

УДК 579.222

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *Proteus mirabilis*

© 2015 г. Н. М. Замалютдинова*, М. Р. Шарипова*, Л. М. Богомольная**,
Е. С. Божокина***, А. М. Марданова*

*Казанский федеральный университет, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

**Техасский аграрный университет, Техас, США

***Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

E-mail: mardanovaayslu@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2014 г.

Исследованы биосинтез металлопротеиназы штаммом *Proteus mirabilis* 5127-1 на разных средах и влияние на биосинтез глюкозы и мочевины. Отмечено, что бактерии *P. mirabilis* 5127-1 секретируют в среду металлопротеиназу в виде двух изоформ (52 и 50 кДа). Установлено, что синтез протеиназы полностью подавляется при росте бактерий на синтетических средах, а также в присутствии в среде LB глюкозы. Показано, что добавление в среду мочевины приводит к увеличению продуктивности культуры по синтезу протеиназы. Максимальная продуктивность культуры по синтезу протеиназы обнаружена на среде с натуральной мочой. При росте бактерий на искусственной моче протеиназа появлялась в среде только после 12 ч роста в виде одной изоформы.

DOI: 10.7868/S0002332915010142

Proteus mirabilis, условно-патогенная грамотрицательная бактерия семейства Enterobacteriaceae, — возбудитель оппортунистических и госпитальных инфекций, поражающих респираторный тракт, кожу, ожоговые поверхности и раны (Endimiani *et al.*, 2005). Чаще всего *P. mirabilis* является причиной инфекций мочевыводящих путей, особенно при длительном использовании катетеров (Jakobsen *et al.*, 2008). Один из факторов вирулентности этих бактерий — внеклеточная металлопротеиназа (Senior *et al.*, 1987). Установлена корреляция между способностями штамма к роению и к секреции протеиназ. Штаммы, не способные к роению, были протеолитически неактивны (Senior, 1999; Walker *et al.*, 1999). Ген металлопротеиназы *P. mirabilis* (*zapA*) входит в состав оперона, включающего в себя гены, кодирующие АТФ-зависимую транспортную систему, которая обеспечивает перенос фермента из клеток в культуральную среду. Белок, кодируемый геном *zapA*, относится к семейству серрализинов (Wassif *et al.*, 1995).

При изучении транскриптома роящихся клеток *P. mirabilis* показано, что экспрессия гена *zapA* увеличивается в роящихся клетках, особенно сильно на стадии консолидации (Pearson *et al.*, 2010). В то же время исследование экспрессии генов *P. mirabilis* *in vivo* в процессе инфицирования мочевыводящих путей показало, что ген *zapA* экспрессировался на базовом уровне или даже ниже. Предполагается, что либо экспрессия этого гена

может быть специфична к месту локализации бактерий в мочевых путях, либо незначительные изменения на уровне транскрипции могут приводить к значимым изменениям в активности (Pearson *et al.*, 2011).

Цель работы — характеристика биосинтеза внеклеточной протеиназы штаммом *P. mirabilis* 5127-1 на разных средах и в зависимости от присутствия глюкозы и мочевины в среде культивирования. Штамм *P. mirabilis* 5127-1 был предоставлен Е.С. Божокиной (Институт цитологии РАН).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактерии культивировали при 37°C с интенсивностью качания 200 об./мин (вибростенд, Braun, Германия). Для культивирования бактерий использовали среду Лурия–Бертани (LB), синтетическую среду М9, синтетическую и натуральную мочу. Состав среды LB, %: триптон — 1, дрожжевой экстракт — 0.5, NaCl — 0.5, pH 8.5. Среда LBA содержала 2% агара (Sambrook *et al.*, 1989). Мочевину в конечных концентрациях 4–600 мМ вносили в питательную среду перед посевом в виде стерильных растворов. Для изучения влияния глюкозы в среду LB вносили 1.5% глюкозы. Состав среды М9, г/л: Na₂HPO₄ — 6, KH₂PO₄ — 3, NaCl — 0.5, NH₄Cl — 1. В среду М9 вносили глюкозу или глицерин в конечной концентрации 0.2%. Витамин В1 добавляли до конечной кон-

центрации 1 мг/мл. После автоклавирования на 1 л среды добавляли 1 мл 1 М раствора $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 мл 0.01 М раствора CaCl_2 .

