

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА *toxR* У ТОКСИГЕННЫХ И
НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 БИОВАРА
ЭЛЬ ТОР**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 241 группы

направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

биологического факультета

Рыбальченко Дарьи Александровны

Научный руководитель

Зав. кафедрой док. биол. наук,
профессор _____

С.А. Коннова

Научный консультант:

док. биол. наук, профессор _____

Н. И. Смирнова

Зав. кафедрой, док. биол. наук,
профессор _____

С.А. Коннова

Введение. Холера является особо опасной инфекцией, широко распространенной во многих странах Латинской Америки, Африки и Азии, на значительной части территорий которых сформировались эндемичные очаги. Несмотря на отсутствие эндемичных очагов холеры в Российской Федерации, эта карантинная инфекция до сих пор остается одной из важнейших проблем для нашего здравоохранения, поскольку огромные международные миграционные процессы населения создали реальную основу для ее заноса в страну из зарубежных регионов.

Известно о семи пандемиях холеры (с 1817 г.), вызванных холерными вибрионами двух разных биоваров - классического и Эль Тор. Последняя, 7-я, пандемия, начавшаяся в 1961 году и продолжающаяся до сих пор, была вызвана токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, отличающимися биохимическими и генетическими свойствами от *V. cholerae* классического биовара - возбудителя предыдущие шести пандемий. Первая эпидемия холеры Эль Тор в России, завезенная из Ирана, была зарегистрирована в Поволжье в 1970-1974 гг. Впоследствии крупные эпидемические вспышки протекали в Дагестане (1994 г.), Владивостоке и Южно-Сахалинске (1999 г.), а также в Казани (2001 г.). В последние годы, включая 2014 г., во многих городах (Иркутск, Тверь, Мурманск, Москва и т.д.) регистрировались лишь единичные случаи холеры, занесенные в основном из стран Юго-Восточной Азии.

К ключевым генам вирулентности холерных вибрионов относятся структурные гены *tcpA-F* и *ctxAB*, кодирующие основные факторы вирулентности и расположенные на двух мобильных элементах – острове патогенности VPI-1 и профаге СТХφ соответственно. Кластер генов *tcpA-F* определяет продукцию токсин-корректируемых пилей, расположенных на поверхности бактериальной клетки, за счет которых происходит развитие первого этапа инфекционного процесса при холере - прикрепление вибрионов к энтероцитам тонкого кишечника человека с последующей его колонизацией.

Гены *ctxAB*, образующие оперон, кодируют секретлируемый из клетки холерный токсин, который вызывает развитие основного клинического симптома – профузную диарею.

Уровень вирулентности различных штаммов холерных вибрионов зависит также от уровня экспрессии этих генов. Координированная регуляция активности генов *ctxAB* и *tcpA* осуществляется через регуляторный каскад глобальной контролирующей системой, основными компонентами которой являются регуляторные гены *toxR*, *toxS*, *aphA* из коровой области хромосомы, а также гены *tcpP*, *tcpH* и *toxT*, входящие в состав ОП VPI-1. Центральная роль в активации транскрипции структурных генов вирулентности принадлежит цитоплазматическому белку ТохТ, являющемуся транскрипционным регулятором. В свою очередь транскрипция гена *toxT* активируется трансмембранным белком ТохR, кодируемым геном *toxR*. Таким образом, в работу контролирующей системы вовлечено несколько регуляторных генов, последовательно активирующих друг друга. При этом основным геном, от экспрессии которого зависит активность этой регуляторной системы, является ген *toxR*.

В качестве генетических маркеров эпидемически опасных штаммов принято использовать гены *ctxA* и *tcpA*, которые абсолютно необходимы для развития инфекционного процесса. Выделение штаммов *ctxA+tcpA+*, содержащих в геноме эти гены вирулентности, от людей или из окружающей среды, служит прямым указанием на завоз возбудителя холеры на территорию России и диктует необходимость проведения соответствующих профилактических и противоэпидемических мероприятий. Вместе с тем при мониторинге окружающей среды в РФ в ряде случаев из водоемов были выделены холерные вибрионы биовара Эль Тор *ctxA+tcpA+*, но случаи заболевания холерой отсутствовали. Одной из возможных причин такой ситуации могла быть авирулентность этих изолятов вследствие мутации структурных и/или регуляторных генов вирулентности. Однако этот вопрос остается до сих пор невыясненным и для его понимания необходимы

исследования структурных и функциональных особенностей различных генов таких штаммов, вовлеченных в реализацию патогенных свойств возбудителя, поэтому тема исследований является актуальной.

