

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-29-34

УДК 616.932

В.П. Зюзина, О.А. Якушева, Л.П. Алексеева, В.В. Евдокимова, Д.И. Симакова

Роль везикул в транспорте холерного токсина

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

В обзоре освещены пути секреции основного фактора вирулентности холерного вибриона – холерного токсина – как через двухступенчатую Sec-зависимую систему секреции 2-го типа, так и с помощью везикул наружной мембраны *Vibrio cholerae*. Обсуждаются пути транспорта токсина в организм хозяина в зависимости от его формы. Хорошо изученный свободный холерный токсин секретируется внеклеточно и передается GM1-зависимым путем через богатые холестерином липидные рафты. Передача холерного токсина, связанного с везикулами, имеет преимущества по сравнению со свободным, так как вещества, находящиеся внутри везикул наружной мембраны, защищены от внешних протеаз и антител хозяина мембраной, формирующей везикулу. Везикулярный транспорт холерного токсина в клетку-мишень происходит по клатрин-зависимому и кавеолин-зависимому путям, а также посредством зависимо от липидных рафтов эндоцитоза, при этом конкретный путь определяется строением везикул. Клатрин-зависимый эндоцитоз описан для штаммов *V. cholerae*, культивируемых при низкой осмолярности среды, везикулы наружной мембраны которых содержали внутри субъединицу А холерного токсина. Эндоцитоз, зависящий от липидных рафтов, характерен для везикул, у которых холерный токсин расположен на поверхности. Кроме того, описан эндоцитоз везикул наружной мембраны *V. cholerae* с помощью структур, известных как кавеолы.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерный токсин, секреция холерного токсина, транспорт холерного токсина, везикулы наружной мембраны.

Корреспондирующий автор: Евдокимова Вероника Вячеславовна, e-mail: nika_evd@mail.ru; nika_evd@yandex.ru.

Для цитирования: Зюзина В.П., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Симакова Д.И. Роль везикул в транспорте холерного токсина. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 2:29–34. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-29-34

Поступила 02.09.2022. Отправлена на доработку 05.10.2022. Принята к публ. 02.12.2022.

V.P. Zyuzina, O.A. Yakusheva, L.P. Alekseeva, V.V. Evdokimova, D.I. Simakova

The Role of Vesicles in Transporting of Cholera Toxin

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

Abstract. The review reports on the secretion pathways of the main virulence factor of *Vibrio cholerae*, cholera toxin, both through the two-stage Sec-dependent type 2 secretion system and with the help of vesicles of the outer membrane of *V. cholerae*. The ways of toxin transfer into the host organism, depending on its form, are discussed. The well-studied free soluble cholera toxin is secreted extracellularly and transmitted in a GM1-dependent manner through cholesterol-rich lipid rafts. The transfer of cholera toxin associated with vesicles has advantages over free toxin, because substances inside the outer membrane vesicles are protected from external proteases and host antibodies by the membrane that forms the vesicle. Vesicular transporting of cholera toxin into the target cell occurs via clathrin-dependent, caveolin-dependent and lipid raft-dependent endocytosis. The specific transport route is determined by the structure of the vesicles. Clathrin-dependent endocytosis is described for *V. cholerae* strains cultivated at low osmolarity of the medium, whose outer membrane vesicles contain the cholera toxin subunit A inside. Lipid raft-dependent endocytosis is characteristic of vesicles in which cholera toxin is located on the surface. In addition, endocytosis of *V. cholerae* outer membrane vesicles through structures known as caveolae is presented.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera toxin, secretion of cholera toxin, transfer of cholera toxin, outer membrane vesicles.

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

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

Corresponding author: Veronika V. Evdokimova, e-mail: nika_evd@mail.ru; nika_evd@yandex.ru.

Citation: Zyuzina V.P., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Evdokimova V.V., Simakova D.I. The Role of Vesicles in Transporting of Cholera Toxin. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 2:29–34. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-29-34

Received 02.09.2022. Revised 05.10.2022. Accepted 02.12.2022.

Zyuzina V.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3100-0049>

Yakusheva O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>

Alekseeva L.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>

Evdokimova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>

Simakova D.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5598-5271>

Холерный вибрион вызывает опасное заболевание человека. Заражение обычно происходит после приема пищи или воды, контаминированной *Vibrio cholerae*. В организме человека патоген, пройдя

желудок, колонизирует тонкую кишку. Заселившие тонкий кишечник холерные вибрионы продуцируют холерный токсин, который вызывает сильную диарею [1].