Состав искусственной мочи, г/л (Jones *et al.*, 2007): пептон L37 – 1, дрожжевой экстракт – 0.05, молочная кислота – 0.1, лимонная кислота – 0.4, мочевины – 10, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.37, NaCl – 5.2, FeSO_4 – 0.012, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.49, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ – 3.2, KH_2PO_4 – 0.95, K_2HPO_4 – 1.2, NH_4Cl – 1.3, H_2O дистиллированная. В качестве натуральной мочи использовали детскую объединенную мочу, которую стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм. Стерильность подтверждали высевом на среду LB. В качестве инокулята использовали 12-часовую культуру, выращенную на среде LB. Для определения казеинолитической активности использовали среду следующего состава, г/л: казеин – 5, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5, агар – 20.

Нуклеотидную последовательность гена *16S rPHK* определяли и анализировали методом, описанным ранее (Janda, Abbott, 2007). Прирост биомассы измеряли нефелометрически на фотоэлектрорефлектометре КФК-2 при длине волны 590 нм. Биомассу выражали в единицах светопоглощения в кювете толщиной 1 см. Общее количество белка определяли методом Брэдфорд (Bradford, 1976). Биоинформационный анализ промоторной области гена *zapA* проводили с помощью базы данных ASAP (<https://asap.ahabs.wisc.edu/asap/home.php>) и программы BPRom (www.softberry.com).

Протеолитическую активность в культуральной жидкости определяли по расщеплению казеина методом Каверзневой (Каверзнева, 1971). За единицу казеинолитической активности принимали количество фермента, которое приводило к освобождению 1 мкмоль тирозина за 1 мин. Азоказеин расщепляли методом, описанным ранее (Wassif *et al.*, 1995). За единицу активности принимали такое количество активности, которое приводит к увеличению оптической плотности на 0.1 единицы. Продуктивность культуры в отношении синтеза протеиназы определяли как отношение протеолитической активности в культуральной жидкости к биомассе и выражали в условных единицах. Супернатант культуральной жидкости получали центрифугированием культуры при 13000 об./мин в течение 15 мин.

В опытах по исследованию влияния ингибиторов в инкубационные смеси вносили в конечной концентрации 10 мМ орто-фенантролин и 2 мМ PMSF.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия проводили по стандартной методике (Laemmli, 1970). Зимографию проб культуральной жид-

кости *P. mirabilis* в ПААГ с желатином (1 мг/мл) проводили методом, описанным ранее (Oliver *et al.*, 1999). Для проведения количественного анализа гели сканировали и полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quanti Scan 2.1.

Математическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при $\sigma \leq 15\%$. В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента ($P < 0.05$ – достоверный уровень значимости).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетическое положение штамма 5127-1 установили путем анализа последовательности гена *16S rPHK*. Показано, что штамм 5127-1 относится к виду *P. mirabilis*. Сходство генов *16S rPHK* штамма 5127-1 и *P. mirabilis* CIFRI Ch-TSB28 составило 98.9%. При росте бактерий штамма 5127-1 на агаризованной среде с казеином штамм проявлял способность к роению и образовывал зоны гидролиза, что свидетельствует о его протеолитической активности.

Для исследования специфичности протеиназы штамма *P. mirabilis* 5127-1 использовали такие субстраты, как казеин, азоказеин и желатин. Показано, что данный микроорганизм способен разлагать азоказеин, желатин и казеин, причем казеин разлагается менее эффективно. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым многие штаммы *P. mirabilis* более эффективно расщепляют желатин, чем казеин (Senior, 1999). В дальнейших опытах для определения протеолитической активности в культуральной жидкости использовали азоказеин, а для зимографии – желатин.

Динамику роста и биосинтеза внеклеточных протеиназ *P. mirabilis* изучали при культивировании на среде LB при 37°C. Стационарная фаза роста наступала через 11–12 ч культивирования. Протеиназы выделялись в среду после 5 ч роста бактерий и продолжали секретироваться на всех этапах развития культуры (рис. 1), достигнув максимума в стационарной фазе роста бактерий. Внеклеточная протеолитическая активность полностью подавлялась 10 мМ орто-фенантролином, ингибитором металлопротеиназ, и была нечувствительной к 2 мМ PMSF, ингибитору сериновых протеиназ. Таким образом, внеклеточная протеиназа *P. mirabilis* 5127-1 является металлопротеиназой.

