

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 (специализация): Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ  
МЕТАЛОПРОТЕИНАЗЫ ГРИМЕЛИЗИНА *SERRATIA GRIMESII*

Обучающийся 4 курса

группы 01-002



Галанина А.А.

Научный руководитель

д-р биол. наук, доцент



Марданова А.М.

Заведующий кафедрой микробиологии

д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 Бактерии рода <i>Serratia</i> как патогены человека .....	7
1.1.1 Таксономическое положение бактерий рода <i>Serratia</i> .....	7
1.1.2 Общая характеристика бактерий рода <i>Serratia</i> .....	9
1.1.3 Роль бактерий рода <i>Serratia</i> в инфекционной патологии .....	11
1.2 Протеолитические ферменты бактерий .....	13
1.2.1 Общая характеристика и классификация протеолитических ферментов .....	13
1.2.2 Металлопептидазы семейства M4 .....	14
1.3 Механизм инвазии <i>S. grimesii</i> .....	17
1.4 Актиноподобные белки бактерий .....	19
<i>Заключение</i> .....	22
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	23
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	23
2.1 Объекты исследования .....	23
2.2 Питательные среды .....	23
2.3 Исследование адгезивных свойств <i>S. grimesii</i> A2 .....	23
2.4. Исследование способности к формированию биоплёнок <i>S. grimesii</i> A2 ..	24
2.5 Определение подвижности <i>S. grimesii</i> A2 .....	24
2.6 Определение протеолитической активности .....	24
2.6.1 Получение клеточного экстракта бактерий .....	24
2.6.2 Определение специфической протеолитической активности .....	25
2.6.3 Определение протеолитической активности на азоказине .....	25
2.7 Биоинформатический анализ .....	26
2.8 Статистическая обработка результатов .....	27
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	28

3.1 Характеристика свойств штамма-продуцента гримелизина .....	28
3.1.1 Исследование адгезивных свойств <i>S. grimesii</i> A2.....	28
3.1.2 Исследование способности <i>S. grimesii</i> A2 к формированию биоплёнок 29	
3.1.3 Влияние на подвижность <i>S. grimesii</i> A2 разных факторов .....	30
3.2 Характеристика внутриклеточной протеолитической активности <i>S. grimesii</i> A2 .....	33
3.2.1 Ограниченный протеолиз скелетно-мышечного актина клеточным экстрактом <i>S. grimesii</i> A2.....	33
3.2.2 Общая протеолитическая активность <i>S. grimesii</i> A2 .....	35
3.3 Биоинформатический анализ генома <i>S. grimesii</i> A2.....	38
3.3.1 Биоинформатический поиск актиноподобных белков в геноме <i>S. grimesii</i> A2 .....	38
3.3.3 Анализ строения локуса гена протеализина/гримелизина <i>S. grimesii</i> ....	40
3.3.2 Биоинформатический анализ пула протеолитических ферментов <i>S. grimesii</i> A2 .....	42
3.3.4 Анализ филогенетического дерева металлопротеиназы гримелизина и его гомологов.....	43
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>46</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>47</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....</b>	<b>56</b>

## ВВЕДЕНИЕ

*Serratia* представляет собой уникальную группу микроорганизмов, относящихся к семейству *Yersiniaceae*. Наиболее клинически значимым видом рода *Serratia* является *Serratia marcescens*, однако исследования показали, что и *Serratia grimesii* может обнаруживаться в цитоплазме инфицированных клеток [Bozhokina, 2011]. Известно, что *Serratia* может стать причиной инфекции дыхательных и мочевыводящих путей [Breijyeh *et al.*, 2020]. Среди факторов вирулентности выделяют: способность образовывать биоплёнки, подвижность, синтез протеаз, гемолизинов и липополисахаридов [Govindarajan, Kandaswamy, 2022].

*Serratia* синтезирует широкий спектр протеолитических ферментов, в том числе и уникальных для этого рода. *S. grimesii* представляет особый интерес за счёт способности синтезировать металлопротеиназу гримелизин, который ограниченно расщепляет полипептидную связь в ДНК-аза I связывающей петле актлина с образованием стабильных фрагментов в 36 и 8 кДа. Это свойство гримелизина позволяет изучать структурно-функциональные свойства скелетно-мышечного актлина [Khaitlina *et al.*, 2020]. Также установлено, что гримелизин играет роль в инвазии бактериями эукариотических клеток [Bozhokina *et al.*, 2019]. Согласно данным литературы эффективность инвазии сerratий составляет около 10%. Однако факторы, которые сопровождают внутрибольничные инфекции, вызванные *Serratia*, могут её усилить путем модификации клеточных рецепторов [Bozhokina, 2013].

Целью данной работы является характеристика штамма *Serratia grimesii* A2 и определение особенностей биосинтеза внутриклеточной металлопротеиназы гримелизина.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Охарактеризовать адгезивные свойства *S. grimesii* A2 и способность к образованию биоплёнок при разных температурах.

2) Охарактеризовать влияние глюкозы, мочевины и температуры среды на подвижность *S. grimesii* A2.

3) Охарактеризовать внутриклеточную протеолитическую активность *S. grimesii* A2 и влияние состава среды культивирования на уровень накопления ферментов.

4) Провести биоинформатический поиск в геноме *S. grimesii* генов-гомологов скелетно-мышечного актина.

5) Провести биоинформатический анализ представленности генов протеолитических ферментов в геноме *S. grimesii*.

## ВЫВОДЫ

1) Штамм *Serratia grimesii* A2 способен к агглютинации дрожжевых клеток и обладает чувствительными к маннозе (1 тип) и устойчивыми к маннозе (3 тип) фимбриями. Адгезивные свойства бактерий не зависят от температуры, однако увеличение температуры до 37 °С стимулирует образование биоплёнок.

2) *S. grimesii* A2 способна к плавающей подвижности на полужидких средах (0.25% и 0.33% агара). Оптимальными условиями являются температура 30 °С и низкая плотность среды (0.25% агар). Повышенная температура и мочевины ингибируют плавающую подвижность, в то время как глюкоза на неё не влияет.

3) Состав среды влияет на накопление внутриклеточной протеолитической активности *S. grimesii* A2. Наибольшая продуктивность наблюдается на среде LB. Добавление в среду 1.5% глюкозы, 1-2% дрожжевого экстракта и 2-3% триптона приводит к снижению протеолитической активности. Максимальный уровень внутриклеточной протеолитической активности достигается к фазе отмирания культуры.

4) В геноме *S. grimesii* идентифицировали гены двух актиноподобных белков: *mreB* и *ftsA*. Третичная структура белка MreB близка конформации скелетно-мышечного актина.

5) В геноме *S. grimesii* аннотировано 103 гена протеолитических ферментов. Доминирующими группами являются металлопротеазы – 41 ген и сериновые протеазы – 38 генов. Ген протеализина консервативен внутри рода *Serratia* и организован в виде оперона, состоящего из двух генов.