Холерный токсин (ХТ), основной фактор патогенности возбудителя холеры, представляет собой классический пример АВ-токсина. Исследования структуры, биологической активности холерного токсина, а также механизмов его интернализации и внутриклеточного превращения ведутся с 80-х гг. прошлого столетия. Однако, несмотря на достигнутые успехи, некоторые аспекты взаимодействия «токсин – клетка – мишень» до сих пор остаются до конца не выясненными. Способы секреции ХТ и его передачи в клетку хозяина играют важную роль в этом процессе [2].

В последние годы резко возрос интерес исследователей к такому явлению, как везикулы холерных вибрионов. Образование везикул наружной мембраны (ВНМ) у *V. cholerae* является нормальным физиологическим проявлением их жизнедеятельности и не связано с деградацией. Везикулы представляют собой отпочковывающиеся во внешнюю среду сферические частицы диаметром 50–250 нм, состоящие из участков наружной мембраны с захватом части периплазматического пространства. Они доставляют различные макромолекулы к клеткам-мишеням. Везикулярный транспорт имеет большие преимущества по сравнению с обычным, так как вещества, находящиеся внутри ВНМ (бактериальные ферменты и токсины), защищены от внешних протеаз чужеродного происхождения и антител хозяина мембраной, формирующей везикулу. ВНМ вносят свой вклад в патогенез, так как переносят продуцируемые бактериями факторы вирулентности, которые обеспечивают прикрепление, повреждение клеток-хозяев, устойчивость к противомикробным препаратам, модуляцию иммунного ответа и повышенную вирулентность [3, 4].

В недавних исследованиях E.S. Rasti *et al.* [5, 6] показали, что биологически активный ХТ, помимо свободной формы, секретируемой с помощью системы секреции 2-го типа (T2SS), может либо ассоциироваться с поверхностью везикул наружной мембраны, либо находиться внутри везикул и секретироваться в везикуло-ассоциированной форме.

Цель работы – обзор имеющихся в современной литературе сведений о процессе транспорта ХТ в клетку-мишень, его механизмах и о роли везикул наружной мембраны возбудителя холеры в этом процессе.

Структурная организация холерного токсина. Симптомы вызванного возбудителем холеры заболевания обусловлены продуцируемым им ХТ, одним из основных факторов вирулентности *V. cholerae* [7, 8].

Холерный токсин – представитель обширной группы АВ5-токсинов [9]. Это олигомерный белок, относящийся к ядам биологического происхождения II группы патогенности, состоящий из двух субъединиц – А и В, которые по отдельности вне клетки не обладают специфической активностью в концентрациях, сравнимых с интактным токсином [10].

Субъединица А ХТ состоит из двух полипептидных цепей А1 и А2, связанных между собой дисульфидной связью. Первоначально синтезируется как единый полипептид, но активность проявляет после посттрансляционной модификации под действием протеазы, которая образует два фрагмента – А1 и А2. Полипептид А1 ХТ отвечает за активность аденозиндифосфатрибозилтрансферазы – фермента, который присоединяет АДФ-рибозу к G-белкам. Полипептид А2 – альфа-спиральная цепь, которая своим С-концом входит в центральную пору кольца субъединицы В [5, 10].

Субъединица В ХТ – пентамер, мономеры которого собраны в кольцо. Структура В-субъединицы тесно связана со структурой рецепторов-мишеней, с которыми взаимодействует токсин. Субъединицы типа В обеспечивают связь холерного токсина с его специфичным рецептором – моносиалоганглиозидом GM1 (GM1), расположенным в липидных рафтах на наружной мембране клеток тонкого кишечника [11, 12]. Каждая субъединица В имеет пять сайтов связывания и может одновременно связывать пять ганглиозидов GM1, что приводит к одному из самых сильных среди известных углеводно-белковых взаимодействий [12]. На клеточной мембране GM1 служит «посадочной площадкой» для прикрепления нижней поверхности пентамера В. Помимо взаимодействия с рецептором клетки-мишени субъединица В экранирует ферментативную субъединицу, исключая случайное взаимодействие с субстратом как собственной клетки, так и за пределами клетки-мишени. В-субъединичный комплекс нетоксичен [2].

