

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ
VIBRIO CHOLERAE O1 СЕРОГРУППЫ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 3 курса 331 группы

направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

биологического факультета

Федорова Андрея Витальевича

Научный руководитель

д-р биол. наук, доц.

 26.11.25.

Д.В. Уткин

Научный консультант

зав. лаб. патогенных вибрионов

ФКУН Российской противочумный

институт «Микроб»

д-р биол. наук.



С. П. Заднова

Зав. кафедрой

д-р биол. наук, доц.

 26.11.25.

Д. В. Уткин

Введение

Холера остается серьезной глобальной проблемой здравоохранения, продолжается седьмая пандемия холеры. В эндемичных странах постоянно регистрируются сезонные и спорадические вспышки холеры, вызываемые высоковирулентными генетически измененными штаммами *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор, заменившими типичные штаммы, вызвавшие начало седьмой пандемии. Ежегодно в мире холерой заболевает от 1,3 до 4 миллионов человек, из которых 21000-143000 случаев заканчиваются летально [1]. В связи с активными туристическими и миграционными процессами возбудитель холеры с эндемичных территорий завозится в различные страны, в том числе и в РФ.

Заражение человека происходит при употреблении инфицированной воды или продуктов питания. При этом часто *V. cholerae* попадает в макроорганизм в составе биопленки, что значительно повышает вероятность развития инфекционного процесса. Биопленка защищает *V. cholerae* как при нахождении в макроорганизме, так и во внешней среде [2]. Основными факторами патогенности возбудителя холеры являются холерный токсин (ХТ) и токсин-корегулируемые пили адгезии (ТКПА), продукция которых кодируется соответственно генами *ctxAB* и *tcpA-F*, расположенными в профаге СТХφ и на острове патогенности VPI-1. Транскрипция данных генов осуществляется координированно посредством сложного вирулентного каскада, включающего как положительные, так и негативные регуляторные белки, и зависит от сигналов внешней среды (присутствие солей желчных кислот, pH среды, осмолярности, температуры и т.д.), количества бактерий в популяции, а также синтезируемых клетками сигнальных молекул [3]. При этом большая часть белков-регуляторов являются многофункциональными и управляет другими важными процессами в клетках, в том числе участвующих в формировании биопленки. Необходимо отметить, что нуклеотидная последовательность генов *tcpA-F* и *ctxAB*, кодирующих основные факторы патогенности возбудителя холеры, достаточно подробно изучена в штаммах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, завезенных и

выделенных на территории РФ и сопредельных стран, в то же время структура белков-регуляторов исследована фрагментарно.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключается в проведении сравнительного анализа структуры регуляторных генов штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в разные годы седьмой пандемии холеры на территории России и сопредельных стран. В соответствии с поставленной целью сформулированы следующие задачи:

- 1) провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 13 локусов, кодирующих регуляторные белки, контролирующие биосинтез основных факторов патогенности и формирование биопленки в штаммах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор;
- 2) изучить влияние выявленных мутаций в регуляторных генах на продукцию холерного токсина и способность к формированию биопленки штаммами *V. cholerae* O1 Эль Тор;
- 3) провести филогенетический анализ по полным нуклеотидным последовательностям исследуемых штаммов и сопоставить их распределение по кластерам со структурой регуляторных генов;
- 4) создать базу данных, включающую информацию о структуре генов, кодирующих регуляторные белки *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в разные годы седьмой пандемии холеры.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были 9 штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, завезенных и выделенных на территории РФ и сопредельных стран, с разной структурой регуляторных генов: M1270, M1293, M1327, P-17644, M1344, P-18899, 153, M1509, 3265/80. Штаммы хранятся в лиофильно высушенном состоянии в государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Также в работе использовались нуклеотидные последовательности полных геномов 75 геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор, завезенных и выделенных на территории РФ и сопредельных стран, и изолированных в эндемичных странах Азии, Африки, а также Гаити с 1988 по 2025 гг., представленные в базах данных NCBI GenBank и VGARus .

В работе использовались микробиологические и биоинформационные методы исследования.