Цель работы: выявление мутаций в регуляторном гене *toxR* у различных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор *ctxA+tcpA+* и изучение их влияния на уровень экспрессии основных генов вирулентности.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) провести биоинформационный сравнительный анализ секвенированных полных геномов различных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор;

2) выявить и изучить распространенность мутаций в глобальном регуляторном гене *toxR* среди вирулентных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированных на территории Российской Федерации и сопредельных государств;

3) изучить влияние мутаций на структуру белка ToxR путем оценки его функциональной активности;

4) изучить влияние мутаций в гене *toxR* на экспрессию ключевых генов патогенности - холерного токсина и токсин-корректируемых пилей путем определения уровня транскрипции их генов методом ОТ-ПЦР и оценки уровня продукции холерного токсина.

Структура магистерской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 74 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика возбудителя холеры - *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, молекулярно-генетические особенности измененных вариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор; механизм генетического контроля экспрессии генов вирулентности *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе были использованы секвенированные нуклеотидные последовательности полных геномов 20 типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор 1970-2014 годов

выделения, из которых 6 штаммов были выделены из водной среды и 14 от человека. По генетическим маркерам вирулентности все штаммы относились к группе токсигенных - *ctxA+tcpA+*.

Ранее, в результате экспериментального моделирования были выявлены структурные изменения генома вирулентных штаммов после их пребывания в водной среде, которые выражались в потере профага СТХφ с набором генов, кодирующих холерный токсин (ХТ) и как следствие - утрате вирулентности. В этой связи, для поиска возможных генетических изменений изучаемых штаммов на первом этапе работы мы провели анализ нуклеотидных последовательностей участков их генома, обязательных для проявления вирулентности - структурные гены ХТ (оперон *ctxAB*) и структурные гены токсин-корегулируемых пилей (оперон *tcpA-F*), а также три основных регуляторных гена *toxT*, *tcpP* и *tcpH*, контролирующие экспрессию *ctxAB* и *tcpA-F*. Оказалось, что все исследуемые штаммы содержали в хромосоме интактные гены ХТ и ТСП и не отличались по этим генам от референсного вирулентного штамма N16961. Таким образом, изучаемые штаммы не имели изменений в составе и структуре мобильных элементов, несущих ключевые гены вирулентности.

Далее, мы предположили, что одной из причин изменения вирулентности изучаемых штаммов могло быть повреждение структуры глобального регуляторного гена *toxR*, расположенного в коровой части генома. Наше предположение основано на том, что белок ToxR осуществляет активацию транскрипции одного из основных регуляторных генов вирулентности *toxT*, продукт которого - транскрипционный активатор ToxT, обеспечивает биосинтез двух критических факторов вирулентности ТСП и СТ. В ходе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *toxR* у исследуемых штаммов, были обнаружены 8 штаммов, несущие два типа мутаций - делеции и вставки, которые приводили к появлению стоп-кодона в различных участках гена (рисунок 1).

		10	45	55	65	95	110	130	150	180
	
N16961	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA-----TTGGTACTAAAT	... TAAGC	... CTG--ATT	... AT--AG	... CG-AT	... GGCTG		
223	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA-----TTGGTACTAAAT	... TAAGC	... CTG--ATT	... AT ATAG	... CG-AT	... GGCTG		
28	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA-----TTGGTACTAAAT	... TAAGC	... CTG TG ATT	... AT--AG	... CG-AT	... GGCTG		
155	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA AGTCATA TTGGTACTAAAT	... TAAGC	... CTG--ATT	... AT--AG	... CG-AT	... GGCTG		
147	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA-----TTGGTACTAAAT	... TAAGC	... CTG--ATT	... AT--AG	... CG-AT	... GGCTG		
89	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA-----TTGGTACTAAAT	... TAAGC	... CTG--ATT	... AT--AG	... CG-AT	... GGCTG		
301	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA-----TTGG-----AAT	... TAAGC	... CTG--ATT	... AT--AG	... CG-AT	... GGCTG		
P19613	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA-----TTGG-----AAT	... TAAGC	... CTG--ATT	... AT--AG	... CG-AT	... GGCTG		
M888	ATGTT	CGGATTAGGA	... CATA-----TTGGTACTAAAT	... TA G C	... CTG--ATT	... AT--AG	... CG-AT	... GGCTG		