Заболевание холерой вызывают токсигенные штаммы серогрупп O1 или O139. На основании биологических свойств представителей O1-серогруппы разделяют на биотипы: классический и El Tor, – которые различаются по типу продуцируемого токсина. Субъединицы А классического токсина, токсинов El Tor и O139 идентичны по аминокислотной последовательности, в то время как субъединицы В имеют специфические для биотипов аминокислотные замены в положениях 18 и 47: Tyr-18 и Ile-47, типичные для биотипа El Tor и O139, а His-18 и Thr-47 – для классического биотипа. Однако в последнее время в клинических изолятах *V. cholerae* по всему миру наблюдаются изменения в строении В-субъединицы ХТ. Современные штаммы O1 El Tor продуцируют ХТ классического биотипа. Варибельность В-субъединицы зависит от фага CTXφ, в котором находится генетическая информация о ХТ. В настоящее время известен ряд фагов, кодирующих 12 разных генотипов CtxB [13].

Транспорт токсина холерного вибриона. В организм человека *V. cholerae* проникает через пищеварительный тракт. При заражении хозяина холерный вибрион попадает в неблагоприятные условия: кислотный стресс в желудке, изменение концентрации желчных солей, бикарбонатов, снижение уровня кислорода. Поэтому развитие инфек-

ционного процесса требует координированной экспрессии известных факторов вирулентности, среди которых важнейшие: токсин-корегулируемые пили, участвующие в процессе адгезии вибриона к эпителию тонкого кишечника, и холерный токсин. После адгезии возбудитель утрачивает подвижность и усиленно размножается, образуя колонии в виде бляшек на поверхности энтероцитов, не проникая при этом внутрь них, и продуцирует холерный токсин внутри бактериальной клетки [14].

Токсин секретируется из клетки холерного вибриона через двухступенчатую Sec-зависимую систему секреции 2-го типа. Эта система секреции широко представлена среди грамотрицательных бактерий, в связи с чем ее называют общим секреторным путем (GSP – general secretory pathway). Секреторный механизм *V. cholerae* кодируется опероном *eps* (от англ. extracellular protein secretion). Белки, секретируемые по 2-му пути, проходят через внутреннюю и наружную мембраны отдельными этапами при участии Sec-белков. Изначально на первом этапе субъединицы А и В ХТ, независимо друг от друга, синтезируются в цитоплазме, затем в форме мономеров они транслоцируются через цитоплазматическую мембрану и лишь перед секрецией происходит объединение молекулы в токсин внутри периплазмы [10]. В периплазматическом пространстве мономеры с помощью дисульфид-оксидоредуктазы собираются в токсиновый комплекс, молекула приобретает окончательную структуру АВ5 и транспортируется через наружную мембрану. Все белки, секретируемые с помощью системы секреции 2-го типа, имеют сигнальный пептид на N-конце, оперон секреции *eps* его распознает и перемещает ХТ из периплазмы во внеклеточную среду через внешнюю мембрану бактерии на втором этапе [15]. Белок секретин EpsD у холерных вибрионов принимает участие в формировании пор во внешней мембране. Белок EpsE играет роль АТФ-азы, снабжая энергией пилеподобную структуру и пору для их работы. Для предотвращения протеолитической деградации он формирует стабильный комплекс с белками EpsL и EpsM. Трипептидный комплекс Eps-белков вовлечен в открывание/закрывание секреторируемой поры. Белок EpsG совместно с белками EpsH, EpsI, EpsJ, сокращаясь или вытягиваясь, выталкивает молекулу холерного токсина наружу [16].

После выхода из бактериальной клетки через 1–3 минуты холерный токсин с помощью кольца субъединицы В связывается с рецептором GM1, расположенным преимущественно в богатых гликофинголипидами микродоменах плазматической мембраны (липидных рафтах), которые, в свою очередь, играют важную роль в процессах клатрин-независимого эндоцитоза. Обычным средством для проникновения в клетку может быть кластеризация ганглиозидов GM1 с последующей интернализацией, коррелирующей с количеством ганглиозидов GM1, связанных с пентамерной субъединицей В: с уменьшени-

ем количества GM1-связанных сайтов от пяти до одного или двух ухудшается интернализация пентамеров. Замедление интернализации ХТ наблюдается также при истощении холестерина в липидных рафтах [17]. Затем комплекс ХТ-GM1 подвергается эндоцитозу, попадает в транспортную сеть аппарата Гольджи и переносится по ретроградному пути, минуя аппарат Гольджи, в эндоплазматический ретикулум (ЭР) [18].