Рост бактерий и биосинтез протеиназ исследовали на синтетической среде M9, которую моди-

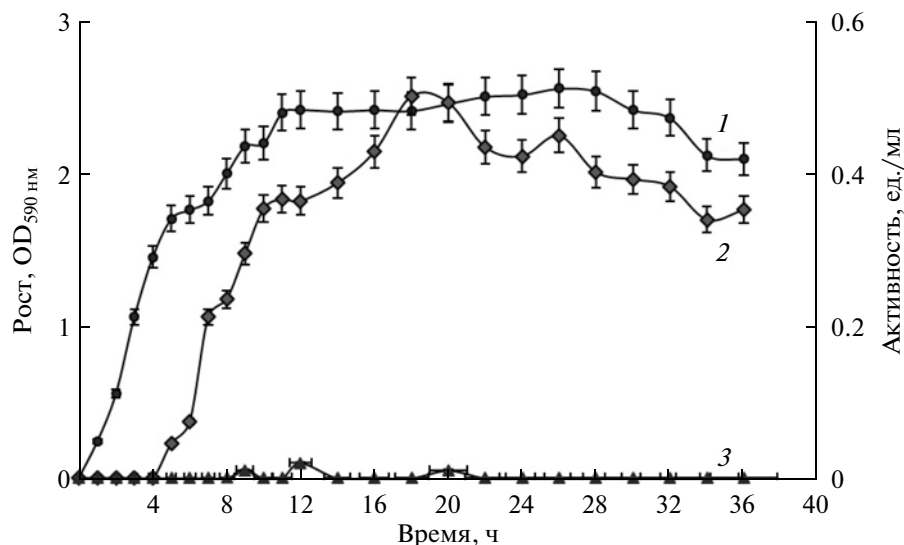


Рис. 1. Динамика роста (1) и внеклеточной протеолитической активности *P. mirabilis* по расщеплению азоказеина (2), а также протеолитическая активность в присутствии 10 мМ *опто*-фенантролина (3). $OD_{590\text{ нм}}$ — оптическая плотность культуры при 590 нм.

фицировали добавлением различных органических компонентов. К солевой основе с тиамин (1 мг/мл) добавляли глюкозу или глицерин в качестве источника углерода в конечной концентрации 0.2%. Было установлено, что на модифицированных синтетических средах М9 бактерии растут более чем в 2 раза медленнее, чем на среде LB (16 ч культивирования) (рис. 2). Во всех вариантах сред в следовых количествах обнаруживалась протеолитическая активность по отношению к азоказеину. Однако она составляла не более 2% активности фермента в культуральной жидкости бактерий, выращенных на среде LB.

Показано, что в культуральной жидкости разных штаммов *P. mirabilis* присутствуют две изоформы металлопротеиназы (Senior, 1999; Pearson

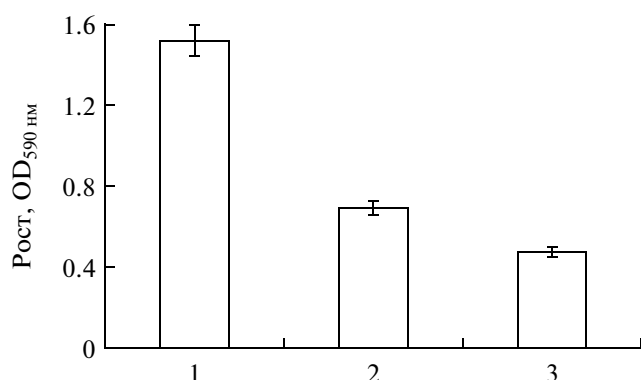


Рис. 2. Рост культуры *P. mirabilis* на разных средах. 1 — среда LB, 2 — синтетическая среда М9 + тиамин + глицерин, 3 — среда М9 + тиамин + глюкоза.

et al., 2008). Зимография белков культуральной жидкости позволила выявить изоформы внеклеточной протеиназы *P. mirabilis* с молекулярными массами 52 и 50 кДа (Oliver *et al.*, 1999). Причины образования двух изоформ точно не известны. Предполагается, что изоформа с $M = 50$ кДа образуется из-за деградации фермента (Oliver *et al.*, 1999). Динамику появления изоформ протеиназы в разные часы роста в культуральной жидкости изолята *P. mirabilis* 5127-1 (среда LB) исследовали методом зимографии (рис. 3). Через 6 ч роста культуры внеклеточная протеолитическая активность была низкой, и в культуральной жидкости наблюдали только одну изоформу фермента с $M = 52$ кДа; после 12 ч протеолитическая активность повышалась и появлялась изоформа с $M = 50$ кДа. Активность изоформы с $M = 50$ кДа была незначительной. После 18 ч роста обнаруживались обе изоформы фермента, активность которых сохра-

