичных штаммов до конца не установлены. В ряде работ показано, что геноварианты не только являются гипервирулентными, но и способны быстро адаптироваться при смене среды обитания [8–10]. Как известно, важная роль в повышении вирулентных и адаптационных свойств холерного вибриона принадлежит недавно обнаруженной системе секреции 6-го типа (Т6SS, от англ. Type 6 secretion system) [11]. Т6SS представляет собой контактзависимую макромолекулярную структуру, напоминающую шприц, с помощью которой грамотрицательные бактерии, включая *V. cholerae*, транслоцируют внутрь соседних клеток-мишеней токсичные белки-эффекторы. Холерный вибрион использует Т6SS для уничтожения прокариотических и эукариотических клеток: бактерий разных видов, макрофагов, фагоцитирующих амёб, инфузорий, нематод. Активная экспрессия белков-эффекторов повышает выживаемость *V. cholerae* как *in vivo*, так и *in vitro* и даёт ему возможность эффективно конкурировать с бактериями, составляющими микробиом кишечника человека, а также с постоянными обитателями открытых водоёмов при его нахождении в составе биоплёнки во внешней среде [12, 13].

Первые сведения о T6SS *V. cholerae* получены при изучении штамма V52 O37 серогруппы, у которого данная система активна в лабораторных условиях [11]. В дальнейшем была исследована структура и функция генов T6SS у некоторых типичных токсигенных штаммов (N16961, C6706, A1552) *V. cholerae* O1 El Tor биовара, холерных вибрионов O139 серогруппы, ряда нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара и вибрионов nonO1/nonO139 серогруппы. В то же время функционирование T6SS у геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor биовара изучено на единичных модельных штаммах [13–21].

Согласно данным литературы, гены, кодирующие белки T6SS *V. cholerae*, входят в состав одного большого и нескольких дополнительных (Aux-1, Aux-2, Aux-3, Aux-4, Aux-5) кластеров, расположенных на первой и второй хромосомах *V. cholerae* [11, 15, 19, 21]. При этом токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп содержат одинаковый набор — большой кластер и три дополнительных (Aux-1, Aux-2, Aux-3). У нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара и штаммов nonO1/nonO139 серогруппы состав и структура генов T6SS являются переменными [19, 22].

На большом кластере находятся гены, кодирующие структурные компоненты T6SS системы, а также ген *vasH* (VCA0117), ответственный за биосинтез регуляторного белка VasH, который непосредственно контролирует транскрипцию генов, кодирующих эффекторные белки, расположенные на дополнительных кластерах [11, 23]. В штаммах *V. cholerae*, лишённых гена *vasH*, T6SS является неактивной [23, 24]. Учитывая важную роль белка VasH в функционировании T6SS, целью нашей работы состояла в проведении сравнительного анализа структуры регуляторного гена *vasH* системы секреции 6-го типа и его экспрессии в токсигенных и нетоксигенных штаммах *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара.

Материалы и методы

Штаммы бактерий

В работе использовали 35 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара: токсигенные типичные и геноварианты, содержащие гены *ctxA* и *tcpA* (генотип *ctxA+tcpA+*); нетоксигенные, не имеющие ген *ctxA*, но включающие ген *tcpA* (*ctxA-tcpA+*), и нетоксигенные, лишённые гена *tcpA* (*ctxA-tcpA-*). Штаммы выделены от больных и из внешней среды с 1970 по 2017 г. на территории России и Украины. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Российского научно-исследовательского противочумного

института «Микроб» (протокол № 16 от 21.02.2022). Штаммы хранились в лиофильно высушенном состоянии в «Государственной коллекции патогенных бактерий» (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Для работы бактерии выращивали на пластинах LB агара при 37°C в течение 18–24 ч.

Анализ структуры гена *vasH* и аминокислотной последовательности белка *VasH*

Изучение структуры регуляторного гена *vasH* проводили путём сравнения нуклеотидных последовательностей полных геномов исследуемых штаммов, представленных в NCBI GenBank, с последовательностью референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 серогруппы El Tor биовара с использованием программ «UGENE v. 1.32» и «MEGA X» («Megasoftware»). Аминокислотную последовательность белка VasH устанавливали с применением freeware-программы «BioEdit v. 7.0.9.0» («BioEdit»).