Там протеиндисульфид-изомераза (шаперон ЭР) разрезает дисульфидную связь между полипептидами А1 и А2, отделяет полипептидную цепь А1 от остального токсина, в результате чего она спонтанно разворачивается, становится ферментативно активной и перенаправляется далее обратно в цитозоль, в то время как цепь А2 остается связанной внутри интактного В5-кольца [19].

Перенос полипептидной цепи А1 через поры транслокона ЭР осуществляется от N- к С-концу с помощью шаперона Hsp90. При этом в процессе восстановления структуры полипептидной цепи А1 с помощью Hsp90 ее N-концевой домен сворачивается и больше не помещается в пору транслокона, что исключает ее обратное скольжение в ЭР, обеспечивая тем самым однонаправленное движение полипептидной цепи А1 из ЭР в цитозоль [20]. Однонаправленный транспорт в цитозоль из поры транслокона продолжается последующим связыванием шаперона Hsp70 с внутренним сегментом полипептидной цепи А1 и связыванием шаперона Hsp90 с ее С-концевой областью [21]. Связанный с полипептидной цепью А1 Hsp90 поддерживает ее в свернутой конформации, активной для АДФ-рибозилирования ее мишени – G-белка [20]. Эта связь полипептидной цепи А1 с шапероном позволяет токсину избегать протеасомной деградации.

Полипептидная цепь А1 связывается с белком-партнером фактором АДФ-рибозилирования б (Arf6), который стимулирует ее каталитическую активность, расщепляет никотинамидадениндинуклеотид, переносит образовавшуюся АДФ-рибозу на G-белок для активации регуляторной субъединицы эндогенной аденилатциклазы Gsa, которая находится на внутренней стороне мембраны эпителиоцита, при этом аденилатциклаза остается в активированном состоянии – она способна связывать ГТФ, но не может его гидролизовать [22, 23]. На плазматической мембране хозяина активированная аденилатциклаза начинает непрерывно синтезировать циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) – внутриклеточный стимулятор кишечной секреции. Его концентрация в клетке может вырасти более чем в 100 раз. Повышение концентрации цАМФ внутри клеток индуцирует протеинкиназу А, которая фосфорилирует и активирует канал хлорид-иона, перекачивающий ионы хлора и других анионов из клеток кишечного эпителия в просвет кишечника [22, 23], что приводит к клиническим проявлениям в виде жидкого стула и тяжелого обезвоживания организма. Нарушение водного баланса вызывает потерю жидкости до 2 лит-

ров в час. Стул больного становится похожим на «рисовый отвар» из-за энтероцитов, отделяющихся от стенки кишечника.

В последнее время появились работы, свидетельствующие о роли везикул в доставке ХТ в организм хозяина, колонизации кишечника, патогенезе холеры, а также иммуногенезе и создании вакцин. На сегодняшний день помимо секреции через двухступенчатую Sec-зависимую систему 2-го типа [17] продемонстрировано явление включения ХТ в везикулы. Полностью сформированный токсин может поступать в периплазму и далее захватываться везикулами. При этом токсин может быть локализован в полости везикулы или ассоциирован с ее внутренней или наружной поверхностью, причем, по сведениям некоторых авторов, большая часть ХТ, продуцируемого возбудителем холеры, секретируется в форме, связанной с ВНМ, а не в виде растворимого белка, как считалось ранее [24]. Этот способ доставки токсина к клеткам-мишеням не является конкурентным, так как реализуется иными механизмами взаимодействия с рецепторами организма хозяина. Однако он еще не исследован в должной степени. Работы в данной области активно ведутся.

