

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА БИОСИНТЕЗ
ГРИМЕЛИЗИНО-ПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ**

Работа завершена:

"25" мая 2018 г.



(А.А. Глушко)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
к.б.н., доцент,

"4" мая 2018 г.



(А. М. Марданова)

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

"2" юня 2018 г.



(О.Н. Ильинская)

Казань–2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей	6
1.1.1 Патогенез катетер-ассоциированных инфекций	8
1.2 Классификация энтеробактерий	10
1.2.1 Морфологические и биохимические свойства бактерий рода <i>Klebsiella</i>	11
1.3 Роль бактерий рода <i>Klebsiella</i> в инфекционной патологии и их факторы вирулентности	13
1.4 Протеиназы энтеробактерий	16
1.4.1 Металлопротеиназа <i>Serratia grimesii</i>	16
1.4.2 Цинк-зависимая металлопротеиназа <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.1 Исследуемый штамм	21
2.2 Определение тинкториальных свойств штамма	21
2.3 Питательные среды и условия культивирования	21
2.4 Получение внутриклеточных экстрактов <i>Klebsiella oxytoca</i>	21
2.5 Определение числа колониеобразующих единиц (КОЕ)	22
2.6 Исследование адгезивных свойств бактерий по методу агглютинации дрожжей	23
2.7 Исследование протеолитической активности	23
2.7.1 Протеолитическая активность на азоказеине	23
2.7.2 Исследование протеолитической активности в отношении актина	24
2.8 Электрофорез белков в денатурирующих условиях	24
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	28

3.1 Морфология клеток штамма <i>Klebsiella oxytoca</i> НК	28
3.2 Определение соотношения оптической плотности культуры <i>Klebsiella oxytoca</i> НК и КОЕ/мл	29
3.3 Исследование адгезивных свойств <i>Klebsiella oxytoca</i> методом дрожжевой агглютинации	30
3.4 Исследование протеолитических свойств штамма <i>K. oxytoca</i> НК	31
3.4.1 Влияние на внутриклеточную протеолитическую активность <i>K. oxytoca</i> температуры культивирования, возраста культуры и состава среды	31
3.4.2 Влияние температуры культивирования на накопление внутриклеточной протеиназы <i>K. oxytoca</i> , ограниченно расщепляющей актин	37
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	42

Реферат

Среди нозокомиальных инфекций, наиболее распространенным видом являются катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей, на их долю приходится не менее 80% всех осложненных инфекций мочевыводящих путей [Hidron et al., 2008].

Штаммы *Klebsiella spp.* вызывают до 8% нозокомиальных инфекций и входят в число восьми наиболее активных возбудителей нозокомиальных инфекций [Podschun, 1988]. Особого внимания заслуживает представитель рода клебсиелл – *Klebsiella oxytoca* – который, хотя и уступает *K. pneumoniae* по патогенному действию, но, выступая в роли оппортуниста, может вызывать госпитальные пневмонии, инфекции мочевыводящих путей и даже смертельные септические состояния. Главной причиной является почти постоянная множественная антибиотикорезистентность *K. oxytoca*, включающая устойчивость к карбапенемам, амикацину и фторхинолонам [Hidron et al., 2008].

С появлением устойчивых к антибиотикам клебсиелл появляется потребность в понимании молекулярных механизмов взаимодействия бактерий и хозяев, механизмов защиты организма хозяина, а также механизма вирулентности самой бактерии. Известно, что протеолитические ферменты бактерий играют важную роль в патогенезе инфекционных болезней [Fakruddin et al., 2000]. Металлопротеазы, самые разнообразные из шести основных типов протеаз, вызывают большой интерес, поскольку играют важную роль во взаимодействиях хозяина с патогеном, способствуют энтеропатогенности, сосудистой проницаемости, повреждению тканей хозяина и цитотоксичности [Miyoshi 2000].

При исследовании свойств бактериальной металлопротеазы ECP32, ограниченно расщепляющей актин в единственном сайте, интенсивно вовлеченном в контакт между мономерами актина в полимере, было показано, что непатогенные бактерии-продуценты протеазы ECP32 способны проникать в клетки эукариот и вызывать реорганизацию их цитоскелета

[Efremova *et al.*, 2001]. Позднее было установлено, что бактерии-продуценты протеазы ECP32 - это *Serratia grimesii* [Bozhokina *et al.*, 2008]. В 2006 году в референтном штамме *S. grimesii* 30063 DZMO была обнаружена новая металлопротеаза – гримелизин, сходная с протеазой ECP32 по молекулярной массе, N-концевой последовательности, способности ограниченно расщеплять молекулу актина между Gly42 и Val43, образуя фрагменты с молекулярными массами 36 и 8 кДа [Khaitlina *et al.*, 1991]. В настоящее время в литературе нет данных о внутриклеточных протеиназах *K. oxytoca*.

Целью настоящей работы являлась характеристика биосинтеза гримелизино-подобной протеиназы *Klebsiella oxytoca* НК.

В связи с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1) Характеристика морфологии и тинкториальных свойств штамма *K. oxytoca* НК. Определение соотношения оптической плотности культуры и количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

2) Характеристика адгезивных свойств штамма *K. oxytoca* НК с помощью теста, основанного на дрожжевой агглютинации.

3) Определение влияния температуры культивирования, возраста культуры и состава среды на уровень общей внутриклеточной протеолитической активности *K. oxytoca*.

4) Характеристика закономерностей биосинтеза и накопления в клетках штамма *K. oxytoca* НК гримелизино-подобной протеиназы, специфически расщепляющей скелетно-мышечный актин.

Выводы:

1) Клетки штамма *K. oxytoca* НК представляют собой мелкие граммотрицательные палочки с закругленными концами, окруженные капсулой. Культура *K. oxytoca* с $OD_{600}=2.54$ ед содержит 6.6×10^8 КОЕ/мл.

2) С помощью метода дрожжевой агглютинации показали, что клетки *K. oxytoca* НК обладают манноза-нечувствительными фимбриями III типа. Адгезивные свойства клеток выше при культивировании их при 37 °С, в сравнении с 30°С.

3) Показали, что общая протеолитическая активность в клетках по расщеплению азоказеина максимально накапливается на 24 час при 37°C. На 48 час роста и культивировании бактерий при 30°C. активность культуры снижается. Протеолитическая активность зависит от состава среды: уровень активности в клетках выше при культивировании их на среде LB по сравнению с натуральной мочой.

4) Показали, что в клетках *K. oxytoca* НК содержится протеиназа, ограниченно расщепляющая скелетно-мышечный актин с образованием стабильного 36кДа-фрагмента. Максимальная активность наблюдается в экстракте 48-часовой культуры *K. oxytoca*, выращенной при 37 °C. Культивирование бактерий при 30°C ингибирует накопление гримелизино-подобной протеиназы.



АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Казанский (Приволжский)
федеральный университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Глушко А.А.
Факультет, кафедра, номер группы	
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА БИОСИНТЕЗ ГРИМЕЛИЗИНО- ПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ
Название файла	Глушко Алексей_диплом.docx
Процент заимствования	14,20%
Процент цитирования	1,25%
Процент оригинальности	84,55%
Дата проверки	12:05:39 30 мая 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС
Работу проверил	Зеленихин Павел Валерьевич ФИО проверяющего
Дата подписи	01.06.18  Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.