

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки (специализация): Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА И
ЗАКОНОМЕРНОСТИ БИОСИНТЕЗА ГРИМИЛИЗИНО-ПОДОБНОЙ
ПРОТЕИНАЗЫ

Обучающийся 4 курса
группы 01–002



Кузьмина А.А.

Научный руководитель
д-р биол. наук, доцент



Марданова А.М.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Общая характеристика бактерий рода <i>Klebsiella</i>	6
1.2 Медицинское значение бактерий рода <i>Klebsiella</i>	7
1.3 Факторы патогенности бактерий рода <i>Klebsiella</i>	11
1.4 Роль протеолитических ферментов в инфекционном процессе	17
1.5 Актиноподобные белки прокариот	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Объекты исследования	23
2.2 Питательные среды	23
2.3 Исследование адгезивных свойств <i>K. oxytoca</i> с помощью дрожжевой агглютинации	23
2.4 Исследование способности <i>K. oxytoca</i> к формированию биопленок	24
2.5 Биоинформатический анализ	24
2.6 Определение протеолитической активности на азоказеине	25
2.6.1 Общая внутриклеточная протеолитическая активность	25
2.6.2 Специфическая внутриклеточная протеолитическая активность	26
2.7 Инактивация гена гримилизин-подобной протеиназы <i>K. oxytoca</i>	26
2.7.1 Выделение плазмид	26
2.7.2 Трансформация бактерий плазмидой-помощником pKD46:GcR	26
2.7.3 Получение амплификатов для трансформации	27
2.7.4 Получение трансформантов с инактивированными генами металлопротеиназ	28
2.7.5 Окраска полученных трансформантов по Граму	29
2.8 Статистическая обработка результатов	29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Исследование адгезивных свойств <i>K. oxytoca</i> с помощью	31

дрожжевой агглютинации	
3.2 Исследование способности <i>K. oxytoca</i> к формированию биопленок	32
3.3 Биоинформатический анализ	33
3.4 Накопление внутриклеточной протеолитической активности <i>K. oxytoca</i> на разных питательных средах	36
3.4.1 Общая внутриклеточная активность <i>K. oxytoca</i>	36
3.4.2 Специфическая внутриклеточная протеолитическая активность	37
3.5 Инактивация генов внутриклеточной металлопротеиназы <i>K. oxytoca</i>	38
3.5.1 Трансформация бактерий плазмидой-помощником pKD46:GcR	38
3.5.2 Получение амплификатов для трансформации	39
3.5.3 Получение трансформантов с инактивированными генами металлопротеиназ	40
3.5.4 Окраска полученных трансформантов по Граму	42
ВЫВОДЫ	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	45

ВВЕДЕНИЕ

Внутрибольничные инфекции распространены и остаются одной из основных причин смертности и заболеваемости во всем мире [Boev, Kiss, 2017]. Зачастую они вызываются условно-патогенными бактериями. Многие из этих возбудителей являются антибиотикорезистентными микроорганизмами, что усложняет и в разы повышает стоимость лечения больного. Одними из основных возбудителей этих инфекций являются бактерии рода *Klebsiella* [Bachman, Martin, 2018]. Бактерии рода *Klebsiella* проявляют высокий уровень устойчивости к антибиотикам, что затрудняет лечение инфекций, вызванных такими штаммами [Karampatakis *et al.*, 2023]. *Klebsiella* способны вызвать большое количество заболеваний, связанных с пищеварительной и дыхательной системами людей и животных [Wang *et al.*, 2020]. Такие заболевания как гастрит, энтерит, гепатит и пневмония могут быть острыми, подострыми, а также хроническими; следовательно, они приводят к увеличению смертности среди людей и животных [Lenchenko *et al.*, 2014]. Когда иммунитет инфицированного организма снижается, вирулентность возбудителя возрастает, что приводит к усилению действия токсинов на слизистую оболочку кишечника, подавлению местных факторов защиты, воспалению и дисбактериозу [Chang *et al.*, 2021].