Формирование везикул у *V. cholerae*. Процесс образования везикул у возбудителя холеры не пассивный, а функционирует как контролируемый механизм секреции компонентов клетки или оболочки и регулируется малой РНК, получившей название *VrrA* (*Vibrio regulatory RNA of OmpA*). Малая РНК *VrrA* у *V. cholerae* активируется в условиях, вызывающих мембранный стресс. Действие этой регуляторной мРНК направлено на подавление производства белка наружной мембраны *OmpA*, необходимого для поддержания связи между наружной мембраной бактерий и пептидогликаном, что приводит к повышению продукции везикул у холерного вибриона [4]. Помимо малой РНК *VrrA* формирование везикул регулируется транспортной системой *VacJ/Vrb*. На ранней стадии инфекции происходит подавление транспортера фосфолипидов *VacJ/Vrb*, приводящее к стимуляции образования везикул. Гипервезикуляция позволяет быстро изменить состав бактериальной мембраны, накапливая в ней модифицированный глицином липополисахарид (ЛПС), и уменьшить количество поринов *OmpT* [25]. Такая адаптация повышает устойчивость бактерий к антимикробным пептидам и желчи, что способствует колонизации кишечника хозяина.

Роль везикул наружной мембраны в транспорте холерного токсина. В настоящее время помимо систем секреции типа 1–6 предлагается рассматривать ВНМ грамотрицательных бактерий как дополнительную систему секреции, которую называют системой секреции нулевого типа [26]. Преимущества такой системы секреции разнообразны и направлены на максимальную колонизацию экологической ниши, будь то организм хозяина либо условия микробного сообщества или окружающей среды. Эта система выделения позволяет снизить реакцию ор-

ганизма хозяина на биологически активные молекулы *V. cholerae*, обеспечивая ей преимущества выживания *in vitro*. Например, свободная форма токсина в организме стимулирует образование таких цитокинов, как интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли (TNF) и др. В то же время ВНМ, содержащие токсины, индуцируют продукцию микроРНК *miR-146a*, которая подавляет реакции врожденного иммунного ответа и предотвращает развитие воспаления в слизистой оболочке кишечника [27].

Дифференцированная упаковка токсинов в ВНМ зависит от стадии роста бактерий и может изменяться в ответ на условия окружающей среды [28]. Например, у классического штамма *V. cholerae* O1 Inaba 569В в статических условиях культивирования токсин в ВНМ высвобождается в форме *CtxAB5*, в то же время в условиях низкой осмолярности среды у этого же штамма только субъединица *CtxA* упаковывается в ВНМ [6].

В настоящее время имеется множество доказательств того, что ВНМ могут проникать в клетки-хозяева и высвобождать свой груз, влияя на физиологию клеток, при этом специфические механизмы, лежащие в основе того, как ВНМ связываются с клетками-хозяевами и поглощаются ими, до сих пор полностью не изучены. Клетки-мишени обладают способностью захватывать молекулы из внеклеточной среды и включать их внутрь через процесс, называемый эндоцитозом. В свою очередь ВНМ имеют специфические сайты узнавания эндоцитарных путей и способны использовать их для транспортировки своих грузов.

Для грамотрицательных бактерий описано пять эндоцитарных путей, с помощью которых ВНМ могут транспортироваться в нефагоцитарные клетки: макропиноцитоз, клатрин-зависимый и кавеолин-зависимый эндоцитоз, эндоцитоз, зависимый от липидных рафтов, и прямое слияние мембран [29]. Конкретный путь эндоцитоза ВНМ варьирует для разных бактерий и зависит от размера ВНМ. Кроме того, для выбора пути проникновения ВНМ в клетки хозяина решающее значение имеют ЛПС и структурная область О-антигена. Везикулы наружной мембраны, лишенные О-антигена, транспортируются клатрин-зависимым эндоцитозом, тогда как поглощение ВНМ с интактным О-антигеном зависит от липидного рафта [30]. Транспорт везикул в клетку-мишень происходит по определенному пути, который определяется их строением. Существует, однако, неоднозначное мнение в отношении исследований, анализирующих проникновения ВНМ из бактерий одного и того же вида. Это может быть обусловлено отличиями в методах выделения ВНМ, методах мечения или визуализации, количественной оценки, а также особенностями используемых штаммов, типов клеток-хозяев и клеточных линий [29]. По литературным данным, для транспорта холерного токсина в клетку-мишень холерные вибрионы используют клатрин-зависимый и кавеолин-зависимый эндоцитоз, а также эндоцитоз, зависимый от липидных рафтов.