Изучение экспрессии гена *vasH*

Для изучения экспрессии гена *vasH* штаммы выращивали 4 ч с аэрацией в LB-бульоне при 37°C. Относительный уровень экспрессии гена *vasH* определяли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени [25]. Для выделения тотальной РНК применяли набор «SV Promega Total RNA Isolation System» («Promega»), для синтеза кДНК на матрице РНК — набор реагентов «Реверта-Л» («АмплиСенс»). Для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени с интеркалирующим красителем использовали комплект реагентов «Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix» («Thermo Fisher Scientific») согласно инструкции производителя. Нормализацию полученных данных осуществляли относительно гена домашнего хозяйства *recA* (VC0543). Последовательности олигонуклеотидных праймеров к гену *recA* рассчитаны ранее [26], к гену *vasH* взяты из литературных источников [23]. В качестве штамма-калибратора, значение экспрессии целевого гена *vasH* которого было принято за единицу, был произвольно выбран штамм *V. cholerae* M818. Эксперимент проводили в 3 повторах.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных экспериментальных данных осуществляли при помощи программ «Microsoft Excel» (стандартный пакет программ «Microsoft Office 2010») и «Statistica 6.0» («Statsoft») путём вычисления среднего арифметического, стандартной ошибки среднего арифметического и доверительного интервала. Достоверность различия между средними величинами оценивали при помощи критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Изучение структуры гена *vasH*

На первом этапе работы было проведено сравнительное исследование нуклеотидной последовательности гена *vasH* у токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара. Произвольно были выбраны 5 типичных штаммов (M1062, M888, M893, 818, M1011) и 13 геновариантов (M1270, M1275, M1293, P17644, M1327, M1344, M1429, RND18826, P-18899, L3226, 89, M1509, 3265/80), выделенных, соответственно, в 1970–1972 и 1993–2014 гг. В результате анализа установлено, что у всех взятых в исследование токсигенных штаммов структура гена *vasH* идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара (таблица).

Далее были изучены нетоксигенные штаммы *V. cholerae*, изолированные с 1981 по 2017 г. от больных, а также из открытых водоёмов при проведении мониторинговых исследований на холеру. Нетоксигенные штаммы включали две группы: изоляты первой содержали ген *tcpA*, кодирующий токсин-корегулируемые пили адгезии (*ctxA-tcpA+*), у второй данный ген отсутствовал (*ctxA-tcpA-*). Наличие и структура мобильных элементов с генами патогенности и эпидемичности в данных штаммах изучена

ранее [27]. При анализе нетоксигенных штаммов установлено, что клинические и водные *ctxA-tcpA+* изоляты, как и токсигенные штаммы, имели интактный ген *vasH*. Исключение составил штамм *V. cholerae* 866 (Ялта, 1996), у которого в начале гена в позиции 55 был делегирован нуклеотид (С) (таблица). У штаммов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA*, структура гена *vasH* была вариабельной, выявлено 6–18 единичных нуклеотидных замен. Несмотря на присутствие значительного количества однонуклеотидных полиморфизмов, они в большинстве были синонимичными. Несинонимичные замены выявлены у 4 штаммов (M1332, 433, 132, M1526). У штамма *V. cholerae* M1337 (Астрахань, 2000), кроме однонуклеотидных полиморфизмов, в позиции 1341–1352 обнаружена делеция 12 нуклеотидов (таблица).

Аминокислотная последовательность белка *VasH*

Согласно данным литературы, белок *VasH* включает 530 аминокислот и функционально разделён на три участка: N-терминальный регуляторный (1–187), воспринимающий сигналы внешней среды; центральный (193–414) и С-терминальный (485–525) с ДНК-связывающим НТН (496–512) доменом.

Структура и относительный уровень экспрессии гена *vasH* в штаммах *V. cholerae* O1 El Tor биовара
Structure and relative level of expression of the *vasH* gene in strains of *V. cholerae* O1 El Tor biovar

№ No.	Штамм <i>V. cholerae</i> <i>V. cholerae</i> strain	Место; год; источник выделения штамма The site, year and source of isolation strains	Структура гена <i>vasH</i> * <i>vasH</i> * gene structure	Относительный уровень экспрессии гена <i>vasH</i> Relative level of <i>vasH</i> gene expression
Токсигенные типичные штаммы Toxigenic typical strains				
1.	M1062 ^{SSAB01}	Россия, Астрахань; 1970; человек Russia, Astrakhan; 1970; patient	инт int	0,23 ± 0,015
2.	M888 ^{LRBH01}			0,4 ± 0,02
3.	M893 ^{SSAA01}			0,05 ± 0,001
4.	M818 ^{LAHM01}	Россия, Балаково; 1970; человек Russia, Balakovo; 1970; patient	инт int	1,0**
5.	M1011 ^{SSAC01}	Россия, Уфа; 1972; человек Russia, Ufa; 1972; patient	инт int	Не определяли Not identified
Токсигенные генетически изменённые штаммы Toxigenic altered strains				
6.	M1270 ^{VXCC01}	Россия, Набережные Челны; 1993; человек Russia, Naberezhnye Chelny; 1993; patient	инт int	0,51 ± 0,02
7.	M1275 ^{LRAF01}	Россия, Дагестан; 1993; человек Russia, Dagestan; 1993; patient	инт int	0,40 ± 0,025
8.	M1293 ^{JFFW01}	Россия, Дагестан; 1994; человек Russia, Dagestan; 1994; patient	инт int	0,14 ± 0,015
9.	R17644 ^{JRTW01}	Россия, Ачинск; 1997; человек Russia, Achinsk; 1997; patient	инт int	1,0 ± 0,04
10.	M1327 ^{LRFE01}	Россия, Дагестан; 1998; человек Russia, Dagestan; 1998; patient	инт int	0,63 ± 0,01
11.	M1344 ^{NEDY01}	Россия, Казань; 2001; человек Russia, Kazan; 2001; patient	инт int	0,34 ± 0,015
12.	M1429 ^{LAEM01}	Россия, Белорецк; 2004; человек Russia, Beloretsk; 2004; patient	инт int	0,29 ± 0,025