Патогенность бактерий рода *Klebsiella* связана с несколькими факторами вирулентности, которые позволяют им избежать врожденных иммунных механизмов хозяина [Russo, Mart, 2019]. Факторы вирулентности бактерий рода *Klebsiella* включают капсулы, экзополисахариды, связанные с выделением слизи, липополисахариды (LPS), адгезины и системы поглощения железа. *Klebsiella pneumoniae* - наиболее важный с медицинской точки зрения вид рода [Gundogan, 2014].

Klebsiella oxytoca – это бактерия рода *Klebsiella*, принадлежащая к семейству *Enterobacteriaceae*, является факультативно-анаэробной условно-патогенной бактерией. По форме представляют собой грамотрицательные неподвижные короткие толстые палочки, которые

располагаются одиночно, парами или небольшими цепочками. Бактерия имеет капсулу; она устойчива к воздействию окружающей среды и дезинфицирующих средств, а также многих антибиотиков [Dong *et al.*, 2022]. *K. oxytoca* имеет сложную антигенную структуру и содержит капсульные и соматические антигены и эндотоксин; некоторые штаммы могут продуцировать экзотоксины. Этот микроорганизм может вызывать пневмонию, острые кишечные инфекции, урогенитальные инфекции, менингит и сепсис [Nawras *et al.*, 2018].

Бактерии рода *Klebsiella* секретируют несколько видов протеаз, но большая часть протеолитической активности обеспечивается металлопротеазами. Металлопротеазы являются специфическими факторами вирулентности бактерий, способными взаимодействовать с рецепторами эукариотических клеток или модифицировать их, а также компоненты системы передачи сигнала и актинового цитоскелета [Khaitlina *et al.*, 2020]. Металлопротеазы бактерий активируют экспрессию металлопротеаз внеклеточного матрикса хозяина и тем самым влияют на развитие инфекции в организме [Elkington *et al.*, 2005].

Целью работы является характеристика свойств штамма *K. oxytoca* NK-1 и особенностей биосинтеза гримелизино-подобной протеиназы.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Характеристика адгезивных свойств уропатогенного изолята *K. oxytoca* NK-1 и способности к образованию биопленок при разных температурах.
- 2) Биоинформатический поиск в геноме *K. oxytoca* и других видов *Klebsiella* генов-гомологов гримелизина и анализ организации геномных локусов.
- 3) Характеристика протеолитической активности штамма *K. oxytoca* NK-1.
- 4) Инактивация гена гримелизино-подобной протеиназы *K. oxytoca* NK-1.

ВЫВОДЫ

1) Показали, что бактерии *K. oxytoca* обладают способностью к агглютинации дрожжевых клеток. D-манноза ингибирует агглютинацию бактерий на экспоненциальной фазе роста при инкубировании при 37 °С, что говорит об экспрессии фимбрий 1 типа. Установили, что оптимальной температурой для формирования биопленок *K. oxytoca* является 37 °С. При температуре 30 °С эффективность биопленкообразования была в 3 раза ниже.

2) Установили, что ген гипотетической гримелизиноподобной металлопротеиназы *K. oxytoca* находится в одном опероне с геном гипотетического белка подобно генам *S. grimesii*. Гомология аминокислотных последовательностей металлопротеиназ этих бактерий составляет 71%. Локусы оперонов гримелизино-подобной протеиназы и их окружение в геномах разных видов *Klebsiella* похожи. В геномах всех 4 рассмотренных видов бактерий после оперона пептидазы на противоположной цепи расположен оперон, содержащий гены гипотетического белка и транспортера.

3) Установили, что уровень и динамика накопления общей внутриклеточной протеолитической активности *K. oxytoca* NK-1 зависит от состава среды культивирования. Максимум активности на среде LB наблюдается на 72 ч роста, а на среде LB с содержанием 2% дрожжевого экстракта – на 24 ч роста. Внутриклеточная протеиназа *K. oxytoca*, расщепляющая актин с образованием 36 кДа фрагмента, накапливается в клетках на поздних стадиях роста культуры (48 ч), что характерно для гримелизина.

4) С помощью λ Red-опосредованной рекомбинации получили мутанты *K. oxytoca* с инактивированным геном гипотетической металлопротеиназы.