Микробиологические методы

Продукцию холерного токсина устанавливали с использованием иммуноферментного метода GM₁ ELISA. Штаммы выращивали в условиях оптимальных для продукции ХТ Эль Тор вибрионами – бульон АКІ (1,5 % Бакто пептона, 0,4% дрожжевого экстракта Дифко, 0,5 % NaCl, 0,3 % NaHCO₃, pH 7,6) при температуре 37 °С. Полученный культуральный супернатант добавляли в объеме 100 мкл в лунки микроплат («Dynatech Microelisa»), предварительно сенсибилизованных моносialоганглиозидом GM₁ («Sigma», США) (2 мкг/мл в карбонатном буфере, pH 9,0). В качестве коньюгата использовали Ig (H+L) антитела кролика, коньюгированные с пероксидазой хрена (Gibco-BRL). Для проявления реакции применяли 0,1 % ABTS («Sigma», США) в цитратном буфере (pH 4,0) с добавлением 0,03 % перекиси водорода. Реакцию учитывали через 15 мин после добавления субстрата (0,003 % перекиси водорода в цитратном буфере pH 4,0 с 0,1 % ABTS (2,2 arino-di-thylbenzthiazoline sulphonate) путем спектрофотометрии на фотометре «Stat Fax 2100» (США) при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля использовали физиологический раствор, в качестве положительного – раствор очищенного холерного токсина в концентрации 100 нг/мл. Эксперименты ставили в 3-х кратной повторности.

Способность штаммов формировать биопленку изучали по методу, описанному Nesper et al. (2001). Бактерии выращивали в течение ночи в LB бульоне, разбавляли 1:100 в свежей среде LB, затем 100 мкл аликовоты помещали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем культуру удаляли, а лунки промывали три раза дистиллированной водой, образовавшиеся биопленки фиксировали 2,5 % глутаральдегидом, окрашивали 200 мкл 0,4% раствора генцианвиолета и трижды промывали. После растворения биопленки в 300 мкл смеси этанола и ацетона

(80:20) определяли оптическую плотность раствора при 570 нм в ИФА-ридере (Bio-Rad, Германия).

Биоинформационные методы

Для последовательностей штаммов, которые были депонированы только в виде прочтений (архив NCBI SRA), проводили контроль качества прочтений с помощью программы fastp v.0.24.0 [4] и сборку с помощью алгоритма unicycler v.0.4.7 [5]. Далее в полученных сборках и в геномах штаммов, депонированных в базы NCBI GenBank и VGARus в виде собранных контигов, проводили поиск последовательностей исследуемых генов. Для упрощения и автоматизации этого процесса была написана программа на языке python3, принимающая в качестве ввода набор генов из референтного штамма и геномы в формате fasta, в которых будет проводиться поиск референтных генов с помощью алгоритма выравнивания blastn [6]. На выходе программа формирует таблицу, содержащую последовательности всех найденных генов для каждого штамма и множественные выравнивания этих генов в формате fasta. Просмотр полученных множественных выравниваний, поиск нуклеотидных замен проводили в программном пакете UGENE [7]. В качестве референтного использовали геном *V. cholerae* N16961 (AE003852.1). Для проведения филогенетического анализа использовали сервер REALPHY [8], визуализацию и окончательное оформление полученного филогенетического дерева осуществляли на онлайн-платформе iTOL [9].

Структура и объём работы. Работа изложена на 53 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников, приложение. Работа проиллюстрирована 3 таблицами и 8 рисунками. Список использованных источников включает 52 наименования.

Научная новизна.

Впервые проведено исследование 13 генов белков-регуляторов в геномах 75 штаммов *V. cholerae* различного происхождения.

Полученные аллельные профили штаммов впервые соотнесены с данными полногеномной филогенетии.

Значительно пополнены генотипические характеристики геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор за счет изучения аллелей регуляторных генов, которые наряду с генами факторов патогенности могут влиять на эпидемический потенциал патогена.

Практическая значимость.

Сформирована база данных, включающая место и время выделения штаммов, аллель гена *ctxB* и последовательности 13 регуляторных генов 75 исследуемых штаммов, которая может быть использована для разработки новых диагностических препаратов.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об организации генома *Vibrio cholerae*, мобильных генетических элементах, включающих в себя основные гены патогенности, вирулентности и персистенции, механизмах регуляции экспрессии основных факторов патогенности, а также характеристике генетической структуры различных вариантов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в ходе трех волн седьмой пандемии холеры.

