

На правах рукописи



МИННУЛЛИНА ЛЕЙЛА ФАРВАЗОВНА

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ
*MORGANELLA MORGANII***

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2020

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» на базе НИЛ Микробные биотехнологии

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Марданова Айслу Миркасымовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор кафедры биологической химии, физики и математики факультета биотехнологии и стандартизации ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана»
Алимов Азат Миргасимович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории цитологии одноклеточных организмов, руководитель Группы молекулярной цитологии прокариот и бактериальной инвазии ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург
Вишняков Иннокентий Евгеньевич

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора РФ, г. Казань

Защита диссертации состоится «28» мая 2020 г. в 14 ч на заседании диссертационного совета КФУ.03.07 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»: <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

О. А. Кравцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Несмотря на все достижения медицины, инфекционные заболевания продолжают оставаться серьезной проблемой для системы здравоохранения. Открытие антибактериальных веществ позволило человечеству практически забыть о таких страшных недугах, как чума или сибирская язва, но в XX-XXI вв. им на смену пришли заболевания, возбудителями которых являются на первый взгляд совершенно безобидные микроорганизмы. Один из таких микроорганизмов – бактерия *Morganella morganii* – нормальный обитатель толстого кишечника млекопитающих, который при определенных условиях может стать причиной широкого спектра нозокомиальных и внебольничных инфекций, среди которых особое место занимают инфекции мочевыводящих путей (ИМП) [Lin *et al.*, 2015; Erlanger *et al.*, 2019]. В последние годы увеличиваются случаи обнаружения в клинических образцах изолятов *M. morganii*, характеризующихся свойствами продуцентов β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) [Liu *et al.*, 2016; Akinbami *et al.*, 2018; Szabó *et al.*, 2018]. В связи с быстрым ростом резистентности среди возбудителей оппортунистических инфекций возникает необходимость в поиске альтернативных методов борьбы с подобными микроорганизмами.

Для возникновения инфекционного процесса необходимо, чтобы микроорганизм был способен к синтезу веществ, способствующих сохранению и размножению возбудителя в организме хозяина, веществ, повреждающих клетки и ткани макроорганизма и подавляющих активность его иммунной системы, которые в совокупности именуется факторами вирулентности [Meena *et al.*, 2019]. К подобным факторам принято относить адгезины, способствующие прикреплению бактерий к клеткам эукариот [Joo, Otto, 2012], цитотоксины и гидролитические ферменты, повреждающие клетки хозяина [Reis, Horn, 2010; Ristow, Welch, 2016], а также способность к подвижности и формированию клеточных ассоциаций [Yazdi, Ardekani, 2012; Lüthje, Brauner, 2014]. Детальное изучение данных факторов может стать ключом к созданию новых методов антимикробной терапии. Так, компоненты MR/P-фимбрий *Proteus mirabilis* – MrpH и MrpA [Armbruster *et al.*, 2018], комбинация белков FimH и FimC фимбрий I типа *Escherichia coli*, а также гемолизин HlyA зарекомендовали себя в качестве потенциальных вакцин для профилактики инфекций мочевыводящих путей в группах повышенного риска [Asadi Karam *et al.*, 2019]. На рынке уже много лет присутствует препарат Solco-Urovac, содержащий убитые уропатогены из 5 видов (*E. coli*, *P. mirabilis*, *M. morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*), который обладает определенной долей эффективности против рецидивирующих форм инфекций мочевыводящих путей [Uehling *et al.*, 2003].