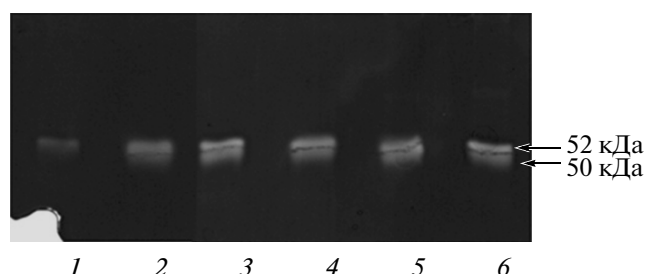


Рис. 3. Зимограммы супернатанта культуральной жидкости *P. mirabilis* при росте на среде LB при 37°C. 1 — 6, 2 — 12, 3 — 18, 4 — 20, 5 — 22, 6 — 24 ч. Субстрат — желатин.

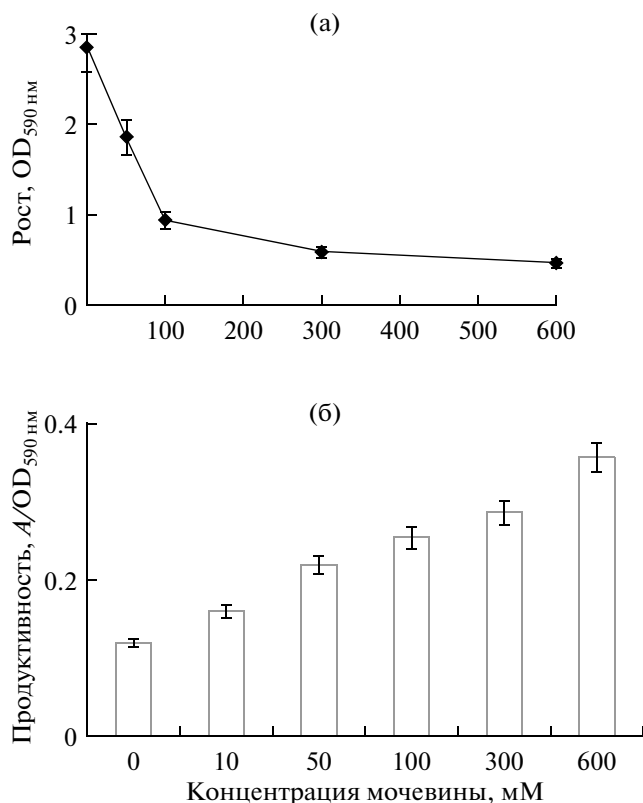


Рис. 6. Динамика роста бактерий *P. mirabilis* (а) и продуктивность биосинтеза внеклеточной протеиназы (б) в присутствии в среде мочевины. Бактерии культивировали 16 ч при 37°C на среде LB, содержащей 0–600 мМ мочевины. А – активность по расщеплению азоказеина, ед./мл; для рис. 6 и 7.

ях продуктивность культуры по синтезу внеклеточной протеиназы увеличивалась в 2.5–3 раза (рис. 6б).

Было исследовано накопление протеиназы *P. mirabilis* при росте культуры на искусственной и натуральной моче по сравнению с таковым на среде LB с 50 мМ мочевиной и без мочевины (рис. 7). Максимальный рост бактерий наблюдали на средах LB и LB с 50 мМ мочевины. На искусственной и натуральной моче рост составлял 20–30% роста на среде LB (рис. 7а). На контрольной среде (среда LB) наблюдали низкую продуктивность культуры по внеклеточной протеиназе. В присутствии в среде 50 мМ мочевины продуктивность культуры повышалась на 60–65%. Продуктивность культуры по протеиназе на искусственной и натуральной моче была выше в 2–2.5 и 3 раза соответственно по сравнению с контролем (рис. 7б). Полученные данные позволяют сделать вывод, что мочевина – один из факторов, влияющих на индукцию биосинтеза внеклеточной металлопротеиназы *P. mirabilis*.