Клатрин-зависимый эндоцитоз запускается после связывания ВНМ с рецепторами на плазматической мембране клетки. ВНМ и рецептор задействуют адапторные белки и клатрин плазматической мембраны, что приводит к инвагинации плазматической мембраны, которая образует ямку, покрытую клатрином. Ямка, содержащая ВНМ, формируется в покрытый клатрином пузырек, который отделяется от плазматической мембраны с помощью мембраносвязывающих и расщепляющих белков, таких как динамин, переходит в цитоплазму, где сливается с эндосомой [29, 31, 32].

Такой путь транспорта описан для ВНМ, доставляющих субъединицу А холерного токсина у штаммов *V. cholerae* O1 Classical Inaba 569B и *V. cholerae* O1 El Tor C6706 и N16961, культивируемых при низкой осмолярности среды. В таких стрессовых условиях у этих штаммов на всех этапах роста показан избирательный экспорт субъединицы А внутрь просвета везикул, что позволяет биологически активному ферменту в концентрированной и защищенной форме достигать отдаленных целей. В этом процессе задействованные механизмы еще полностью не детализированы, упаковка в везикулы, по-видимому, происходит в виде избирательного механизма устранения токсического материала из клетки в стрессовых условиях. Расположенная внутри просвета везикулы субъединица А не обнаруживается традиционными иммуноферментными методами. Ассоциация с везикулами наружной мембраны является важным механизмом доставки активной А-субъединицы, не требующим ни В-субъединиц, ни рецепторов GM1 [5, 6, 33].

Более того, холерный токсин, связанный с ВНМ, у клеток штамма *V. cholerae* 569B, выращенных в условиях низкой осмолярности, не существует в форме АВ5, поскольку везикулы инкапсулируют А-субъединицу, но не субъединицу В, т.е. внутри везикул находится субъединица А [6].

Оказавшись внутри клетки-мишени, везикулы должны продвигаться по эндолизосомальному пути и, в конечном итоге, разрушаться в лизосомах. В противоположность этому интернализированная субъединица А проявляет свою каталитическую активность. Вопрос о том, какие механизмы внутри клетки-мишени задействованы для предотвращения деградации и проявления каталитической активности субъединицы А, в настоящее время остается не выясненным.

Эндоцитоз ВНМ *V. cholerae* может идти и другим путем – посредством структур, известных как кавеолы. Кавеолы – это стабильные впячивания мембраны клетки в форме буквы Ω, диаметром от 50 до 100 нм, обогащенные холестерином и сфинголипидами, в состав которых входят белки кавеолины и кавины. ВНМ связываются с белком кавеолином, формируется кавеола, которая при участии белка динамина и актиновых микрофиламентов клетки-мишени отделяется от плазмолемы. Отделившаяся кавеола направляется к внутренним органеллам клетки, в частности в ЭР. Этот путь передачи был обнаружен

F.G. Zingl *et al.* [4] у клинически значимого штамма *V. cholerae* O1 биотипа El Tor SP27. Изучаемый штамм биотипа El Tor, в отличие от штаммов классического биотипа, секретировал только от 10 до 15 % ХТ, связанного с ВНМ, при этом поглощение содержащих ХТ везикул кавеолин-зависимым эндоцитозом происходило при участии белков-поринов наружной мембраны *V. cholerae* OmpU и OmpT.

В поглощении ВНМ *V. cholerae*, содержащих ХТ, может быть задействован и эндоцитоз, зависящий от липидных рафтов, представляющих собой особые участки (микродомены) плазматической мембраны, обогащенные гликофинголипидами и холестерином. Так, в работе D. Chatterjee и K. Chaudhuri [24] показано, что холерный токсин у штамма *V. cholerae* O1 Classical Ogawa O395 плотно прикреплен к поверхности везикул, является биологически активным, о чем свидетельствует способность несущих ХТ везикул вызывать типично морфологические изменения в клетках СНО. После выделения из бактериальной клетки через систему секреции T2SS ХТ связывается с ЛПС везикулы во время блеббинга. При этом О-антиген везикулы играет дополнительную, ранее не признанную роль во время взаимодействия бактерии с хозяином, которая заключается в том, чтобы направлять везикулы по рафт-зависимому эндоцитозу, ускоряя поглощение и доставку факторов вирулентности [34]. Токсичные везикулы *V. cholerae* O395, проникнув в клетки через липидные рафты, связываются с рецептором GM1 внутри него. Кавеолин собирается в эти места. Везикулы, связанные с рафтом, интернализуются и удерживаются, а токсин транспортируется к аппарату Гольджи и в ЭР, как и в случае с растворимым токсином. Необходимо отметить, что свободный и связанный с ВНМ холерный токсин по-разному активируют цАМФ. Свободный ХТ интенсивно, но кратковременно повышает уровень клеточного цАМФ. В то же время ХТ, связанный с ВНМ, вызывает умеренное, но устойчивое повышение его уровня [4].