В последние годы увеличивается частота встречаемости *M. morganii* как по всему миру, так и на территории России [Glinskaya *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016]. При этом факторы вирулентности *M. morganii* до сих пор остаются малоизученными, поскольку большая часть научных статей с упоминанием данного микроорганизма являются лишь описаниями клинических случаев. На сегодняшний день в литературе имеются данные о гемолитических свойствах [Senior, Hughes, 1988;

Eberspächer *et al.*, 1990] и антибиотикорезистентности *M. morganii* [Brízio *et al.*, 2006; Rozales *et al.*, 2014; Kukla *et al.*, 2018], а также об анализе ее генома на наличие генов вирулентности [Chen *et al.*, 2012; Olaitan *et al.*, 2014] и генов резистентности к антимикробным веществам [Singh *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019]. Однако данного количества информации недостаточно для успешной борьбы с этим возбудителем, что создает необходимость в детальном изучении факторов вирулентности и генетических детерминант, опосредующих экспрессию данных факторов.

Цель и задачи исследований. Цель работы – анализ геномов и сравнительная характеристика факторов вирулентности уропатогенных штаммов *Morganella morganii*.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

1. Провести сравнительную характеристику морфологических и физиологических свойств урологических изолятов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190. Секвенировать геномы штаммов *M. morganii* и провести их биоинформатический анализ.

2. Охарактеризовать адгезию штаммов *M. morganii* к абиотическим и биотическим субстратам в зависимости от температуры культивирования. Идентифицировать генетические детерминанты, ответственные за процесс адгезии.

3. Выявить влияние температуры на формирование жгутиков и подвижность штаммов *M. morganii* и провести сравнительный анализ генетических детерминант, ответственных за данный признак.

4. Идентифицировать ген внутриклеточной металлопротеиназы в геномах штаммов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190, изучить его экспрессию и провести клонирование в клетках *E. coli* DH5α.

5. Установить влияние температуры и состава среды на гемолитическую активность *M. morganii*, определить вклад гемолитической активности в цитотоксичность штаммов. Идентифицировать гены гемолизина в геномах штаммов *M. morganii* и провести их биоинформатический анализ.

Научная новизна. Проведены секвенирование и сравнительный анализ геномов трех урологических изолятов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190, выделенных на территории г. Казани. Установлено, что геномы штаммов различаются между собой по количеству и составу профагов и островов патогенности. Показано, что штаммы *M. morganii* способны к адгезии и плавающей подвижности, последняя из которых зависит от температуры культивирования. Проведен биоинформатический анализ генетических детерминант, ответственных за данные признаки. Впервые определена экспрессия гена термолизинной металлопротеиназы *M. morganii* и проведено его клонирование в клетках *E. coli* DH5α. Установлено, что цитотоксичность урологических изолятов *M. morganii* коррелирует с их способностью синтезировать гемолизин, гомологичный α-гемолизину *E. coli*. Впервые показано, что оперон, кодирующий данный токсин, привнесен в геном *M. morganii* профагом, гомологичным фагу 118970_sal4 *Salmonella*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные будут способствовать лучшему пониманию биологии *M. morganii* как возбудителя оппортунистических инфекций, а также расширению знаний о вирулентных свойствах уропатогенных бактерий. Результаты экспериментов по изучению адгезивных, гемолитических свойств и подвижности урологических изолятов *M. morganii* могут быть использованы при создании вакцин для профилактики инфекций мочевыводящих путей, вызванных данным микроорганизмом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Геномы уропатогенных штаммов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 имеют высокую гомологию, но различаются по количеству и составу профагов и островов патогенности. Потеря термочувствительной регуляции подвижности у *M. morganii* MM 1 обусловлена вставкой фрагмента длиной в 17.7 кб после гена *fliE* флагеллярного регулона.

2. Цитотоксичность штаммов *M. morganii* в отношении клеток карциномы мочевого пузыря линии T24 коррелирует с синтезом RTX-токсина, ген которого обладает 76% идентичностью с геном α -гемолизина уропатогенной *E. coli* 536 и привнесен в геномы *M. morganii* профагом, гомологичным фагу 118970_sal4 *Salmonella*.

