

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 (Charite, 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. morgani* subsp. *morgani* КТ был найден ген гипотетической металлопротеазы размером в 1101 нуклеотидных пар (н.п.). Идентифицированная последовательность гена *M. morgani* subsp. *morgani* КТ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/455418716?report=genbank&from=1950949&to=1950949>) 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. morgani* subsp. *morgani* КТ на коротком участке (114/166 н.о.) равна 69%. Аминокислотная последовательность гена металлопротеазы *M. morgani* 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. morgani* КТ обладают эластаза *S. marcescens* FGI94 (39% идентичности и 54% сходства) и термолизиновая металлопептидаза *Achromobacter xylosoxidans* A8 (38% идентичности, 51% сходства). Металлопротеиназа *M. morgani* 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. morgani*, 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 *auef*, 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*	366	100%	366	100%
<i>M. morganii</i> SC01	352	96%	360	98%
<i>Serratia marcescens</i> FGI94	141	39%	195	54%
<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	132	37%	192	53%
<i>Serratia proteamaculans</i>	133	37%	193	53%
<i>Dickeya dadantii</i> 3937	139	39%	191	52%
<i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13	133	37%	192	53%
<i>Dickeya zeae</i>	139	38%	190	52%
<i>Enterobacter</i> sp. SST3	134	37%	190	52%
<i>Serratia grimesii</i>	132	37%	190	52%
<i>Pectobacterium wasabiae</i>	137	37%	192	52%
<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	132	37%	187	51%
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047	133	37%	189	52%
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	133	37%	188	52%
<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TТO1	122	34%	188	52%
<i>Salmonella enterica</i>	127	35%	188	52%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	131	36%	192	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 аэробную 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 металлопротеиназ 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 BPROM были идентифицированы консервативные последовательности -10 и -35, а также последовательность Шайна-Дальгарно (SD). Сайтов связывания регуляторных белков данной программой не выявлено. Рис. 2 - Строение промоторной области гена гипотетической металлопротеазы *M. morgani* subsp. *morgani* KT. 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. morgani* subsp. *morgani* KT, были сконструированы праймеры для амплификации гомологичного гена в геноме изолята *M. morgani* 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. morgani* subsp. *morgani* KT. 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. morgani* KT и *M. morgani* 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	TTACGGCTCCAGCCCGACGG	60
Morggluz_r	Rev	TGTCAGCACATGCCCCGCGC	60
Morg.L_f.2	For	GCGGCCGTTATGTGGAGTTT	61.30
Morg.L_r.2	Rev	TGATGGCTGTAAGTCAGCGG	60.11
Morg.R_f.1	For	TGAGTGAATCCCCGCTGTTC	60.04
Morg.R_r.1	Rev	TGAAAGTGATGGGAACGCCT	59.60
Morg.R_f.2	For	TGGATATCGCCACACACGAG	59.90
Morg.R_r.2	Rev	CTGAAAGTGATGGGAACGCC	59.20

Рис. 3 - Результат ПЦР-амплификации гена гипотетической металлопротеазы в геноме *M. morgani* ZM. М – ДНК-маркер, 1,2 – ПЦР-продукты Таким образом, в геноме референтного штамма *M. morgani* subsp. *morgani* KT идентифицирован гомолог гена гримелизина *S.grimesii*, кодирующий гипотетическую металлопротеиназу с гомологией по аминокислотной последовательности 37%. С помощью праймеров, сконструированных к последовательности гена *M. morgani* KT, был идентифицирован ген металлопротеиназы в геноме изолята *M. morgani* ZM, гомологичный гену *M. morgani* KT на 83%.