Таким образом, накопленные к настоящему моменту сведения о транспорте ХТ дают основание констатировать, что основной фактор вирулентности холерного вибриона – холерный токсин – секретировается бактериальной клеткой как через Sec-зависимую систему секреции 2-го типа, так и в ассоциации с везикулами наружной мембраны, и выделяется по нулевому типу секреции. Передача ХТ в энтероциты идет в основном по GM1-зависимому пути через богатые холестерином липидные рафты. Этот путь характерен для свободного токсина и для везикул, несущих на своей поверхности ХТ. Помимо эндоцитоза, зависящего от липидных рафтов, содержащие холерный токсин ВНМ передаются клатриновым или кавеолиновым путями. Внутри клетки-мишени свободный ХТ и ХТ, связанный с везикулами, используют путь ассоциированной деградации эндоплазматического ретикулума для своего продвижения из эндоплазматического ретикулума в цитозоль. Остается открытым вопрос сохранения, продвижения и взаимодей-

ствия с G-белком субъединицы A, находящейся внутри везикул, эндоцитированных клатрин-зависимым путем. Существует пробел в понимании высвобождения токсина из везикул, доставленных в энтероциты кавеолин-зависимым эндоцитозом.

Анализ данных, содержащихся в литературных источниках, свидетельствует о сложности взаимодействия токсина с клетками-мишенями. Дальнейшее исследование этой проблемы поможет получить новые сведения и позволит расширить границы наших знаний о патогенезе холеры.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