		335	370	615	625	660	770	875	885
	
N16961	AA-TA	... AATTGAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			
223	AA-TA	... AATTGAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			
28	AA-TA	... AATTGAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			
155	AA-TA	... AATTGAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			
147	AA-TA	... AAT G -GAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			
89	AA-TA	... AAT G -GAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			
301	AA-TA	... AATTGAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			
P19613	AA-TA	... AATTGAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			
M888	AA-TA	... AATTGAT	...CCCGAGCCAAACCAG	... AGCCGTCA	... AGT--CAT	... TGTGTGAGTAG			

Рисунок 1 – Структура регуляторного гена *toxR* токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор *ctxA+* *tcpA+*.

Красным цветом обозначены нуклеотидные вставки, голубыми прямоугольниками - делеции.

Также, в результате анализа было установлено, что частота встречаемости мутаций составляет 40,0%, при этом мутации типа делеции были распространены несколько чаще (у 62,5 % мутантных штамма) по сравнению со вставками, выявленными лишь в 37,5% случаях. Следует также отметить, что мутантный ген *toxR* был обнаружен среди как типичных штаммов так и геновариантов возбудителя холеры.

В ходе оценки влияния выявленных мутаций в гене *toxR* на структуру кодируемого им белка - *ToxR*, отмечается изменение его аминокислотной последовательности (рисунок 2). Данные изменения влекут за собой нарушение процессов образования полноценной глобулярной структуры белка *ToxR* и, как следствие - нарушение регуляторной активности данного белка и в дальнейшем, всего каскада вирулентности.

Для оценки изменения функциональной активности мутантного белка *ToxR* у изучаемых штаммов, был проведен электрофоретический анализ продукции белков внешней мембраны *OmpU* и *OmpT*, экспрессия которых регулируется белком *ToxR* (рисунок 3).

Если у штаммов, несущих мутацию в гене *toxR*, действительно изменяется активность кодируемого им белка, то эти штаммы должны отличаться от неизмененных продукцией белка *OmpU*, для синтеза которого требуется интактный белок *ToxR*, а также белка *OmpT*, экспрессия которого регулируется негативно.

	Цитоплазматический домен (182 aa)										Трансмембранный домен (16 aa)	
	5	15	25	30	40	50	60	70	115	125	195	205
N16961	MFGLGHNSKE	... HIGTKFILA EK	... PLSNTLIDKEDSEEI IRLGSN	... QRPNEVISRNDLHD	... RGYQLIARVETVEE	... VLLLLTNPSQTS
223	MFGLGHNSKE	... HIGTKFILA EK	... PLSNTLIDKEDIVKRSFD*
28	MFGLGHNSKE	... HIGTKFILA EK	... PLSNTL*
155	MFGLGHNSKE	... HKS YWY*
147	MFGLGHNSKE	... HIGTKFILA EK	... PLSNTLIDKEDSEEI IRLGSN	... QRPNEVISRNDLHD	... RGYQ*
89	MFGLGHNSKE	... HIGTKFILA EK	... PLSNTLIDKEDSEEI IRLGSN	... QRPNEVISRNDLHD	... RGYQ*
301	MFGLGHNSKE	... HIGIHSC*
P19613	MFGLGHNSKE	... HIGIHSC*
M888	MFGLGHNSKE	... HIGTKFILA EK	... PLAIL*

	Периплазматический домен (96 aa)				
	250	260	270	280	290
N16961	PIEVIATGGQNNQLTLNYIHS	... PYASLLTLTMP SKCV
223	-----	...	-----	-----	-----
28	-----	...	-----	-----	-----
155	-----	...	-----	-----	-----
147	-----	...	-----	-----	-----
89	-----	...	-----	-----	-----
301	-----	...	-----	-----	-----
P19613	-----	...	-----	-----	-----
M888	-----	...	-----	-----	-----

Рисунок 2— Структура аминокислотной последовательности белка ToxR токсигенных штаммов *V.cholerae* O1 биовара Эль Тор. Стоп-кодены обозначены звездочками.