В главе «Результаты исследования» изложены данные о структуре 13 регуляторных генов (*toxT*, *aphA*, *aphB*, *luxO*, *luxT*, *gntR*, *hapR*, семейства *lysR* транскрипционных регуляторов (*vc2383*, *vc1617*), *hns*, *vieA*, *carR*, *carS*) 75 штаммов *V. cholerae*, геномы которых представлены в базах данных, результаты полногеномной филогении на описанной выборке и экспериментально полученные данные о способности 9 исследуемых штаммов продуцировать холерный токсин и образовывать биопленку.

В ходе исследования структуры 13 регуляторных генов определены аллели указанных локусов и частота их встречаемости. Среди изученных генов наибольшая стабильность отмечена для генов *gntR*, *aphB*, *luxT*, *carS* – образование только одного аллеля, который в первом случае характеризуется

наличием единичной мутации, а в остальных – последовательностью, полностью идентичной таковой референс-штамма. По два аллеля имели гены *toxT*, *aphA*, *hns*, *vieA*, *lysR_vc1617*, *carR*, три аллеля – ген *lysR_vc2383*. У гена *hapR* было обнаружено семь аллелей, и наиболее вариабельным оказался ген *luxO*, у которого было обнаружено 16 аллелей. Данные, полученные в результате изучения структуры регуляторных генов, были обобщены в созданной базе данных «Структура регуляторных генов штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор». База данных содержит последовательности 13 генов, регулирующих экспрессию основных факторов патогенности *V. cholerae*, информацию о месте и времени выделения каждого штамма и информацию об аллеле гена *ctxB*.

Для оценки филогенетических связей геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор, завезенных в РФ и сопредельные страны и циркулирующих на эндемичной территории, по полным генетическим последовательностям 75 исследуемых штаммов было построено филогенетическое дерево методом maximum likelihood. В качестве референса использовалась последовательность генома N16961. На полученном дереве, представленном на рисунке 1, филогенетические ветви обозначены цветами, а каждый лист, соответствующий геному штамма, соотнесен с аллельным профилем по изучаемым генам. Черные квадраты на диаграмме обозначают присутствие измененных генов, белые квадраты – структура гена идентична гену референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 Эль Тор. В результате все штаммы разделились на 4 группы, каждой из которых соответствовал определенный набор мутаций в регуляторных генах относительно референсного генома. Ветвь I характеризуется всего одной заменой *gntR* (G565A), она включает в себя ранние геноварианты, обладающие токсином классического типа (аллель *ctxB1*), выделенные как на территории эндемичных стран, так и в странах СНГ. Большинство штаммов этой ветви изолированы в период 1990-2000 гг., однако в нее также вошел и штамм M-3210, выделенный в 2023 г. в Ростов-на-Дону.