Степень достоверности полученных результатов подтверждается большим количеством экспериментов, проведенных с использованием современного высокоточного оборудования и анализированных с помощью соответствующего программного обеспечения, а также публикацией полученных данных в рецензируемых научных изданиях.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на международных и всероссийских конференциях: XVIII, XIX Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2014, 2015), VII Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014), I-III Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2014, 2016, 2018), XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2015), I Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015), 69-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение и управление» (Н. Новгород, 2016), V Съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016), Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной генетики» (Казань, 2016), Российско-Китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии «XX Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2017), VI Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Микробиология в современной медицине» (Казань, 2018), VI Международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2019), Российско-немецком семинаре «Взаимодействие: от клетки до человека» (Казань, 2019).

Связь работы с научными программами и личный вклад соискателя. Работа выполнена на базе НИЛ Микробные биотехнологии в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-исследовательских центров. Исследования проводились при поддержке гранта РФФИ №13-04-97130-р_поволжье_а, а также гранта Академии наук Республики Татарстан для поддержки научных исследований молодых ученых РТ, проводимых на татарском языке, 2016 г. (договор №6 от 07.12.2016). Личный вклад автора работы заключается в разработке основной проблемы исследования, планировании, организации и реализации экспериментов, интерпретации полученных результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 научных работ, в том числе 4 статьи и 3 тезиса в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК (включая журналы, индексируемые WoS и Scopus), а также 2 статьи в журналах из перечня РИНЦ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, список сокращений, список литературы и приложение. Работа изложена на 167 страницах машинописного текста, содержит 36 рисунков, 15 таблиц и 2 приложения. Библиография включает 278 наименований публикаций российских и зарубежных авторов.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н., доценту кафедры микробиологии КФУ А. М. Мардановой за чуткое руководство и всестороннюю поддержку; д.б.н., профессору кафедры микробиологии КФУ М. Р. Шариповой за критические замечания при обсуждении работы; Д. С. Пудовой, З. С. Тошевой, к.б.н. Н. М. Замалютдиновой за помощь в организации экспериментов; к.б.н., ведущему специалисту Департамента образования КФУ А. В. Макеевой за подготовку для работы культуры клеток эукариот; к.б.н., с.н.с. НИЛ Экстремальная биология КФУ Е. И. Шагимардановой за проведение полногеномного секвенирования штаммов бактерий; сотрудникам Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ за проведение сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии образцов; сотрудникам Междисциплинарного центра геномных и протеомных исследований КФУ за секвенирование образцов ДНК. Автор выражает признательность всем сотрудникам кафедры микробиологии и НИЛ Микробные биотехнологии КФУ за полезные советы и доброжелательную атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1 Используемые штаммы бактерий, плазмиды и культуры клеток

Клинические изоляты *M. morganii* MM 1, *M. morganii* MM 4 и *M. morganii* MM 190, выделенные из мочи пациентов с внебольничными ИМП, были предоставлены для работы заведующей бактериологической лабораторией с отделением ПЦР исследований ООО ЛДЦ «Биомед» (г. Казань) М. А. Шалавиной. Урологический изолят *M. morganii* ZM был получен на базе клиники Charite (г.

Берлин, Германия) и предоставлен для работы д.б.н., в.н.с. Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург) С. Ю. Хайтлиной. Культура клеток карциномы мочевого пузыря линии T24 была получена из Российской коллекции клеточных культур (г. Санкт-Петербург).

В работе использовалась плазмида pBAD/Мус-His C (P_{BAD}, *mus*, 6×His, *araC*, *rrnB*, *bla*, pBR322), предназначенная для регулируемой экспрессии и очистки рекомбинантных белков из *E. coli* [Carson *et al.*, 1991; Schleif, 1992]. В качестве клеток-хозяев для рекомбинантных плазмид были выбраны клетки *E. coli* DH5α (*φ80d*, *lacZΔM15*, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA*, *relA1*, *Amp^s*, *F'Δ [lacZYA-argF]*) [Gibert *et al.*, 1990].

