

Н. М. Замалютдинова, И. Р. Галиева, А. О. Арапова,
Е. О. Михайлова, М. Р. Шарипова, А. М. Марданова

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ ТРИБЫ *PROTEEEAE*

Ключевые слова: идентификация, энтеробактерии, протеиназы, зимография.

Микробиологическими и молекулярно-биологическими методами идентифицированы бактерии трех родов энтеробактерий - *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*. С использованием различных белковых субстратов исследована вне- и внутриклеточная протеолитическая активность этих штаммов. *Proteus mirabilis* обладает высокой внеклеточной протеолитической активностью. В клеточных экстрактах *Morganella* и *Providencia* обнаружены внутриклеточные протеиназы расщепляющие желатин.

Keywords: identification, enterobacteriaceae, proteinases, zymography.

The three genera of Enterobacteriaceae bacteria - *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* were identified by microbiological and molecular-biological methods. Extracellular and intracellular proteolytic activities of these strains were investigated with the use of various protein substrates. *Proteus mirabilis* has high extracellular proteolytic activity. Intracellular proteases cleaving gelatine were found in *Morganella* and *Providencia* cell extracts.

Введение

Семейство *Enterobacteriaceae* включает более 50 родов, которые объединяют много видов патогенных и условно-патогенных для человека бактерий. По современной классификации три рода энтеробактерий, *Proteus*, *Morganella* и *Providencia*, объединяют в трибу *Proteeae* [1]. Представители этих родов вызывают оппортунистические и госпитальные инфекции различной локализации. Чаще всего это инфекции мочевыводительных путей, хотя возможны инфекции дыхательных путей, кожи, слизистых оболочек. Описаны случаи сепсиса, бактериемии и менингита [2,3]. *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* обладают различными факторами вирулентности – адгезинами, уреазой, фимбриями и др. [4]. Внеклеточная протеиназа *P. mirabilis* способна расщеплять иммуноглобулины и рассматривается как один из факторов вирулентности [5]. Данные о внутриклеточных протеиназах *Proteus* и о протеолитических ферментах бактерий р. *Morganella* и *Providencia* отсутствуют. Неизвестна роль протеолитических ферментов в вирулентности этих патогенов. Показано, что предобработка патогенных бактерий гомосеринлактоном приводит к повышению устойчивости протеаз [6].

Целью данной работы была идентификация клинических изолятов, представителей р. *Proteus*, *Morganella* и *Providencia*, а также сравнительная характеристика протеолитической активности этих штаммов с использованием различных белковых субстратов.

Материалы и методы исследования

Штаммы бактерий (*Proteus sp.* 17 и 57) были получены от профессора, д.б.н. С.Ю. Хайтлиной (институт цитологии, РАН, Санкт-Петербург) и *Providencia sp.* 6 – музея кафедры микробиологии ИФМиБ.

Бактерии культивировали при 37°C с интенсивностью качания 200 об/мин (вибростенд, В. Braun, Германия). В качестве инокулята использовали 12 часовую культуру, выращенную на

среде LB [7] (%): триптон - 1.0, дрожжевой экстракт - 0.5, NaCl - 0.5, pH 8.5. Среда LBA содержала 2% агара. Для определения казеинолитической активности использовали среду (г/л): казеин – 5, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5, агар - 2%.

Определение общего количества белка проводили по методу М. Брэдфорд [8].

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при длине волны 590 нм. Количество биомассы выражали в единицах светопоглощения в кювете толщиной 1 см.

Идентификацию бактерий проводили по классическим микробиологическим методам [9] и молекулярно-биологическому методу, основанному на гомологии 16S рРНК [10].

Получение клеточного лизата проводили следующим образом: 200 мл культуральной жидкости центрифугировали при 13000 об/мин, осадок отмывали дважды в растворе 0.8% NaCl. Клетки ресуспендировали в 0.1 мМ CaCl₂, 5 мМ трис-НСl с pH 7.5 и подвергали ультразвуковому воздействию при 4°C в течение 8 - 9 секунд 8 раз с интервалом в 60 секунд. Для удаления разрушенных клеток и их обломков суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 20000 об/мин и 4°C. Клеточный экстракт отбирали и замораживали до использования.

Расщеплению азоказеина проводили по методу [11]. За единицу активности принимали такое количество активности, которое приводит к повышению поглощения на 0.1 единицы.

Протеолитическое расщепление актина проводили по методу, описанному в работе [12].

Для электрофореза белков в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия использовали стандартную методику [13].

Зимографию в ПААГ с желатином (1 мг/мл) осуществляли согласно методу [14].