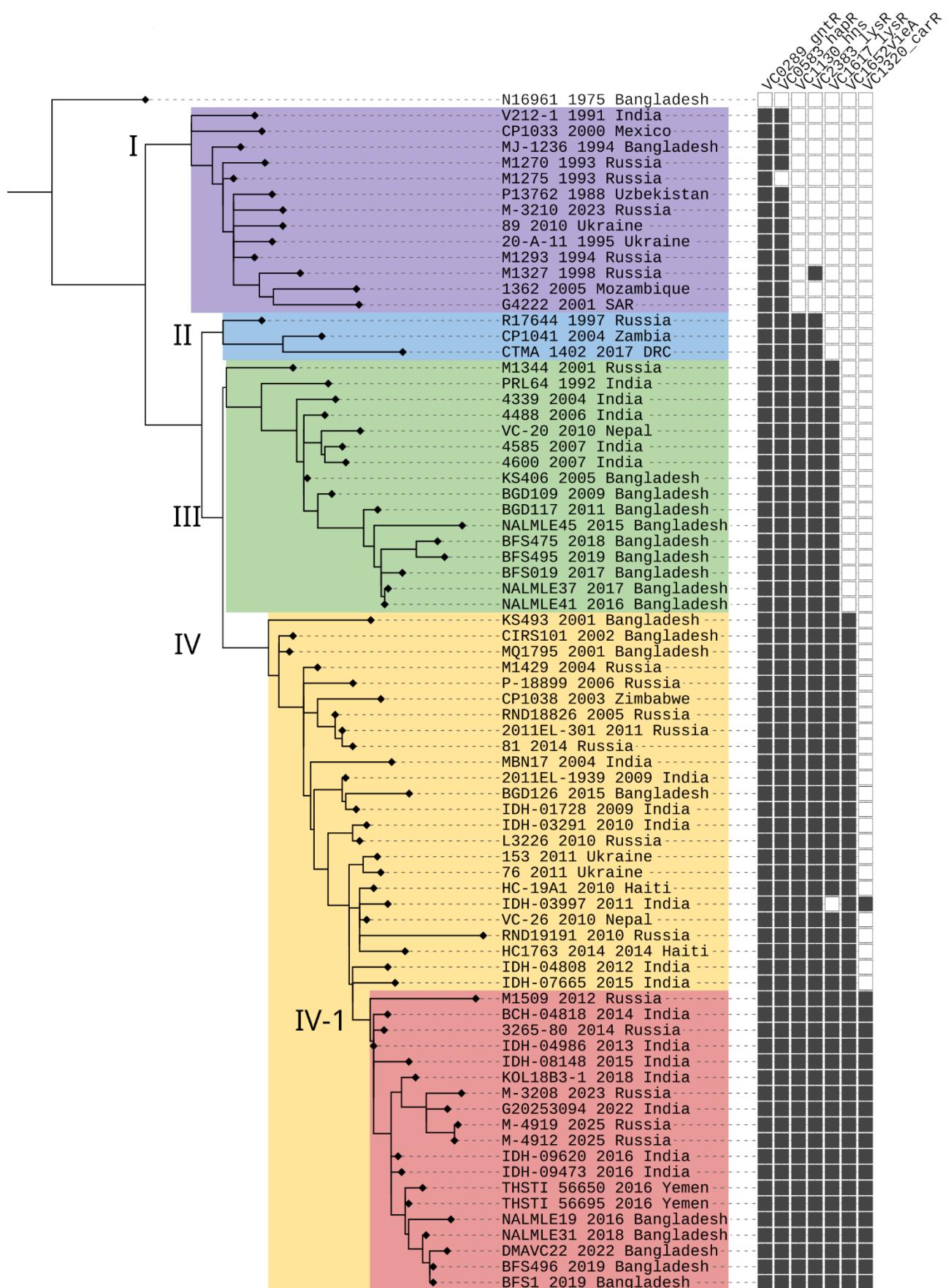


Рисунок 1 — Филогенетическое дерево, построенное методом maximum likelihood относительно нуклеотидной последовательности полного генома референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 Эль Тор

Ветвь II состоит всего из трех изолятов, выделенных на территории стран Африки и в России с 1997 по 2017 гг, и характеризуется тремя мутациями: *gntR* (G565A), *lysR_vc2383* (C110T) и *hns* (G319A). Ветвь III сформирована штаммами, выделенными преимущественно на территории Бангладеш и Индии, однако в ней также есть один геном штамма, изолированного в России. Геномы этой ветви включают в себя еще одну мутацию: A650C в локусе *lysR_vc1617*.