2 Используемые среды и условия культивирования

В качестве питательной среды для бактерий в работе использовали среду LB [Sambrook *et al.*, 1989]. Агаризованная среда LBA содержала 2% агара. Оптическую плотность культур определяли на микропланшетном спектрофотометре XMark Microplate Spectrophotometer (BioRad, США) при длине волны 590 нм.

Уреазную активность бактерий определяли на среде Кристенсена с мочевиной [Brink, 2010]. В экспериментах по изучению влияния состава среды на гемолитическую активность микроорганизмов использовалась натуральная моча. Мочу получали от детей в возрасте до 4 лет и стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

Для культивирования клеток эукариот использовали коммерческую среду α-MEM с L-глутамином (Биолот, Россия) без антибиотиков с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США) в конечной концентрации 10%. Эукариотические клетки засевали в 12-луночные планшеты в концентрации 2×10^5 клеток/лунку и растили в течение 24 часов при 37 °C в присутствии 5% CO₂.

3 Исследование гемолитических свойств культур

Для характеристики гемолитических свойств бактерии культивировали на кровяном агаре (КА), содержащем 5% крови человека.

Накопление гемолизина в среде культивирования оценивали по методике [Senior, Hughes, 1988] с использованием 2% суспензии эритроцитов человека. Степень гемолиза определяли по оптической плотности супернатанта, измеренной при длине волны 540 нм. Для этого использовали формулу [Rattanama *et al.*, 2012]:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{(OD_{540} \text{ опыт} - OD_{540} \text{ контроль}^-)}{(OD_{540} \text{ контроль}^+ - OD_{540} \text{ контроль}^-)} \times 100 \quad (1),$$

где *контроль*[–] – среда культивирования без бактерий, *контроль*⁺ – деионизированная вода.

4 Определение цитотоксичности штаммов бактерий

Клетки T24, выращенные стандартным образом, промывали стерильным 1×PBS (Sigma-Aldrich, США) и инфицировали 12-часовой суспензией бактерий в среде α-MEM в соотношении 1:50, после чего инкубировали в течение 2 ч при 37 °C в присутствии 5% CO₂. Затем среду сливали, лунки промывали 1×PBS и окрашивали 0.2% раствором трипанового синего в течение 5 мин. После чего краситель сливали, а лунки просматривали под инвертированным микроскопом Axio Vert A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 63×. Цитотоксичность штаммов оценивали по количеству окрашенных клеток эукариот в поле зрения микроскопа.

5 Изучение адгезивных свойств бактерий

Определение адгезии к абиотическим поверхностям. Ночную культуру бактерий разводили до оптической плотности $OD_{590} \approx 0.05$ и засеивали в пластиковые чашки Петри ($d=4$ см). Чашки инкубировали при температурах 30°C и 37°C в течение 2 ч, после чего среду сливали, чашки промывали стерильной водопроводной водой и окрашивали 0.1% раствором генцианового фиолетового в течение 15 мин. Затем чашки промывали водой, высушивали на воздухе и просматривали под световым микроскопом при увеличении $40\times$ и $100\times$.

Выявление MS- и MR-фимбрий методом дрожжевой агглютинации. О наличии фимбрий на поверхности бактерий судили по скорости агглютинации клеток дрожжей в 2% суспензии при инкубировании с культурой бактерий (2.4×10^8 КОЕ/мл) [Eshdat *et al.*, 1981]. Типы фимбрий определяли по наличию/ отсутствию агглютинации в 1% растворе D-маннозы.

Определение адгезии бактерий к живым клеткам. Клетки T24 выращивали на покровных стеклах до образования 70% монослоя, промывали стерильным $1 \times \text{PBS}$ и инфицировали 12-часовой культурой бактерий в среде α -MEM в соотношении 50 бактериальных клеток на 1 эукариотическую. Планшеты инкубировали в течение 30-120 мин при 37°C , после чего стекла промывали $1 \times \text{PBS}$ и фиксировали 1% раствором глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 12-16 часов при комнатной температуре. Затем препараты промывали $1 \times \text{PBS}$ и обезживали путем проведения через ряд растворов этанола восходящей концентрации: 30%-50%-70%-80%-90%-96%.