Окончание таблицы | End of the Table

№ No.	Штамм <i>V. cholerae</i> <i>V. cholerae</i> strain	Место; год; источник выделения штамма The site, year and source of isolation strains	Структура гена <i>vasH</i> * <i>vasH</i> * gene structure	Относительный уровень экспрессии гена <i>vasH</i> Relative level of <i>vasH</i> gene expression
13.	RND18826 ^{AYOM01}	Россия, Тверь; 2005; человек Russia, Tver; 2005; patient	ИНТ int	0,72 ± 0,015
14.	P-18899 ^{LAKM01}	Россия, Мурманск; 2006; человек Russia, Murmansk; 2006; patient	ИНТ int	1,09 ± 0,035
15.	L3226 ^{DVX01}	Россия, Москва; 2010; человек Russia, Moscow; 2010; patient	ИНТ int	0,07 ± 0,001
16.	89 ^{NDXR01}	Украина, Ялта; 2010; внешняя среда Ukraine, Yalta; 2010; environmental sample	ИНТ int	0,16 ± 0,015
17.	M1509 ^{NEDZ01}	Россия, Москва; 2012; человек Russia, Moscow; 2012; patient	ИНТ int	0,49 ± 0,02
18.	3265/80 ^{JRQL01}	Россия, Москва; 2014; человек Russia, Moscow; 2014; patient	ИНТ int	0,6 ± 0,03
Нетоксигенные <i>ctxA</i>–<i>tcpA</i>+ штаммы Non-toxigenic <i>ctxA</i>–<i>tcpA</i>+ strains				
19.	M1395 ^{LQBY01}	Россия, Астрахань; 1981; внешняя среда Russia, Astrakhan; 1981; environmental sample	ИНТ	2,13 ± 0,085
20.	56 ^{MWRD01}	Украина, Мариуполь; 1995; внешняя среда Ukraine, Mariupol; 1995; environmental sample	ИНТ int	0,88 ± 0,06
21.	866 ^{MWRF01}	Украина, Ялта; 1996; внешняя среда Ukraine, Yalta; 1996; environmental sample	ΔC55	0,77 ± 0,005
22.	85 ^{NEDU01}	Украина, Бердянск; 1999; человек Ukraine, Berdyansk; 1999; patient	ИНТ int	0,30 ± 0,01
23.	P18778 ^{NIF01}	Россия, Ростов; 2005; человек Russia, Rostov; 2005; patient	ИНТ int	1,72 ± 0,03
24.	M1501 ^{LRAE01}	Россия, Элиста; 2011; человек Russia, Elista; 2011; patient	ИНТ int	1,75 ± 0,045
25.	M1518 ^{LQZR01}	Россия, Элиста; 2012; внешняя среда Russia, Elista; 2012; environmental sample	ИНТ int	0,64 ± 0,025
26.	M1524 ^{LQZS01}	Россия, Элиста; 2013; внешняя среда Russia, Elista; 2013; environmental sample	ИНТ int	Не определяли Not identified
27.	2613 ^{PYCA01}	Россия, Элиста; 2015; внешняя среда Russia, Elista; 2015; environmental sample	ИНТ int	0,50 ± 0,03
28.	124 ^{PYCD01}	Россия, Элиста; 2017; человек Russia, Elista; 2017; patient	ИНТ int	0,93 ± 0,01
Штаммы, не имеющие гены <i>ctxA</i> и <i>tcpA</i> Strains lacking <i>ctxA</i> and <i>tcpA</i> genes				
29.	M1332 ^{PYCE01}	Россия, Челябинск; 2000; человек Russia, Chelyabinsk; 2000; patient	3/18	0,50 ± 0,005
30.	M1337 ^{NEEB01}	Россия, Астрахань; 2000; человек Russia, Astrakhan; 2000; patient	0/8; Δ1341-1352	0,71 ± 0,045
31.	P-18748 ^{NIFH01}	Россия, Сочи; 2004; человек Russia, Sochi; 2004; patient	0/13	0,24 ± 0,005
32.	M1526 ^{VUAA01}	Россия, Элиста; 2012; внешняя среда Russia, Elista; 2012; environmental sample	1/6	0,21 ± 0,025
33.	132 ^{VUAC01}	Россия, Элиста; 2013; внешняя среда Russia, Elista; 2013; environmental sample	1/9	0,36 ± 0,035
34.	433 ^{NEDW01}	Россия, Сочи; 2015; внешняя среда Russia, Sochi; 2015; environmental sample	3/18	Не определяли Not identified
35.	3178 ^{PYCH01}	Россия, Элиста; 2017; внешняя среда Russia, Elista; 2017; environmental sample	0/8	0,07 ± 0,001