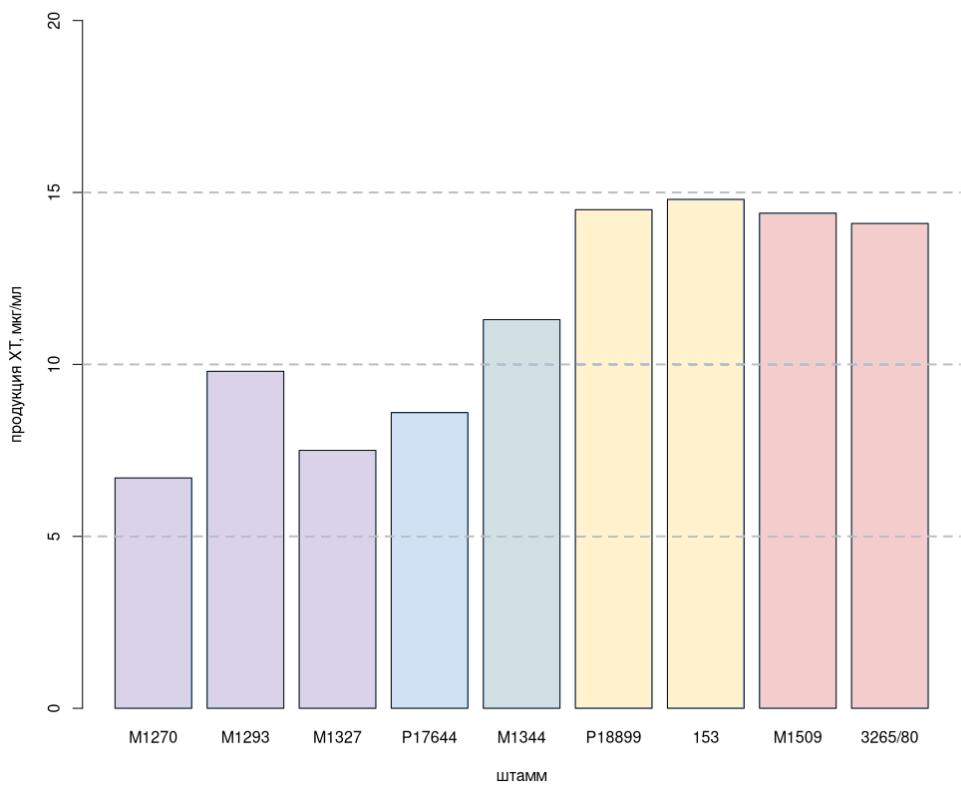
Наконец, наиболее крупная ветвь IV также состоит из геновариантов, выделявшихся как на эндемичных территориях, так и на территории России и стран СНГ. В данную группу вошли штаммы из Индии и Бангладеш, а также изоляты, выделенные при эпидемии на Гаити (2010 г.). Штаммы данной ветви включают мутации *gntR* (G565A), *lysR_vc2383* (C110T), *hns* (G319A), *lysR_vc1617* (A650C), *vieA* (C235T). Стоит так же отметить, что штаммы RND18226 (2005, Тверь), 2011EL-301 (2011, Таганрог) и 81 (2014, Ростов-на-Дону), с не повторяющейся больше заменой G424T в гене *luxO*, формируют отдельную маленькую ветвь, имеющую общего предка со штаммом CP1038, выделенным в Зимбабве в 2003 году. Отдельную группу внутри данной ветви, обозначенную как IV-1, составили штаммы, выделяемые с начала 2010-х года по настоящее время. В том числе в нее вошли изоляты, выделенные в ходе опустошительных эпидемий холеры в Йемене (2016-2017 гг.). Для всех этих штаммов характерен генотип *gntR* (G565A), *lysR_vc2383* (C110T), *hns* (G319A), *lysR_vc1617* (A650C), *vieA* (C235T), *carR* (G265A).

Таким образом, каждая филогенетическая группа представлена штаммами, выделяемыми в период 15-20 лет как на эндемичных по холере территориях, так и на территориях РФ и стран СНГ, куда они были завезены. Полногеномная филогенетическая картина соотносится с постепенным накоплением мутаций в регуляторных генах.

Для изучения влияния измененных регуляторных белков на продукцию холерного токсина и способность формирования биопленки были изучены указанные свойства у геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор, завезенных в разные годы седьмой пандемии на территорию РФ. В ходе количественной оценки

продукции холерного токсина установлено, что наибольшее количество ХТ среди исследуемых штаммов синтезируют штаммы *V. cholerae* P18899, 153, M1509 и 3265/80 (рисунок 2). Цветами столбцов обозначена принадлежность штаммов к различным ветвям на филогенетическом дереве (рисунок 1)

Рисунок 2 — Продукция ХТ у геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор с разной