Математическую обработку данных проводили в программной среде «Microsoft Excel» путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$. В

качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

Результаты исследований и их обсуждение

Бактериальные штаммы № 17 и 57 были выделены от урологических больных и предварительно идентифицированы как представители рода *Proteus*, штамм 6 – *Providencia*. Была проведена дифференцировка штаммов до вида с использованием классических микробиологических тестов и молекулярно-биологического метода, основанного на гомологии 16 S рНК. Результаты изучения различных признаков штаммов представлены в таблице 1, из которой видно, что штаммы №17, 57 и 6 различаются по ряду признаков. На основании изученных свойств штамм 17 можно отнести к роду *Proteus*, штамм 57 к роду *Morganella*, а штамм 6 – *Providencia*. Однако для представителей рода *Morganella*, как правило, не характерно наличие гемолитических свойств. А штамм 57 проявил слабые гемолитические свойства. Используемый набор микробиологических тестов не позволяет сделать однозначный вывод о принадлежности исследуемых культур к тем или иным видам. Для более точной идентификации необходимо использование современных молекулярно-биологических методов.

Таблица 1 – Микробиологическая характеристика штаммов бактерий

| Исследуемые свойства | №17 | №57 | №6 | <i>Proteus</i> | <i>Providencia</i> | <i>Morganella</i> |
|----------------------|-----|-----|----|----------------|--------------------|-------------------|
| Окраска по Граму | - | - | - | - | - | - |
| Подвижность | + | + | + | + | + | - |
| Роение (2% агар) | + | - | - | +/- | - | - |
| Протеолиз казеина | + | - | - | + | - | - |
| Гемолиз | +++ | + | + | +/- | + | - / + |
| Синтез сероводорода | + | - | - | + | - | - |
| Расщепление глюкозы | + | + | + | + | + | + |
| Расщепление мальтозы | + | + | - | + | - | - |
| Расщепление маннита | - | + | - | - | - | + |
| Расщепление сахарозы | + | + | + | + | +/- | - |

С целью идентификации микроорганизмов по последовательности гена 16S рНК из клеток была выделена тотальная ДНК и проведена ПЦР-реакция с праймерами к гену 16S рНК. ДНК-

продукты были секвенированы в компании «СИНТОЛ» и затем последовательности генов 16 S рНК были проанализированы на гомологию с известными генами в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Идентификация бактериальных штаммов на основании гомологии гена 16 S рНК

| Штамм | Результат секвенирования |
|-------|---|
| № 17 | <i>Proteus mirabilis</i> strain CIFRI Ch-TSB28, 99% <i>Proteus mirabilis</i> strain CIFRI Ch-TSB30, 99% <i>Proteus mirabilis</i> strain FUA1240, 99% <i>Proteus mirabilis</i> strain CIFRI P-TSB-13, 99% <i>Proteus mirabilis</i> strain FFL2, 99% <i>Proteus mirabilis</i> strain HI4320, 99% |
| № 57 | <i>Morganella morgani</i> strain 3B4A, 98% |
| № 6 | <i>Providencia stuartii</i> strain S2SA-Sa 97% |

Таким образом, полученные данные позволяют идентифицировать штамм 17 как *P. mirabilis* с вероятностью 99%, штамм 57 как *M. morgani* с вероятностью 98%, а штамм 6 как *P. stuartii* с вероятностью 97%.

Для определения наличия внеклеточных протеолитических ферментов, расщепляющих казеин, выращивали бактерии на молочном агаре. Показано, что протеолитическую активность в отношении казеина проявляет только штамм *P. mirabilis* (рис. 1). Вокруг колоний штаммов *M. morgani* и *P. stuartii* не обнаружено зоны просветления среды. Кроме того, видно, что колония *P. mirabilis* образует концентрические круги, что характерно для роящихся штаммов. Эти результаты согласуются с данными литературы, согласно которым многие штаммы р. *Proteus*, способные к роению, могут секретировать протеазы, расщепляющие казеин [15]. Известно, что только представители р. *Proteus* способны к ползучему росту на среде, содержащей 2% агара. Бактерии р. *Morganella* и *Providencia* такой способностью не обладают.

Таким образом, только штамм *P. mirabilis* 17 обладал выраженной внеклеточной протеолитической активностью, и это коррелировало со способностью штамма к роению.

Исследовали внутриклеточную протеолитическую активность в штаммах энтеробактерий с использованием трех белковых субстратов – азоказеина, желатина и актина. Протеолитическую активность по расщеплению

азоказеина определяли в клеточных экстрактах 24 и 48 часовых культур, полученных при разрушении клеток ультразвуком. На рисунке 2 представлены результаты исследования активности в клетках на 48 час роста. Видно, что в клетках штамма *P. mirabilis* активность по отношению к азоказеину проявляется на низком уровне, в то время как в клетках штамма *M. morgani* эта активность выше в 4-4.5 раз, а в клетках *P. stuartii* – в 2 раза.