Примечание. В надстрочном индексе штаммов указан сокращённый код доступа в GenBank; инт — нуклеотидная последовательность идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара; * — цифры через черту (/) показывают количество несинонимичных замен/общее количество замен; ** — штамм-калибратор.

Note. In the superscript, the GenBank accession number is specified; int — nucleotide sequence is identical to the reference strain of *V. cholerae* N16961 O1, biovar El Tor; * — numbers separated with a slash (/) show the ratio of non-synonymous substitutions to total number of substitutions; ** — calibrator strain.

Белок VasH активен только при взаимодействии с альтернативной σ^{54} субъединицей (белок RpoN), связывание с которой происходит в центральном домене, где расположены Walker A (220–229) и Walker B (286–296) мотивы. Мутанты с делетированными НТН или Walker доменами синтезируют функционально неактивный белок VasH [11, 23, 24].

Изучение последовательности аминокислот в VasH белке у взятых в анализ штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара показало, что у всех токсигенных изолятов она идентична референс-штамму (таблица). У нетоксигенных *ctxA–tcpA+* штаммов, за исключением *V. cholerae* 866, последовательность аминокислот в VasH также была идентична референсному. Делеция одного нуклеотида в начале гена в штамме 866 привела к изменению всей аминокислотной последовательности белка (рисунок). Вполне вероятно, что синтезируемый данным штаммом белок-регулятор VasH будет функционально неактивным.

У штаммов P-18748 и 3178, имеющих только синонимичные замены, аминокислотная последо-

вательность VasH белка идентична референсному. В штамме M1337 в результате делеции большого участка гена значительно изменена карбоксильная область белка, затронувшая и НТН домен (рисунок). Подобные изменения приводят к биосинтезу белка, не способного взаимодействовать с генами-мишенями [23].

Несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы в штаммах *V. cholerae* M1526, 132, M1332 и 433 вызвали замены аминокислот в различных участках белковой молекулы VasH. В штамме M1526 в регуляторной аминотерминальной области вместо аспарагиновой кислоты включён гистидин (H116D). У штамма *V. cholerae* 132 в линкерной области между Walker A и Walker B доменами выявлен лизин (A267L). В штаммах M1332 и 433 в начале регуляторного N участка присутствует изолейцин (I14V), а не валин, как у референсного, а в линкерной области между σ^{54} -связывающим и НТН доменами произошла смена аминокислот S447P и V449A. Однако, по данным литературы, указанные замены не влияют на функциональные свойства белка VasH [23].