Исследовали также динамику накопления протеолитической активности при росте бактерий на искусственной моче (рис. 8). По данным зимографии активность появлялась в среде после 12 ч роста и достигала максимума после 48 ч. В сравнении с этим при росте *P. mirabilis* на среде LB протеолитическая активность обнаруживалась после 6 ч роста бактерий и достигала максимума после 12 ч роста (рис. 3). Ранее было показано, что активный фермент может быть обнаружен в моче у пациентов с инфекцией мочевыводящих

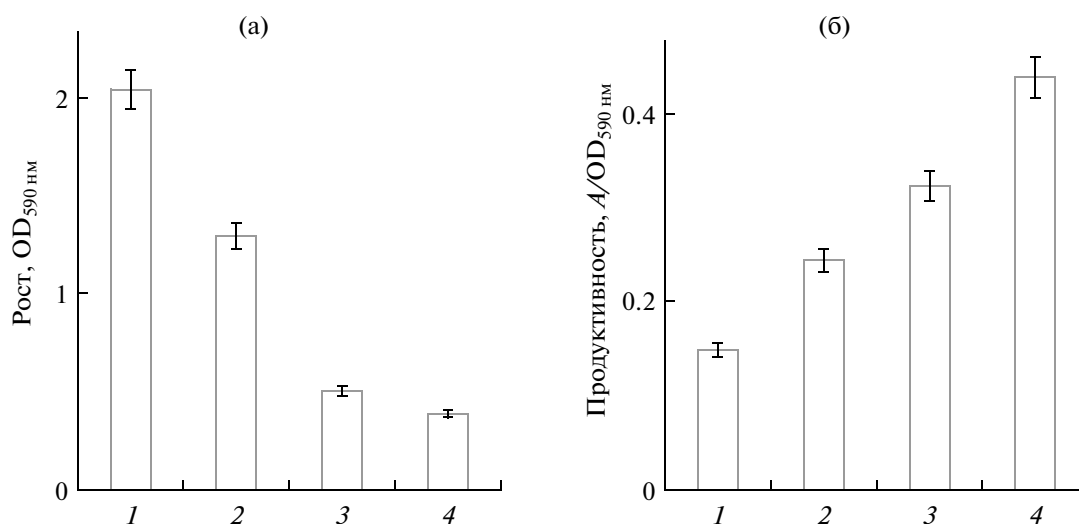


Рис. 7. Рост *P. mirabilis* (а) и продуктивность культуры по биосинтезу протеиназы (б) на разных средах. 1 – среда LB, 2 – среда LB + 50 мМ мочевины, 3 – искусственная моча, 4 – натуральная моча.

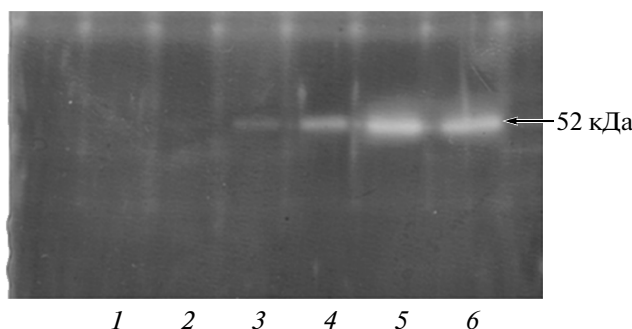


Рис. 8. Зимограммы супернатанта культуральной жидкости *P. mirabilis* при росте бактерий на искусственной моче. 1 – 4, 2 – 8, 3 – 12, 4 – 24, 5 – 48, 6 – 72 ч. Субстрат – желатин.