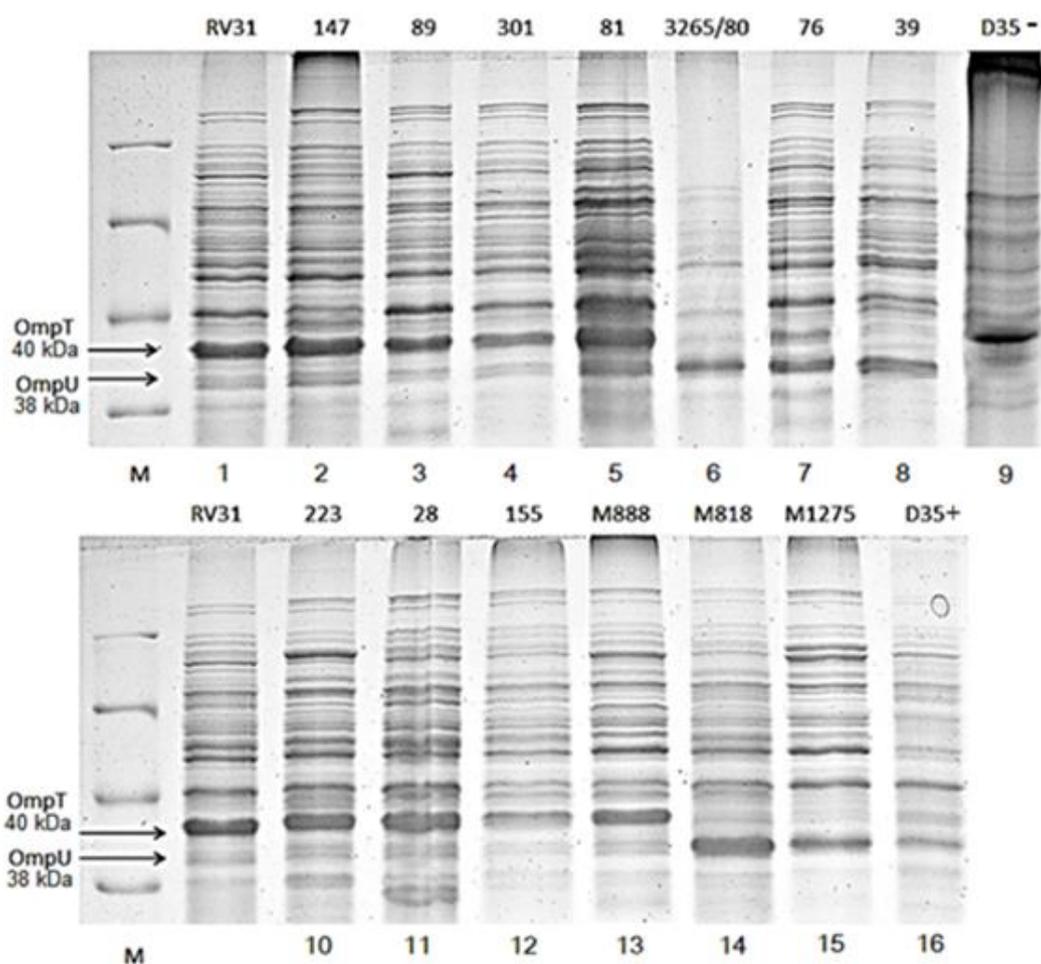


Рисунок 3 - Электрофореграмма белков внешней мембраны OmpU и OmpT токсигенных штаммов *V. cholerae* 01 биовара Эль Тор с интактным и поврежденным геном *toxR*. М – маркер молекулярного веса.