		10	20	30	40	50
ref		MSQWLAFATQ	LVGVRKSHQL	ALQFVDLLTQ	GLDLSDSL	LLLPSSDGRLLV
132		MSQWLAFATQ	LVGVRKSHQL	ALQFVDLLTQ	GLDLSDSL	LLLPSSDGRLLV
P-18748		MSQWLAFATQ	LVGVRKSHQL	ALQFVDLLTQ	GLDLSDSL	LLLPSSDGRLLV
866		MSQWLAFATQ	LVGVRKSHSL	RCNLLIC*LK	A*I*VIAFCC	CHRRMGVYLC
M1337		MSQWLAFATQ	LVGVRKSHQL	ALQFVDLLTQ	GLDLSDSL	LLLPSSDGRLLV
		260	270	280	290	300
ref		AAIPEHLLES	ELFGYCKGAF	SGADSDKQGL	IAQANGGTLF	LDEIGDMPLT
132		AAIPEHLLES	ELFGYCKGAF	SGADSDKQGL	IAQANGGTLF	LDEIGDMPLT
P-18748		AAIPEHLLES	ELFGYCKGAF	SGADSDKQGL	IAQANGGTLF	LDEIGDMPLT
866		RRSLSIYWKV	NCLVTAKGHF	LERTAINRDL	SHKRMVARYF	WMRSAICRSP
M1337		AAIPEHLLES	ELFGYCKGAF	SGADSDKQGL	IAQANGGTLF	LDEIGDMPLT
		410	420	430	440	450
ref		LKQYDFPGNV	RELKHLIEFG	CAQTADGTQV	EASCFAHRLQ	TLPCLAPEAT
132		LKQYDFPGNV	RELKHLIEFG	CAQTADGTQV	EASCFAHRLQ	TLPCLAPEAT
P-18748		LKQYDFPGNV	RELKHLIEFG	CAQTADGTQV	EASCFAHRLQ	TLPCLAPEAT
866		LSSTTSREMC	VS*NI*LSLA	ARKQRMVRRW	KLVALPIVYK	PYPVLRLLKRR
M1337		LKQYDFPGNV	RELKHLIEFG	CAQTADGTQV	EASCFAHRLQ	TLPCLAPVAV
		460	470	480	490	500
ref		PVAVSVETEN	VDLEPSVALA	GEPNFAVIHD	LKQAVSQFEA	LIISERLNRF
132		PVAVSVETEN	VDLEPSVALA	GEPNFAVIHD	LKQAVSQFEA	LIISERLNRF
P-18748		PVAVSVETEN	VDLEPSVALA	GEPNFAVIHD	LKQAVSQFEA	LIISERLNRF
866		R*PFLSKLRT	WILNPRRLWL	ENRILRLSMI	*NRRSVSLKR	*SSVSV*TAL
M1337		SVETENVLDLE	PSVALAGEPN	FAVIHDLKQA	VSQFEALIIS	ERLNRFAGDR
		510	520	530		
ref		AGDRAKAAS	LGIPKRTLAY	KCLKLEIKTP	*	
132		AGDRAKAAS	LGIPKRTLAY	KCLKLEIKTP	*	
P-18748		AGDRAKAAS	LGIPKRTLAY	KCLKLEIKTP	*	
866		LAIARKRRKV	SVLSVPWPT	SA*NWRSKPH	.	
M1337		AKAAKSLGIP	KRTLAYKCLK	LEIKTP*	...	

Фрагменты аминокислотной последовательности белка VasH некоторых штаммов *V. cholerae*.
 ref — референс-штамм *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара. Жирным шрифтом выделены изменённые участки.
 Fragments of the amino acid sequence of VasH protein of some *Vibrio cholerae* strains.
 ref — reference strain *V. cholerae* N16961 O1, El Tor biovar. Altered regions are highlighted in bold.

Уровень экспрессии гена *vasH*

Заключительный этап работы был посвящён определению у взятых в анализ штаммов относительного уровня экспрессии гена *vasH*. В результате значительные отличия между типичными штаммами *V. cholerae* O1 El Tor биовара и геновариантами по экспрессии данного гена не выявлены. У типичных штаммов среднее значение относительного уровня экспрессии гена *vasH* составило 0,42, у геновариантов — 0,5 (таблица). У изолятов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA*, экспрессия *vasH* также была невысокой (среднее значение 0,35). В то же время выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) различие в уровне экспрессии *vasH* у штаммов с генотипом *ctxA-tcpA+*. Они отличались повышенным уровнем экспрессии данного гена (среднее значение 1,07). Среди штаммов данной группы выявлены три (M1395, P18778, M1501), которые имели наиболее высокий уровень экспрессии гена *vasH* по сравнению с другими взятыми в работу штаммами (выделены жирным шрифтом в таблице).

Обсуждение

В ранее проведённой работе при сравнительном протеомном масс-спектрометрическом сканировании бактериальных лизатов клеток типичного штамма *V. cholerae* M1062 O1 El Tor биовара и геноварианта M1509, выращенных в LB-бульоне при 37°C, у последнего было обнаружено присутствие 2 белков T6SS [28]. Отсутствие биосинтеза белков T6SS в лабораторных условиях у типичного токсигенного штамма согласуется с данными литературы. У указанных штаммов T6SS активна только *in vivo* или при культивировании в определённых условиях — повышенная осмолярность среды с содержанием 300 мМ NaCl, сниженная до 26°C температура [17]. Обнаружение экспрессии белков T6SS у геноварианта позволило высказать предположение, что у данных штаммов изменился механизм регуляции T6SS и она стала активной при культивировании штаммов в лабораторных условиях. Проверку данной гипотезы мы начали с изучения структуры и экспрессии глобального регуляторного гена *vasH*. В результате установлено, что у всех изученных типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor биовара нуклеотидная последовательность гена *vasH* идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor биовара. Отличия между ними по экспрессии указанного гена также не выявлены (таблица). Видимо, указанные штаммы различаются по экспрессии других генов T6SS, но для проверки данного предположения необходимы дальнейшие исследования.