путей, вызванной бактериями рода *Proteus* (Senior *et al.*, 1991). Важное отличие заключается в том, что при росте бактерий на среде LB образовались две изоформы металлопротеиназы (52 и 50 кДа). При росте бактерий на искусственной моче наблюдали только одну изоформу (52 кДа), что свидетельствовало о различиях в накоплении изоформ протеиназы на разных средах.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров, частично за счет субсидии, выделенной для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект 14-83) и при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-97130) и Правительства Республики Татарстан.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каверзнева Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеиназ // Прикл. биохимия и микробиология. 1971. Т. 7. № 2. С. 225–228.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
- Endimiani A., Luzzaro F., Brigante G. *et al.* *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum beta-lactamases // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. № 7. P. 2598–2605.
- Jakobsen S.M., Stickler D.J., Mobley H.L.T., Shirliff M.E. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* // Clin. Microbiol. Rev. 2008. V. 21. № 1. P. 26–59.
- Janda J.M., Abbott S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. № 9. P. 2761–2764.
- Jones S.M., Yerly J., Hu Y. *et al.* Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media // FEMS Microbiol. Lett. 2007. V. 268. № 1. P. 16–21.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature (London). 1970. V. 227. P. 680–685.
- Leuze M.R., Karpinets T.V., Syed M.H. *et al.* Binding motifs in bacterial gene promoters modulate transcriptional effects of global regulators CRP and ArcA // Gene Regul. Syst. Bio. 2012. V. 6. P. 93–107.
- Liu L., Mo H., Wei S., Raftery D. Quantitative analysis of urea in human urine and serum by ¹H nuclear magnetic resonance // Analyst. 2012. V. 137. № 3. P. 595–600.
- Oliver G.W., Stettler-Stevenson W.G., Kleiner D.E. Zymography, casein zymography and reverse zymography; activity proteases and their inhibitors // Handbook of proteolytic enzymes. San Diego: Acad. Press, 1999. P. 61–76.
- Pearson M.M., Rasko D.A., Smith S.N., Mobley H.L.T. Transcriptome of swarming *Proteus mirabilis* // Infect. Immun. 2010. V. 78. P. 2834–2845.
- Pearson M.M., Yep A., Smith S.N., Mobley H.L.T. Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the murine urinary tract: virulence and nitrogen assimilation gene expression // Infect. Immun. 2011. V. 79. № 7. P. 2619–2631.
- Pearson M.M., Sebaihia M., Churcher C. *et al.* Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 11. P. 4027–4037.
- Sambrook J.K., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Press, 1989. P. 1662.
- Senior B.W. Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzymes formed by diverse strains of *Proteus species* // J. Med. Microbiol. 1999. V. 48. P. 623–628.
- Senior B.W., Albrechtsen M., Kerr M.A. *Proteus mirabilis* strains of diverse type have IgA protease activity // J. Med. Microbiol. 1987. V. 24. № 2. P. 175–180.
- Senior B.W., Loomes L., Kerr M.A. The production and activity in vivo of *Proteus mirabilis* IgA protease in infections of the urinary tract // J. Med. Microbiol. 1991. V. 35. P. 203–207.

Vázquez C.D., Freyre-González J.A., Gosset G. et al. Identification of network topological units coordinating the global expression response to glucose in *Bacillus subtilis* and its comparison to *Escherichia coli* // BMC Microbiol. 2009; 9:176. doi: 10.1186/1471-2180-9-176.

Walker K.E., Moghaddame-Jafari S., Lockatell C.V. et al. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus*

mirabilis, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells // Mol. Microbiol. 1999. V. 32. № 4. P. 825–836.

Wassif C., Cheek D., Belas R. Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis* // J. Bacteriol. 1995. V. 177. № 20. P. 5790–5798.

Peculiarities of *Proteus mirabilis* Extracellular Metalloproteinase Biosynthesis

N. M. Zamalyutdinova^a, M. R. Sharipova^a, L. M. Bogomol'naya^{a, b},
E. S. Bozhokina^c, and A. M. Mardanova^a

^a Kazan Federal University, Kremlevskaya str. 18, Kazan, 420008 Russia

^b Texas A&M University Health Science Center, College Station, Texas, United States

^c Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

e-mail: mardanovaayslu@mail.ru

Biosynthesis of metalloproteinase by the *Proteus mirabilis* 5127-1 strain on different media and the influence of glucose and urea on biosynthesis were studied. It was found that the *P. mirabilis* 5127-1 bacteria secretes metalloproteinase in the medium in two isoforms (52 and 50 kDa). It was established that proteinase synthesis is completely suppressed during the growth of bacteria on synthetic media, as well as in the presence of LB glucose in the medium. It was demonstrated that addition of urea in the medium results in an increase of the culture productivity in the proteinase synthesis. Maximal culture productivity in the proteinase synthesis was found in the medium with natural urine. During the growth of bacteria on artificial urine, proteinase appeared in the medium only after 12 hours of growth as a single isoform.