В результате было показано, что штаммы 147, 89, 301, P19613(81), 223, 28, 155, M888, несущие мутантный ген *toxR*, синтезировали белок OmpT (рисунок 7, дорожки 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13). В то же время у штаммов 3265/80, 76, 39, M818, M1275 с интактным геном *toxR* отмечалась продукция белка OmpU (рисунок 7, дорожки 6, 7, 8, 14, 15). Таким образом, было установлено, что мутация в гене *toxR* действительно привела к изменению функциональной активности белка ToxR. В отличие от штаммов с интактным геном *toxR*, мутантные по этому гену штаммы утратили белок OmpU, но стали продуцировать другой белок - OmpT.

Далее, была проведена оценка влияния мутаций в гене *toxR* на экспрессию ключевых генов патогенности - холерного токсина и токсин-коррегулируемых пилей. Для этого, с помощью метода ОТ ПЦР в реальном времени, мы оценили

уровень транскрипции генов *toxR* и *toxT*, а также генов *ctxA*, *ctxB*, и *tcpA* у выбранных модельных штаммов - 147, 89, 76 (рисунок 4).

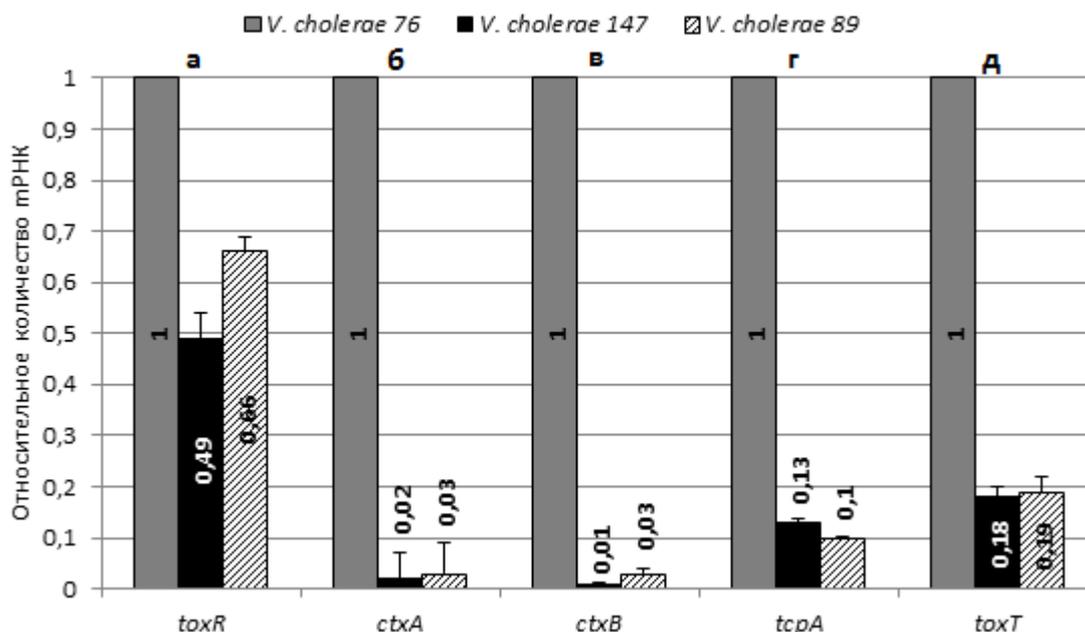


Рисунок 4 - Относительный уровень транскрипции ключевых структурных и регуляторных генов, входящих в состав генной сети вирулентности, авирулентных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор 147 и 89 *ctxA*⁺ *tcpA*⁺ в сравнении с вирулентным штаммом 76 *ctxA*⁺ *tcpA*⁺.

В результате, было выявлено значимое снижение уровня транскрипции этих генов у мутантных штаммов 147 и 89. Активность их гена *toxR* снизилась в 1,5 - 2,0 раза (рисунок 4, а). Наиболее выраженным было понижение уровня транскрипции гена *toxT* - в 5,3 раза у штамма 147 и в 5,6 раза у штамма 89 (рисунок 4, д).

Полученные данные коррелируют с результатами иммуноферментного анализа по продукции ХТ у выбранных модельных штаммов. Так, продукция токсина у штаммов 89 и 147 составляла 0,01 мкг/мл и 0,02 мкг/мл соответственно, тогда как взятые для сравнения вирулентные клинические штаммы 76 и 153 продуцировали 0,43–0,63 мкг/мл этого белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес к исследованиям variability структуры и функции генома возбудителя холеры, несущего в хромосоме регуляторные гены вирулентности, в значительной мере обусловлен выделением из водной среды различных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор с пониженной или утраченной вирулентностью, но механизм их формирования остается малоизученным. Известно лишь, что одним из механизмов возникновения таких вариантов является утрата полного генома профага СТХφ с генами холерного токсина.