Кроме завезённых токсигенных штаммов, в работе были использованы штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара, не имеющие гены *ctxA* и *tcpA* (таб-

лица). Важность исследования данных штаммов заключается в том, что при попадании в организм человека они не способны вызвать холеру, но могут быть причиной острых кишечных инфекций. Нетоксигенные штаммы ежегодно выделяются из водных объектов нашей страны при мониторинговых исследованиях. При этом механизмы их длительного сохранения во внешней среде до конца не изучены. Из литературных источников известно, что водные штаммы *V. cholerae* являются гетерогенной группой по составу и структуре генов T6SS [19, 22], которые активно экспрессируются в данных штаммах, что повышает их выживаемость во внешней среде [16, 29].

Проведённые нами исследования показали, что вариabельным ген *vasH* был только у штаммов, не содержащих гены *ctxA* и *tcpA*; 90% взятых в анализ *ctxA-tcpA+* штаммов, подобно токсигенным, имели интактную последовательность гена *vasH* (таблица). При изучении экспрессии гена *vasH* с использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени выявлено, что относительный уровень экспрессии данного гена у *ctxA-tcpA+* штаммов в среднем в 3,1 раза выше, чем у изолятов, не имеющих гены *ctxA* и *tcpA*, а также в 2,6 и 2,14 раза больше, соответственно, чем у типичных штаммов и геновариантов. Именно среди *ctxA-tcpA+* штаммов выявлены 3 изолята (M1395, P18778, M1501), экспрессия *vasH* у которых была наибольшей (таблица). Для установления причины повышенной экспрессии *vasH* в *ctxA-tcpA+* штаммах нами был проведён анализ структуры гена *rpoS* (VC0534), кодирующего биосинтез σ^{54} -РНК полимеразы, необходимой для активации транскрипции *vasH* [23, 24]. Однако полученные сведения не позволили решить указанную проблему (данные не приводятся). Возможно, увеличение транскрипции *vasH* у *ctxA-tcpA+* штаммов может быть обусловлено изменениями в экспрессии гена *rpoS* или структуре и экспрессии негативных регуляторов *luxO* (VC1021) и *tsrA* (VC0070), блокирующих транскрипцию *vasH* [13, 15]. Планируется продолжение данных исследований.

Заключение

При сравнительном анализе токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, изолированных на территории России и Украины с 1970 по 2017 г., подтверждены данные зарубежных исследователей о наличии интактного гена *vasH* у токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара и вариabельного у штаммов, не содержащих гены *ctxA* и *tcpA*. В то же время в данной работе показано, что изученные нетоксигенные *ctxA-tcpA+* изоляты, как и токсигенные штаммы, имеют интактный ген *vasH*. Транскрипционная активность гена *vasH* выявлена у всех взятых в анализ штаммов, а наибольший уровень экспрессии данного гена отмечен