структурой регуляторных генов

Штаммы 153, M1509 и 3265/80 относятся к геновariantам, имеющим аллели *ctxB7*, *tcpA^{Cirs}* и генотип *gntR* (G565A), *hapR*, *lysR_vc2383* (C110T), *hns* (G319A), *lysR_vc1617* (A650C), *vieA* (C235T), *carR* или *carR* (G265A). Изоляты с такой структурой генома входят в состав IV ветви на филогенетическом дереве (рисунок 6). Полученные нами сведения согласуются с данными литературы о том, что указанные геновariantы способны продуцировать в несколько раз больше ХТ, чем более ранние Эль Тор вибрионы. Таким образом, мутации в регуляторных генах ведут к изменению регуляции экспрессии основных факторов патогенности и к повышению продукции ХТ. Необходимо проведение дальнейших исследований на большей выборке штаммов и с расширением числа

изучаемых регуляторных генов. Обобщая полученные данные, можно сказать, что появление и накопление мутаций в регуляторных генах в ходе эволюции генома *V. cholerae* способствовало повышению продукции холерного токсина и появлению более вирулентных штаммов возбудителя.

Способность к формированию биопленки у штаммов разных филогенетических ветвей варьирует, но также прослеживается тенденция к увеличению данного свойства (рисунок 3). Цвета столбцов также соответствуют принадлежности штаммов к различным ветвям на филогенетическом дереве (рисунок 1), и, следовательно, разным аллельным профилям по исследуемым регуляторным генам.

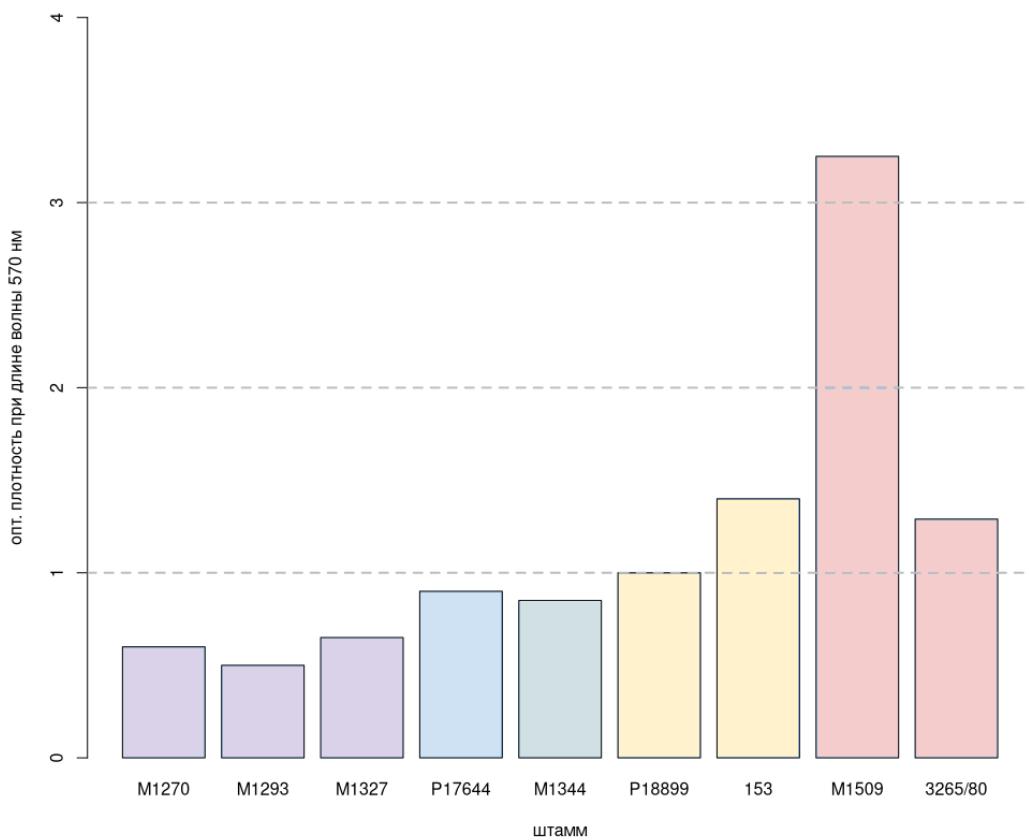


Рисунок 3 — Оценка способности геновариантов с разной структурой регуляторных генов к образованию биопленки

При проведении исследований обнаружен штамм *V. cholerae* M1509, обладающий наибольшей способностью к формированию биопленки и превосходящий другие исследуемые штаммы по данному свойству в 2-3 раза

(рисунок 3). Изучение механизмов повышенной способности данного штамма формировать биопленку будет задачей наших дальнейших исследований.

Таким образом, установлено, что некоторые мутации в регуляторных генах не оказывают значимого влияния на продукцию холерного токсина и способности к образованию биопленки. Однако определенная их комбинация (*hapR* (int), *lysR_vc2383* (C110T), *hns* (G319A), *lysR_vc1617* (A650C), *vieA* (C235T), *carR* (G265A) характерна для высоковирулентных штаммов, синтезирующих значительное количество холерного токсина (14,1-14,8 мкг/мл) и способных формировать хорошо выраженную биопленку *in vitro*. Можно высказать предположение, что повышение вирулентности геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор явилось результатом изменения регуляторных механизмов вследствие появления мутаций в генах *ctxB* и *tcpA*, кодирующих биосинтез основных факторов патогенности, а также в регуляторных генах.

Выводы

1. Проведен анализ структуры 13 регуляторных генов геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных в разные годы (1993-2025 гг.) текущей пандемии холеры на эндемичных и неэндемичных по холере территориях. Установлено, что нуклеотидная последовательность ряда генов (*toxT*, *aphA*, *aphB*, *luxT*, *carS*), несмотря на появление различных аллелей генов *ctxB* (*ctxB1*, *ctxB7*) и *tcpA* (*tcpA^{Eltor}*, *tcpA^{Cirs}*), остается неизменной на протяжении более 30 лет, что может указывать на их важную роль в биологии возбудителя.

2. Установлено, что мутации в регуляторных генах геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор накапливались постепенно, некоторые из них не оказывали значительного влияния на продукцию холерного токсина и способность формировать биопленку, в тоже время сочетание других способствовало их повышению. Для современных геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор характерен следующий генотип: *hapR* (insT219), *lysR_vc2383* (C110T), *hns* (G319A), *lysR_vc1617* (A650C), *vieA* (C235T), *carR* (G265A).

3. При филогенетическом анализе полных генетических последовательностей все изученные штаммы, выделенные в разных эндемичных странах и завезенные в РФ и сопредельные страны, четко разделились на кластеры в соответствии со структурой регуляторных генов *lysR_vc2383*, *hns*, *lysR_vc1617*, *vieA*, *carR*.

4. Создана база данных «Структура регуляторных генов штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор», содержащая информацию о времени и месте выделения 75 геновариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор, а также аллеле *ctxB* и структуре 13 регуляторных генов. База данных может быть использована для проведения научных исследований и создания новых диагностических препаратов.

Список использованных источников

1 Nucleoid-associated proteins shape the global protein occupancy and transcriptional landscape of a clinical isolate of *Vibrio cholerae* / Y. Rakibova [et al.] // mSphere. – 2024. – V. 9. – № 7. – P. e0001124.

2 Watnick, P. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm / P. Watnick, R. Kolter // Molecular Microbiology. – 1999. – V. 34. – № 3. – P. 586-595.

3 Faruque, S. *Vibrio cholerae*: genomics and molecular biology / S. Faruque – Horizon Scientific Press, 2008. – P. 218.

4 fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor / S. Chen [et al.] // Bioinformatics. – 2018. – V. 34. – № 17. – P. i884-i890.

5 Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads / R. R. Wick [et al.] // PLoS computational biology. – 2017. – V. 13. – № 6. – P. e1005595.

6 BLAST+: architecture and applications. / C. Camacho [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2009. – V. 10. – P. 421.

7 Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. / K. Okonechnikov [et al.] // Bioinformatics. – 2012. – V. 28. – № 8. – P. 1166-1167.

8 Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. / F. Bertels [et al.] // Molecular biology and evolution. – 2014. – V. 31. – № 5. – P. 1077-1078.

9 Letunic I. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. / I. Letunic, P. Bork // Nucleic Acids Research. – 2024. – V. 52 – № W1 – P. W78-W82.