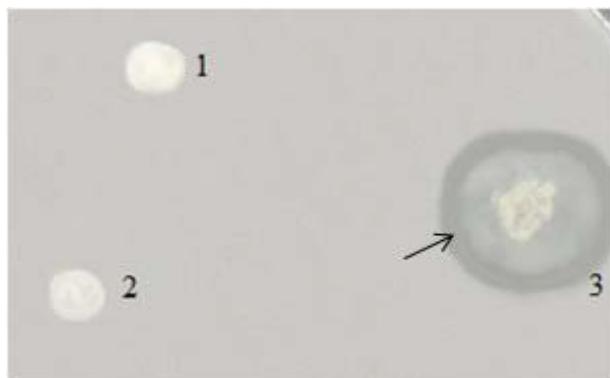


Рис. 1 – Рост клинических изолятов на молочном агаре. 1 – *M. morgani*. 2 – *P. stuartii*. 3 – *P. mirabilis*. Стрелкой показана зона гидролиза казеина молока

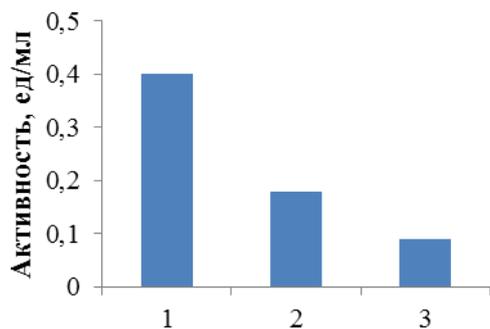


Рис. 2 – Расщепление азоказеина клеточными лизатами энтеробактерий. 1 – *M. morgani*, 2 – *P. stuartii*, 3 – *P. mirabilis*

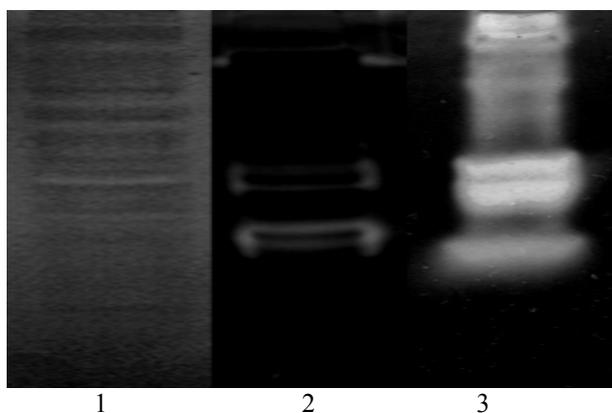


Рис. 3 – Зимография клеточных лизатов энтеробактерий, субстрат – желатин. 1 – *P. mirabilis*, 2 – *P. stuartii*, 3 – *M. morgani*

Расщепление желатина исследовали методом зимографии, который позволяет визуализировать в пробах белки, обладающие

способностью расщеплять белковые субстраты, что проявляется в виде прозрачной зоны или зон на голубом фоне геля. Исследование клеточных лизатов энтеробактерий на 24 час культивирования не выявило ферментов, способных расщеплять желатин. Однако в клетках на 48 час культивирования обнаружена внутриклеточная активность (рис. 3). Также как и в случае с азоказеином наибольшую активность проявил штамм *M. morgani*. В экстракте обнаружено несколько пептидных зон, обладающих высокой активностью в отношении желатина (м.м 25-35 кДа, а также в высокомолекулярной области). В лизате бактерий шт. *P. stuartii* меньше протеолитической активности, расщепляющей желатин.

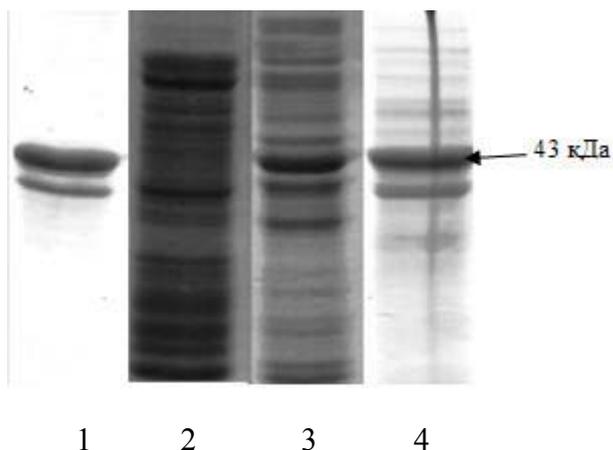


Рис. 4 – Расщепление актина клеточными лизатами энтеробактерий. 1 – актин, 2 – клеточный лизат *M. morgani* + актин, 3 – клеточный лизат *P. mirabilis* + актин, 4 – клеточный лизат *P. stuartii* + актин

Все три штамма были исследованы на наличие внутриклеточных протеолитических ферментов, способных специфически расщеплять актин. Изучали активность в клетках на 48 час культивирования. Расщепление актина контролировали электрофоретически по исчезновению пептидной зоны, соответствующей актину (пептид с молекулярной массой 43 кДа) (рис. 4). Из трех штаммов только клеточный экстракт *M. morgani* проявлял активность по отношению скелетно-мышечного актина, расщепляя его неограниченно. Клеточные экстракты *P. mirabilis* и *P. stuartii* не проявляли активности по отношению к актину.

Таким образом, виды бактерий, относящиеся к трибе *Proteeae*, различаются по протеолитической активности. Только вид *P. mirabilis* проявляет высокую внеклеточную протеолитическую активность, что соотносится со способностью штамма к роению. В тоже время самая высокая внутриклеточная активность обнаружена в бактериях *M. morgani* при использовании в качестве субстратов азоказеина и желатина. Аналогичная активность в клетках *P. stuartii* была гораздо ниже. Из трех штаммов только в клетках *M. morgani* обнаружена активность,

расщепляющая актин неограниченно. Обнаруженные различия в спектре протеолитических ферментов могут отражать различия в вирулентности бактерий, относящихся к разным родам энтеробактерий. Изучение протеиназ патогенов важно с точки зрения поиска новых мишеней для понимания механизмов развития и терапии инфекционных заболеваний.

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2012-2013 гг. соглашение № 14.А18.21.1516.

Литература

1. С.М. О'Нара, F.W. Brenner, J.M. Miller, *Clin Microbiol Rev.*, **13**, 4, 534–546 (2000).
2. D. Juyal, V.K. Rathaur, N. Sharma, *J. Clin Diagn Res.*, **7**, 2, 369–370 (2013).
3. K. Tanaka, T. Haraguchi, F. Yamamichi, M. Muramaki, H. Miyake, M. Fujisawa, *Korean J Urol.*, **54**, 3, 189–193 (2013).
4. M.M. Pearson, M. Sebahia, C. Churcher, M. A. Quail, A.S. Seshasayee, N.M. Luscombe, *J Bacteriol.*, **190**, 4027–4037 (2008).
5. P. Van, R. Belas, B.F. Gilmore, H. Ceri, *Infection and Immunity*, **76**, 11, 4859–4864 (2008).
6. Н.В. Белоногова, А.Б. Маргулис, В.Я. Понамарев, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская, *Вестник Казанского технологического университета*, **15**, 23, 109–112 (2012).
7. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989, 2344 p.
8. M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254 (1976).
9. О.К. Поздеев, *Медицинская микробиология*. ГЭОТАР-МЕД, Москва, 2001, 765 с.
10. J.M. Janda, S.L. Abbott, *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 9, 2761–2764 (2007).
11. C. Wassif, D. Cheek, R. Belas, *J. Bacteriol.*, **177**, 20, 5790–5798 (1995).
12. О.А. Цаплина, Т.Н. Ефремова, Л.В. Кевер, Я.Ю. Комиссарчик, И.В. Демидюк, С.В. Костров, С.Ю. Хайтлина, *Биохимия*, **74**, 797–804 (2009).
13. U.K. Laemmli, *Nature (London)*, **227**, 680–685 (1970).
14. G.W. Oliver, W.G. Stettler-Stevenson, D.E. Kleiner, In: *Handbook of proteolytic enzymes*. Acad. Press, San Diego, 1999, P. 61–76.
15. B. W. Senior, *J. Med. Microbiol.*, **48**, 623–628 (1999).

© **Н. М. Замалютдинова** - асп. каф. микробиологии К(П)ФУ; **И. Р. Галиева** – студ. К(П)ФУ; **А. О. Арапова**- магистр К(П)ФУ; **Е. О. Михайлова** - канд. биол. наук, доц. каф. химической кибернетики КНИТУ, katty_o_m@rambler.ru; **М. Р. Шарипова** - д-р биол. наук, проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, marsharipova@gmail.com; **А. М. Марданова** - канд. биол. наук, доц. той же кафедры, mardanovaayslu@mail.ru.