у *ctxA-ctxA*+ штаммов. Необходимо отметить, что среди изученных 35 штаммов обнаружено только два нетоксигенных изолята (866, M1337 — 5,7%), предположительно синтезирующих функционально неактивный белок VasH, что ещё раз указывает на важную роль данного регулятора в биологии *V. cholerae*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1): 48–89. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>.
2. 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
3. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(1): 33–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012928>
4. Bundi M., Shah M.M., Odoyo E., Kathiiko C., Wandera E., Miring'u G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017. *Microbiol. Immunol.* 2019; 63(9): 350–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12731>
5. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019; 565(7738): 230–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
6. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Варибельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2011; 26(3): 11–8.
7. Миронова Л.В., Балаханов С.В., Урбанович Л.Я., Половинкина В.С., Кожевникова А.С., Куликалова Е.С. и др. Обнаружение «гибридных» штаммов *Vibrio cholerae* eltor при эпидемических осложнениях в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2011; 88(5): 12–8.
8. Заднова С.П., Кульшань Т.А., Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ выживаемости типичных штаммов и геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор *in vitro* и *in vivo*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; (4): 65–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-65-69>
9. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
10. Satchell K.J.F., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9): 2473–81. <https://doi.org/10.1128/IAI.00189-16>
11. Pukatzki S., Ma A.T., Sturtevant D., Krastins B., Sarracino D., Nelson W.C., et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103(5): 1528–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
12. Ma A.T., McAuley S., Pukatzki S., Mekalanos J.J. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell. Host. Microbe.* 2009; 5(3): 234–43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.02.005>
13. Joshi A., Kostiuk B., Rogers A., Teschler J., Pukatzki S., Yildiz F.H. Rules of engagement: the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *Trends. Microbiol.* 2017; 25(4): 267–79. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.003>
14. Монахова Е.В., Божко Н.В. Изучение экспрессии контакт-зависимых систем секреции холерными вибрионами на модели *Dictyostelium discoideum*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2010; 87(4): 89–92.
15. Zheng J., Shin O.S., Cameron D.E., Mekalanos J.J. Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(49): 21128–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014998107>
16. Miyata S.T., Kitaoka M., Wieteska L., Frech C., Chen N., Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front. Microbiol.* 2010; 1: 117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00117>
17. Ishikawa T., Sabharwal D., Bröms J., Milton D.L., Sjöstedt A., Uhlin B.E., et al. Pathoadaptive conditional regulation of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Infect. Immun.* 2012; 80(2): 575–84. <https://doi.org/10.1128/IAI.05510-11>
18. Miyata S.T., Unterweger D., Rudko S.P., Pukatzki S. Dual expression profile of type VI secretion system immunity genes protects pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003752. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003752>
19. Unterweger D., Miyata S.T., Bachmann V., Brooks T.M., Mullins T., Kostiuk B., et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat. Commun.* 2014; 5: 3549. <https://doi.org/10.1038/ncomms4549>
20. Townsley L., Mangus M.P.S., Mehic S., Yildiz F.H. Response of *Vibrio cholerae* to low temperature shifts: CspV regulation of type VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(14): 4441–52. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00807-16>.
21. Crisan C.V., Chande A.T., Williams K., Raghuram V., Rishishwar L., Steinbach G., et al. Analysis of *Vibrio cholerae* genomes identifies new type VI secretion system gene clusters. *Gen. Biol.* 2019; 20(1): 163. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1765-5>
22. Santoriello F.J., Michel L., Unterweger D., Pukatzki S. Pandemic *Vibrio cholerae* shuts down site-specific recombination to retain an interbacterial defence mechanism. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 6246. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20012-7>
23. Kitaoka M., Miyata S.T., Brooks T.M., Unterweger D., Pukatzki S. VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(23): 6471–82. <https://doi.org/10.1128/JB.05414-11>
24. Seibt H., Aung K.M., Ishikawa T., Sjöström A., Gullberg M., Atkinson G.C., et al. Elevated levels of VCA0117 (VasH) in response to external signals activate the type VI secretion system of *Vibrio cholerae* O1 El Tor A1552. *Environ. Microbiol.* 2020; 22(10): 4409–23. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15141>
25. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *METHODS.* 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
26. Крицкий А.А., Челдышова 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. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-53-57>
27. Смирнова Н.И., Агафонова Е.Ю., Щелканова Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф. и др. Геномное

- разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 36(2): 76–84. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84>
28. Заднова С.П., Баданин Д.В., Плеханов Н.А., Полунина Т.А., Котова Н.В., Крицкий А.А. и др. Сравнительные протеомные профили типичного штамма и генетически измененного варианта *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 150–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-150-153>
 29. Bernardy E.E., Turnsek M.A., Wilson S.K., Tarr C.L., Hammer B.K. Diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* in natural transformation and contact-dependent bacterial killing indicative of type VI secretion system activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(9): 2833–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.00351-16>
- REFERENCES
1. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1): 48–89. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>
 2. 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
 3. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(1): 33–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012928>
 4. Bundi M., Shah M.M., Odoyo E., Kathiiko C., Wandera E., Miring'u G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017. *Microbiol. Immunol.* 2019; 63(9): 350–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12731>
 5. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature*. 2019; 565(7738): 230–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
 6. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutuyev V.V. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2011; 26(3): 102–10. <https://doi.org/10.3103/S0891416811030062>
 7. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Polovinkina V.S., Kozhevnikova A.S., Kulikalova E.S., et al. Detection of "hybrid" *Vibrio cholerae* El Tor strains during epidemic complications in Siberia and Far East. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; 88(5): 12–8. (in Russian)
 8. Zadnova S.P., Kul'shan' T.A., Cheldyshova N.B., Kritskiy A.A., Plekhanov N.A., Smirnova N.I. Comparative analysis of survival capacity among typical and genovariant strains of *Vibrio cholerae*, biovar El Tor in vivo and in vitro. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; (4): 65–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-65-69> (in Russian)
 9. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11): 3739–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11>
 10. Satchell K.J.F., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9): 2473–81. <https://doi.org/10.1128/IAI.00189-16>
 11. Pukatzki S., Ma A.T., Sturtevant D., Krastins B., Sarracino D., Nelson W.C., et al. Identification of a conserved bacterial protease secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103(5): 1528–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
 12. Ma A.T., McAuley S., Pukatzki S., Mekalanos J.J. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell. Host. Microbe.* 2009; 5(3): 234–43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.02.005>
 13. Joshi A., Kostiuik B., Rogers A., Teschler J., Pukatzki S., Yildiz F.H. Rules of engagement: the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *Trends. Microbiol.* 2017; 25(4): 267–79. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.003>
 14. Monakhova E.V., Bozhko N.V. Study of the expression of contact-dependent secretion systems by cholera vibrios on a model *Dictyostelium discoideum*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; 87(4): 89–92. (in Russian)
 15. Zheng J., Shin O.S., Cameron D.E., Mekalanos J.J. Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(49): 21128–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014998107>
 16. Miyata S.T., Kitaoka M., Wieteska L., Frech C., Chen N., Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front. Microbiol.* 2010; 1: 117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00117>
 17. Ishikawa T., Sabharwal D., Bröms J., Milton D.L., Sjöstedt A., Uhlin B.E., et al. Pathoadaptive conditional regulation of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Infect. Immun.* 2012; 80(2): 575–84. <https://doi.org/10.1128/IAI.05510-11>
 18. Miyata S.T., Unterweger D., Rudko S.P., Pukatzki S. Dual expression profile of type VI secretion system immunity genes protects pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003752. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003752>
 19. Unterweger D., Miyata S.T., Bachmann V., Brooks T.M., Mullins T., Kostiuik B., et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat. Commun.* 2014; 5: 3549. <https://doi.org/10.1038/ncomms4549>
 20. Townsley L., Mangus M.P.S., Mehic S., Yildiz F.H. Response of *Vibrio cholerae* to low temperature shifts: CspV regulation of type VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(14): 4441–52. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00807-16>
 21. Crisan C.V., Chande A.T., Williams K., Raghuram V., Rishishwar L., Steinbach G., et al. Analysis of *Vibrio cholerae* genomes identifies new type VI secretion system gene clusters. *Gen. Biol.* 2019; 20(1): 163. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1765-5>
 22. Santoriello F.J., Michel L., Unterweger D., Pukatzki S. Pandemic *Vibrio cholerae* shuts down site-specific recombination to retain an interbacterial defence mechanism. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 6246. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20012-7>
 23. Kitaoka M., Miyata S.T., Brooks T.M., Unterweger D., Pukatzki S. VasH is a transcriptional regulator of the type VI secretion system functional in endemic and pandemic *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(23): 6471–82. <https://doi.org/10.1128/JB.05414-11>
 24. Seibt H., Aung K.M., Ishikawa T., Sjöström A., Gullberg M., Atkinson G.C., et al. Elevated levels of VCA0117 (VasH) in response to external signals activate the type VI secretion system of *Vibrio cholerae* O1 El Tor A1552. *Environ. Microbiol.* 2020; 22(10): 4409–23. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15141>
 25. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method. *Methods.* 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 26. Kritskiy A.A., Cheldyshova N.B., Tuchkov I.V., Smirnova N.I. Development of the algorithm for identification of the level of

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Vibrio cholerae* ctxA and toxR gene expression using RT-PCR with Real-Time hybridization-fluorescent registration of results. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (3): 53–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-53-57> (in Russian)
27. Smirnova N.I., Agafonova E.Yu., Shchelkanova E.Yu., Agafonov D.A., Krasnov Ya.M., Livanova L.F., et al. Genomic diversity of nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in the territory of Russia and neighboring states. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2018; 36(2): 97–109. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84> (in Russian)
28. Zadnova S.P., Badanin D.V., Plekhanov N.A., Polunina T.A., Kotova N.V., Kritskiy A.A., et al. Comparative proteomic profiles of typical strain and genetically altered variant of *Vibrio cholerae* O1, biovar El Tor. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 150–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-150-153> (in Russian)
29. Bernardy E.E., Turnsek M.A., Wilson S.K., Tarr C.L., Hammer B.K. Diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* in natural transformation and contact-dependent bacterial killing indicative of type VI secretion system activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(9): 2833–42. <https://doi.org/10.1128/AEM.00351-16>

Информация об авторах

Заднова Светлана Петровна[✉] — д.б.н., в.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, svetlanazadnova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Плеханов Никита Александрович — к.б.н., с.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Спирина Алина Юрьевна — м.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>

Крицкий Андрей Александрович — к.б.н., зав. лаб. патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 03.09.2022;
принята к публикации 01.11.2022;
опубликована 30.12.2022

Information about the authors

Svetlana P. Zadnova[✉] — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, svetlanazadnova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Nikita A. Plekhanov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Alina Yu. Spirina — junior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>

Andrey A. Kritskiy — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 03.09.2022;
accepted for publication 01.11.2022;
published 30.12.2022