References / Список литературы

1. Cho J.Y., Liu R., Macbeth J.C., Hsiao A. The interface of *Vibrio cholerae* and the gut microbiome. *Gut Microbes*. 2021; 13(1):1937015. DOI: 10.1080/19490976.2021.1937015.
2. Sanchez J., Holmgren J. Cholera toxin – a foe and a friend. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133(2):153–63.
3. Rueter C., Bielaszewska M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10:91. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00091.
4. Zingl F.G., Thapa H.B., Scharf M., Kohl P., Müller A.M., Schild S. Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake. *mBio*. 2021; 12(3):e0053421. DOI: 10.1128/mBio.00534-21.
5. Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in GM1-independent manner. *Cell. Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.
6. Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
7. Davis B.M., Waldor M.K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003; 6(1):35–42. DOI: 10.1016/s1369-5274(02)00005-x.
8. Hsiao A., Zhu J. Pathogenicity and virulence regulation of *Vibrio cholerae* at the interface of host-gut microbiome interactions. *Virulence*. 2020; 11(1):1582–99. DOI: 10.1080/21505594.2020.1845039.
9. Biernbaum E.N., Kudva I.T. AB₅ enterotoxin-mediated pathogenesis: Perspectives gleaned from Shiga toxins. *Toxins (Basel)*. 2022; 14(1):62. DOI: 10.3390/toxins14010062.
10. Baldauf K.J., Royal J.M., Hamorsky K.T., Matoba N. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. *Toxins (Basel)*. 2015; 7(3):974–96. DOI: 10.3390/toxins7030974.
11. Heim J.B., Hodnik V., Heggelund J.E., Anderluch G., Krengel U. Crystal structures of cholera toxin in complex with fucosylated receptors point to importance of secondary binding site. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):12243. DOI: 10.1038/s41598-019-48579-2.
12. Heggelund J.E., Barzowski D., Bjørnstad V.A., Hodnik V., Anderluch G., Krengel U. High-resolution crystal structures elucidate the molecular basis of cholera blood group dependence. *PLoS Pathog.* 2016; 12(4):e1005567. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005567.
13. Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., Das B., Ghosh A., Nair G.B. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front. Public Health*. 2019; 7:203. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00203.
14. Pennetzdorfer N., Höfler T., Wölflingseder M., Tutz S., Schild S., Reidl J. σ^F controlled regulation of porin OmpU in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2021; 115(6):1244–61. DOI: 10.1111/mmi.14669.
15. Douzi B., Filloux A., Voulhoux R. On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2012; 367(1592):1059–72. DOI: 10.1098/rstb.2011.0204.
16. Guerrero-Mandujano A., Hernández-Cortez C., Ibarra J.A., Castro-Escarpulli G. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*. 2017; 18(7):425–32. DOI: 10.1111/tra.12488.
17. Chinnapen D.J.-F., Chinnapen H., Saslowsky D., Lencer W.I. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 266(2):129–37. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00545.x.
18. Feng Y., Jadhav A.P., Rodighiero C., Fujinaga Y., Kirchhausen T., Lencer W.I. Retrograde transport of cholera toxin from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum requires the trans-Golgi network but not the Golgi apparatus in Exo2-treated cells. *EMBO Rep.* 2004; 5(6):596–601. DOI: 10.1038/sj.embor.7400152.
19. Tsai B., Rodighiero C., Lencer W.I., Rapoport T.A. Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*. 2001; 104(6):937–48. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00289-6.
20. Burress H., Taylor M., Banerjee T., Tatulian S.A., Teter K. Co- and post-translocation roles for Hsp90 in cholera intoxication. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(48):33644–54. DOI: 10.1074/jbc.M114.609800.
21. Kellner A., Taylor M., Banerjee T., Britt C.B.T., Teter K. A binding motif for Hsp90 in the A chains of ADP-ribosylating toxins that move from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell. Microbiol.* 2019; 21(10):e13074. DOI: 10.1111/cmi.13074.
22. Sala A.D., Prono G., Hirsch E., Ghigo A. Role of protein kinase A-mediated phosphorylation in CFTR channel activity regulation. *Front. Physiol.* 2021; 12:690247. DOI: 10.3389/fphys.2021.690247.
23. Chin S., Hung M., Bear C.E. Current insights into the role of PKA phosphorylation in CFTR channel activity and the pharmacological rescue of cystic fibrosis disease-causing mutants. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017; 74(1):57–66. DOI: 10.1007/s00018-016-2388-6.
24. Chatterjee D., Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* 2011; 585(9):1357–62. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.04.017.
25. Furuyama N., Sircili M.P. Outer membrane vesicles (OMVs) produced by gram-negative bacteria: structure, functions, biogenesis, and vaccine application. *Biomed Res. Int.* 2021; 2021:1490732. DOI: 10.1155/2021/1490732.
26. Caruana J.C., Walper S.A. Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe – microbe and microbe – host community interactions. *Front. Microbiol.* 2020; 11:432. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00432.
27. Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.
28. Mozaheb N., Mingeot-Leclercq M.-P. Membrane vesicle production as a bacterial defense against stress. *Front. Microbiol.* 2020; 11:600221. DOI: 10.3389/fmicb.2020.600221.
29. O'Donoghue E.J., Krachler A.M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell. Microbiol.* 2016; 18(11):1508–17. DOI: 10.1111/cmi.12655.
30. Cai W., Kesavan D.K., Wan J., Abdelaziz M.H., Su Z., Xu H. Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based. *Diagn. Pathol.* 2018; 13(1):95. DOI: 10.1186/s13000-018-0768-y.
31. Rewatkar P.V., Parton R.G., Parekh H.S., Parat M.-O. Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 91:92–108. DOI: 10.1016/j.addr.2015.01.003.
32. El-Sayed A., Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther.* 2013; 21(6):1118–30. DOI: 10.1038/mt.2013.54.
33. Jan A.T. Outer membrane vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria: a perspective update. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1053. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01053.
34. O'Donoghue E.J., Sirisaengtaksin N., Browning D.F., Bielska E., Hadis M., Fernandez-Trillo F., Alderwick L., Jabbari S., Krachler A.M. Lipopolysaccharide structure impacts the entry kinetics of bacterial outer membrane vesicles into host cells. *PLoS Pathog.* 2017; 13(11):e1006760. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006760.

Authors:

Zyuzina V.P., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Evdokimova V.V., Simakova D.I. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

Об авторах:

Зюзина В.П., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Симакова Д.И. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru.