

Л. Ф. Миннуллина, Н. М. Замалютдинова, Е. О. Михайлова,
М. Р. Шарипова, А. М. Марданова

ГЕН МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *MORGANELLA MORGANII*

Ключевые слова: *Morganella morganii*, протеиназа, биоинформационный анализ, промотор.

Биоинформационный анализ генома *Morganella morganii* subsp. *morganii* КТ позволил идентифицировать в нем гомолог гена гримелизина *Serratia grimesii*. Ортологи гена гипотетической металлопротеиназы *M. morganii* обнаружены в геномах разных видов *Enterobacteriaceae* и представителей других семейств. В промоторной области гена металлопротеиназы *M. morganii* идентифицированы сайты -10 и -35, а также последовательность Шайна-Дальгарно. С помощью праймеров, сконструированных к гену *M. morganii* subsp. *morganii* КТ, был амплифицирован ген металлопротеиназы из генома клинического изолята *M. morganii* ZM. Секвенирование ПЦР-амплификата и BLAST-анализ выявил 83% гомологию нуклеотидных последовательностей генов.

Keywords: *Morganella morganii*, proteinase, bioinformatic analysis, promoter.

Using bioinformatic analysis of *Morganella morganii* subsp. genome we identified gene homologous of grimeyzin gene of *Serratia grimesii*. We identified genes orthologous to the gene of *M. morganii* hypothetical metalloprotease in the genomes of several species of *Enterobacteriaceae* and representatives of other families. In the promoter region of metalloprotease *M. morganii* -10 and -35 sites and also Shine-Dalgarno sequence were identified. Using primers designed for *M. morganii* subsp. КТ gene metalloprotease gene from *M. morganii* ZM clinical isolate was amplified. PCR-amplificate sequencing and BLAST processing revealed 83% gomology of the genes.

Введение

Morganella morganii – условно-патогенная бактерия, относящаяся к семейству *Enterobacteriaceae*. Является возбудителем оппортунистических госпитальных инфекций, включая инфекции мочеполового тракта, ран и кожи. Эти бактерии продуцируют различные факторы вирулентности, например, уреазу, гемолизины, липополисахариды, адгезины, а также ферменты, гидролизующие и модифицирующие антибиотики [1]. В 2012 году описан случай смертельной инфекции среди кур, вызванной *M. morganii* [2]. Показана роль *M. morganii* в формировании фронтального абсцесса мозга у женщины [3], в редких случаях является возбудителем перитонита [4]. Ранее нами показано, что в клетках *M. morganii* содержатся протеиназы, расщепляющие азоказеин, желатин и скелетно-мышечный актин [5]. Однако внутриклеточная протеиназа *M. morganii* в настоящее время не выделена и не изучена. Геном *M. morganii* subsp. *morganii* КТ секвенирован [7], что позволяет провести биоинформационный поиск генов-гомологов известных ферментов. Ранее в клетках *Serratia grimesii* была описана внутриклеточная металлопротеиназа гримелизин [8]. Было показано, что гримелизин может участвовать в инвазии патогенов в эукариотические клетки [9].

Настоящая работа посвящена поиску гена металлопротеиназы в геноме *M. morganii*, аминокислотная последовательность которого гомологична гримелизину *S. grimesii*, анализу геномного локуса, в котором локализован ген, и промоторной области гена. Кроме того, проведена идентификация гена металлопротеиназы в клиническом изоляте *M. morganii* штамм ZM.

Материалы и методы исследования

Штамм бактерий *M. morganii* ZM был предоставлен профессором Томасом Адамом (Charité,

Берлин). Идентификация штамма осуществлена на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и микробиологических тестов [5].

Бактерии культивировали при 37°C с интенсивностью качания 200 об/мин (вибростенд, В. Braun, Германия), как описано в работе [6]. В качестве инокулята использовали 12-часовую культуру, выращенную на среде LB (%) [10]: триптон – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.5, NaCl – 0.5, pH 8.5. Среда LBA содержала 2% агар.

Биоинформационный поиск гена-гомолога гримелизина *S. grimesii* был проведен с использованием следующих ресурсов: анализ нуклеотидных последовательностей проводился с использованием программ Blast, которые представлены на сервере Национального Центра Биотехнологической информации (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih>), для анализа степени консервативности геномных локусов использовали программы и базы данных сайта ASAP

(https://asap.ahabs.wisc.edu/asap/sim_search_query.php ?), а также базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Sanger (<http://www.sanger.ac.uk>), xBASE (<http://www.xbase.ac.uk/colibase>).

Анализ промоторной области проводили с помощью программы BPROM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>).

Для амплификации исследуемой последовательности применяли классическую ПЦР. Использованные праймеры представлены в таблице 2.

Разделение продуктов амплификации проводили с помощью горизонтального ДНК-электрофореза в 1.5% агарозном геле.

Секвенирование ДНК-амплификатов было проведено фирмой Syntol (<http://www.syntol.ru>).

Для выравнивания сиквенсов использовали программу MEGA 4. Поиск открытых рамок считывания (ОРС) проводили при помощи программ

Clone Manager 7 и «Трансляция нуклеотидной последовательности» на сайте molbiol.ru (http://molbiol.ru/scripts/01_13.html).

Результаты исследований и их обсуждение

Используя последовательность белка гримелизина *S. grimesii* strain DSMZ 30063 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABY40626.1>), с помощью программ Blast и БД ASAP в аннотированном геноме штамма *M. morganii* subsp. *morganii* КТ был найден ген гипотетической металлопротеазы размером в 1101 нуклеотидных пар (н.п.). Идентифицированная последовательность гена *M. morganii* subsp. *morganii* КТ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/455418716?report=genbank&from=1950949&to=1952049>) была использована для биоинформационного поиска генов-ортологов с помощью программы Blastn. Показано, что в геномах различных видов семейства *Enterobacteriaceae* присутствуют гомологичные последовательности. Однако их протяженность невелика и не превышает 204 н.о. у *Enterobacter sakazakii*, *Cronobacter sakazakii* SP291 (гомология 68%), 191 н.о. у *Klebsiella oxytoca* E718 (68% гомологии) и 167 н.о. у *Pantoea* sp. At-9b (70% гомологии) при длине ОРС 1101 н.о. Гомология гена гримелизина с геном гипотетической металлопротеиназы *M. morganii* subsp. *morganii* КТ на коротком участке (114/166 н.о.) равна 69%.

Аминокислотная последовательность гена металлопротеазы *M. morganii* КТ состоит из 366 аминокислотных остатков (а.о.). Blastp-анализ гипотетической аминокислотной последовательности белка выявил наличие большого числа его гомологов среди белков бактерий сем. *Enterobacteriaceae* (табл. 1), а также у различных представителей других семейств. Наибольшей степенью гомологии с металлопротеазой *M. morganii* КТ обладают эластаза *S. marcescens* FG194 (39% идентичности и 54% сходства) и термолизоминазная металлопептидаза *Achromobacter xylosoxidans* A8 (38% идентичности, 51% сходства). Металлопротеиназа *M. morganii* обладает 37% гомологией с аминокислотными последовательностями гримелизина *S. grimesii* и протеализина *S. proteamaculans*. Важно отметить, что в геноме *Bacillus subtilis* также обнаружен ортолог с 36% гомологией, кодирующий фибринолитический фермент ВК II (Fbk2).

Идентификация генов-ортологов металлопротеиназы в геномах энтеробактерий позволяет предположить, что фермент выполняет в клетках важную функцию.

Был проведен сравнительный анализ геномных локусов *S. proteamaculans* и *M. morganii*, в которых расположены гены металлопротеаз. Как видно из рисунка 1, эти локусы сильно различаются. В геноме *S. proteamaculans* ген протеализина находится в опероне с гипотетическим белком, а в геноме *M. morganii* – организован как индивидуальный ген. Значительно различаются и соседние гены. В геноме *S. proteamaculans* после гена протеализина следует ген гипотетического белка, а на комплементарной цепи – гены *uf* и *auetf*, кодирующие соответственно

белок с неизвестной функцией и белок насоса ауксина. В геноме *M. morganii* после гена металлопротеиназы находятся гены *engA* и *yfgL*, расположенные на комплементарной цепи и кодирующие ГТФ-связывающий белок и белок внешней мембраны

Таблица 1 - Гомологи гипотетической металлопротеазы *Morganella morganii* subsp. *morganii* КТ по аминокислотной последовательности

Организм	Длина выравниваемых участков, а.о. Идентичность, (%)	Длина выравниваемых участков, а.о. Схожесть, (%)
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i> КТ	366/ 366* (100%)	366/ 366 (100%)
<i>M. morganii</i> SC01	352/ 366 (96%)	360/ 366 (98%)
<i>Serratia marcescens</i> FG194	141/ 360 (39%)	195/ 360 (54%)
<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	132/ 360 (37%)	192/ 360 (53%)
<i>Serratia proteamaculans</i>	133/ 360 (37%)	193/ 360 (53%)
<i>Dickeya dadantii</i> 3937	139/ 361 (39%)	191/ 361 (52%)
<i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13	133/ 361 (37%)	192/ 361 (53%)
<i>Dickeya zeae</i>	139/ 362 (38%)	190/ 362 (52%)
<i>Enterobacter</i> sp. SST3	134/ 361 (37%)	190/ 361 (52%)
<i>Serratia grimesii</i>	132/ 360 (37%)	190/ 360 (52%)
<i>Pectobacterium wasabiae</i>	137/ 366 (37%)	192/ 366 (52%)
<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	132/ 360 (37%)	187/ 360 (51%)
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047	133/ 361 (37%)	189/ 361 (52%)
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	133/ 361 (37%)	188/ 361 (52%)
<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1	122/ 356 (34%)	188/ 356 (52%)
<i>Salmonella enterica</i>	127/ 361 (35%)	188/ 361 (52%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	131/ 369 (36%)	192/ 369 (52%)

* Длина выравниваемых последовательностей

соответственно. Перед геном протеализина находятся гены *reg* и *mft*, кодирующие регуляторный белок семейства LacI и MFS-транспортер. Перед геном металлопротеиназы *M. morganii* находятся гены *hemN* и *ureA*, кодирующие азробную копропорфириноген оксидазу III и ацетилтрансферазу соответственно. Таким образом, сравнение геномных локусов двух металлопротеаз показало, что они значительно различаются в геномах энтеробактерий разных родов. Более того, гены гомологичных метал-

лопротеиназ могут, как входить в состав оперонов (р. *Serratia*), так и быть индивидуальными генами (р. *Morganella*).

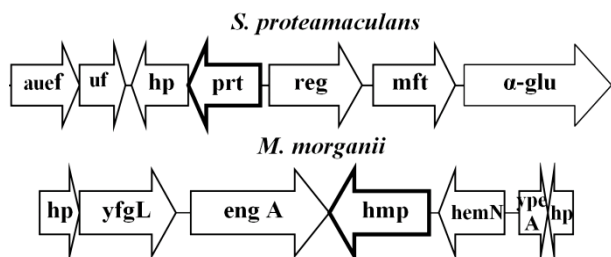


Рис. 1 - Сравнение локусов, несущих ген металлопротеазы, в геномах *S. proteamaculans* и *M. morganii*: auef – ген насоса ауксина, uf – ген белка с неизвестной функцией, hp – ген гипотетического белка, prt – ген металлопротеазы, reg – ген регулятора семейства LacI, mft – ген MFS-транспортера, α-glu – ген α-глюкозидазы; yfgL – ген белка внешней мембраны, engA – ген ГТФ-связывающего белка, hmp – ген гипотетической металлопротеазы, hemN – ген аэробной копропорфириноген оксидазы III, ureA – ген ацетилтрансферазы

Направление стрелки указывает, на какой цепи ДНК локализован ген: стрелка вправо – ген расположен на плюс-цепи, стрелка влево – ген расположен на минус-цепи

Был проведен анализ промоторной области гена гипотетической металлопротеиназы *M. morganii* КТ. Протяженность межгенного участка составляет 102 н.п. (рис. 2). С помощью программы BPRом были идентифицированы консервативные последовательности -10 и -35, а также последовательность Шайна-Дальгарно (SD). Сайтов связывания регуляторных белков данной программой не выявлено.

GGGTCTGACAACCCCTTCACAGTGTGCTGACTGAAAAGCAG
GCTGATAGTCTGCTGCCGTAATATTTTCTCCGTAAAGAT
GGTCATTCCAACCACAGGAGAACC GCCTATGTCAGCACATG

Рис. 2 - Строение промоторной области гена гипотетической металлопротеазы *M. morganii* subsp. *morganii* КТ. Отмечены участки -10 и -35, TGA – стоп-кодон предыдущего гена, SD – последовательность Шайна-Дальгарно, ATG – точка начала трансляции

Основываясь на данных биоинформационного анализа гена *M. morganii* subsp. *morganii* КТ, были сконструированы праймеры для амплификации гомологичного гена в геноме изолята *M. morganii* ZM (табл. 2).

Полученные с помощью праймеров Morggluz_d и Morggluz_r продукты ПЦР-амплификации (рис.3) были секвенированы, сиквенсы выравнены с помощью программы MEGA 4, что позволило обнаружить протяженный участок гомологии (85%) в центральной части последовательности с геном *M. morganii* subsp. *morganii* КТ. Однако концевые участки сиквенсов сильно различались,

что препятствовало нахождению старт- и стоп-кодонов. Для решения этой проблемы были сконструированы новые праймеры (Morg.L-Morg.R), включающие участки нуклеотидной последовательности, расположенные за пределами гена. После выравнивания секвенированных ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью этих праймеров, была выявлена ОРС длиной в 1104 н.п. Blast-анализ генов *M. morganii* КТ и *M. morganii* ZM выявил 83% идентичность по нуклеотидной последовательности, гомология по аминокислотной последовательности составила 86% (при сходстве 92%).

Таблица 2 - Используемые праймеры

Название	Направление	Последовательность (5'-3')	Температура отжига, °C
Morggluz_d	For	TTACGGCTCCAGCCC GACGG	60
Morggluz_r	Rev	TGTCAGCA- CATGCCCGCGC	60
Morg.L_f.2	For	GCGGCCGTTATGTGG AGTTT	61.30
Morg.L_r.2	Rev	TGATGGCTGTAAGTC AGCGG	60.11
Morg.R_f.1	For	TGAGTGAATCCCCGC TGTTT	60.04
Morg.R_r.1	Rev	TGAAAGTGATGGGA ACGCCT	59.60
Morg.R_f.2	For	TGGATATCGCCACAC ACGAG	59.90
Morg.R_r.2	Rev	CTGAAAGTGATGGG AACGCC	59.20

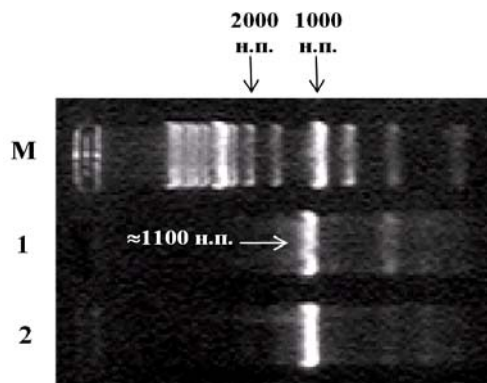


Рис. 3 - Результат ПЦР-амплификации гена гипотетической металлопротеазы в геноме *M. morganii* ZM. М – ДНК-маркер, 1,2 – ПЦР-продукты

Таким образом, в геноме референтного штамма *M. morganii* subsp. *morganii* КТ идентифицирован гомолог гена гримелизина *S.grimesii*, кодирующий гипотетическую металлопротеиназу с гомологией по аминокислотной последовательности 37%. С помощью праймеров, сконструированных к последовательности гена *M. morganii* КТ, был идентифицирован ген металлопротеиназы в геноме изолята *M. morganii* ZM, гомологичный гену *M. morganii* КТ на 83%.

Литература

1. P. Zalas-Wieczek, E. Gospodarek, J. Wróblewska, *Przegl. Epidemiol.*, **66**, 1, 13-18 (2012).
2. C. Zhao, N. Tang, Y. Wu, Y. Zhang, Z. Wu, W. Li, X. Qin, J. Zhao, G. Zhang, *Vet. Microbiol.*, **156**, 452-455 (2012).
3. J. Abdalla, M. Saad, I. Samnani, P. Lee, J. Moorman, *Am. J. Med. Sci.*, **331**, 1, 44-47 (2006).
4. H. Atalay, I. Güney, Y. Solak, E. Almaz, *Perit. Dial. Int.*, **30**, 1, 119-121 (2010).
5. Н.М. Замалютдинова, И.Р. Галиева, А.О. Арапова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова, *Вестник Казанского технологического университета*, **16**, 10, 191-194 (2013).
6. А.М. Марданова, Э.Х. Низамутдинова, Т.В. Ширшикова, Л.Х. Камалетдинова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, Л.М. Богомольная, *Вестник Казанского технологического университета*, **19**, 215-218 (2013).
7. Y.T. Chen, H.L. Peng, W.C. Shia, F.R. Hsu, C.F. Ken, Y.M.Tsao, C.H. Chen, C.E. Liu, M.F. Hsieh, H.C. Chen, C.Y. Tang, T.H. Ku, *BMC Genomics*, **13**, (2012).
8. E.S. Bozhokina, S.Yu. Khaitlina, T. Adam, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 888-892 (2008).
9. E.S. Bozhokina, O.A. Tsaplina, T.N. Efremova, L.V. Kever, I.V. Demidyuk, S.V. Kostrov, T. Adam, Y.Y. Komissarchik, S.Y. Khaitlina, *Cell. Biol. Int.*, **35**, 2, 111-118 (2011).
10. J. Sambrook, E.F. Fritsch, S.T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989, 2344 p.

© Л. Ф. Миннуллина - студ. каф. генетики К(П)ФУ, masaco@mail.ru; Н. М. Замалютдинова – асп. каф. микробиологии К(П)ФУ, nelya-zamalutdinova@rambler.ru; Е. О. Михайлов – канд. биол. наук, доц. каф. БСМЭ КНИТУ, katyushka.glukhova@gmail.com; М. Р. Шарипова - д.б.н., проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, marsharipova@gmail.com; А. М. Марданова – канд. биол. наук, доц. той же кафедры.