Проведенные исследования позволили получить новую информацию о структурно - функциональных особенностях генома изученных штаммов. При биоинформационном анализе 20 полных геномов выделенных от больных и из воды токсигенных штаммов, имеющих генотип *ctxA+tcpA+* эпидемически опасных штаммов, но различающихся между собой по способности вызывать типичную холерную инфекцию, не было выявлено различий между ними в структуре профага СТХφ и острова патогенности VP1-1, несущих ключевые гены вирулентности. У ряда штаммов впервые было обнаружено изменение нуклеотидной последовательности глобального регуляторного гена *toxR*, расположенного в коровой части генома, обусловившее появление у них стоп-кодона. Следствие такой мутации – образование дефектного трансмембранного ДНК – связывающего белка ToxR, осуществляющего позитивный контроль экспрессии основного регуляторного гена вирулентности *toxT*, а также белка внешней мембраны OmpU. Было установлено, что мутация в гене *toxR* действительно привела к изменению функциональной активности белка ToxR. В отличие от штаммов с интактным геном

toxR, мутантные по этому гену штаммы утратили белок OmpU. Важный результат наших исследований – получение с помощью современных методов сведений о том, что утрата функции белка ToxR вследствие выявленной мутации в гене *toxR* обусловила существенное снижение мРНК регуляторных и структурных генов вирулентности у изученных штаммов выделенных из воды. Что привело к понижению экспрессии на уровне транскрипции ключевых структурных генов вирулентности и резкое снижение продукции секретируемого холерного токсина у мутантных штаммов по сравнению со штаммами с интактным геном *toxR*.

Таким образом, был показан новый механизм изменения вирулентности природных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор с генотипом *ctxA+tcpA+*. Полученные нами данные об изменении структуры и функции глобального регуляторного белка ToxR за счет ранее не описанной мутации в гене *toxR* могут обеспечить более объективную оценку уровня вирулентности различных изолятов *V. cholerae* биовара Эль Тор с генотипом *ctxA+tcpA+*, определяющего структуру и тяжесть инфекционного процесса.

ВЫВОДЫ

1. В результате биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов 20 различных токсигенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированных от больных и из водной среды, покано присутствие в их хромосоме профага СТХφ и острова патогенности VP1-1, содержащих ключевые структурные гены вирулентности *ctxAB* и *tcpA-F*, кодирующие холерный токсин и токсин-корегулируемые пили.

2. При анализе нуклеотидной последовательности глобального регуляторного гена *toxR* среди изученных штаммов холерных вибрионов Эль Тор были обнаружены изоляты с различными типами мутаций (делеции или вставки) в этом гене. Показано, что выявленные мутации привели к образованию стоп-кодонов. Установлено, что частота встречаемости мутантного гена *toxR* среди изученных штаммов была значительной и составляла 40,0%.

3. Анализ аминокислотной последовательности белка ToxR показал, что у штаммов с поврежденным геном *toxR* этот регуляторный белок является дефектным, сохранившим лишь 7,1% - 40,1% аминокислот по сравнению с интактным белком. Такие изменения структуры белка ToxR привели к нарушению его функциональной активности, которая выражалась в утрате продукции мутантами белка внешней мембраны OmpU.

4. Выявлено значительное снижение (в 7,5 – 100 раз) уровня транскрипции ключевых генов вирулентности *ctxA*, *ctxB*, *tcpA* изученных штаммов с поврежденным регуляторным геном *toxR*, определенное методом ОТ-ПЦР. Показано, что продукция секретируемого холерного токсина этими штаммами снизилась в 30–60 раз по сравнению со штаммами с интактным геном *toxR*. Существенное понижение уровня транскрипции ключевых генов вирулентности и резкое снижение продукции секретируемого холерного токсина мутантными штаммами свидетельствует об очевидном влиянии мутаций в гене *toxR* на вирулентность холерных вибрионов.