Стекла высушивали и изучали под сканирующим электронным микроскопом Merlin (Carl Zeiss, Германия) на базе Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ.

6 Определение подвижности бактерий

Определение плавающей подвижности бактерий. Для определения способности бактерий к плавающей подвижности использовали полужидкую среду LBA, содержащую 0.33% агара [Ha *et al.*, 2014].

Выявление жгутиков на поверхности бактерий. 24-часовую культуру бактерий осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 10°C и 2000 об/мин, после чего промывали 0.1 М натрий-фосфатным буфером [Kuo, 2007]. Суспензию бактерий в буфере наносили на подложку, высушивали и изучали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7700 Exalens (Hitachi, Япония) на базе Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ.

7 Определение протеолитической активности

Получение внутриклеточного экстракта бактерий проводили методом ультразвуковой дезинтеграции [Harlow, Lane, 1999]. Способность к расщеплению азоказеина оценивали по методике, описанной в работе [Demidyuk *et al.*, 2006]. При исследовании способности к расщеплению актина использовали скелетно-мышечный актин, выделенный из ацетонового порошка мышц кролика [Божокина, 2008; Bozhokina *et al.*, 2011]. Степень расщепления актина анализировали методом SDS-ПААГ-электрофореза [Laemmli, 1970] с использованием белковых маркеров PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США).

8 Выделение ДНК

Выделение плазмидной ДНК. Выделение плазмидной ДНК из клеток-трансформантов осуществляли с помощью коммерческого набора GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Выделение геномной ДНК. Для проведения реакции ПЦР геномную ДНК из клеток бактерий выделяли с помощью набора GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, США) согласно инструкциям фирмы-производителя.

Выделение геномной ДНК бактерий для полногеномного секвенирования проводили методом фенол-хлороформной экстракции [Wright *et al.*, 2017]. Полногеномное секвенирование было проведено к.б.н., с.н.с. НИЛ Экстремальная биология КФУ Е. И. Шагимардановой. Секвенирование осуществлялось на платформе Illumina HiSeq2500 (Illumina, США) с использованием геномной библиотеки из двуцепочечных фрагментов длиной в 251 н. п.

9 Анализ экспрессии генов и полимеразная цепная реакция

Выделение тотальной РНК. Для выделения РНК из бактерий использовали коммерческий набор GeneJet RNA Purification Kit (Thermo Scientific, США).

Определение экспрессии гена методом обратной транскрипции. Для получения кДНК из образцов РНК использовали набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Полученные в ходе реакции продукты были использованы в качестве матрицы для амплификации методом классической ПЦР.

Полимеразная цепная реакция. Полимеразную цепную реакцию проводили по методу [Mullis, Faloona, 1987] с использованием амплификатора MJ Mini Gradient Thermal Cyclер (BioRad, США). ПЦР-продукты анализировали методом горизонтального электрофореза в 1.5%-ом агарозном геле на основе 1×ТАЕ-буфера [Sambrook *et al.*, 1989]. Секвенирование ПЦР-амплификатов проводилось сотрудниками Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ.

10 Клонирование генов

Рестрикция и лигирование. В качестве рестриктаз использовали *EcoRI* и *HindIII* (СибЭнзим, Россия). В качестве контрольной бралась ДНК фага λ с молекулярной массой 48.5 кб и количеством сайтов рестрикции $n_1=5$ (для *EcoRI*) и $n_2=6$ (для *HindIII*). Реакцию рестрикции осуществляли согласно протоколу производителя соответствующих эндонуклеаз. Реакцию лигирования проводили с использованием Т4-ДНК-лигазы (СибЭнзим) согласно протоколу производителя.

Подготовка компетентных клеток и трансформация. Подготовку компетентных клеток *E. coli* DH5 α и их химическую трансформацию проводили согласно [Sambrook *et al.*, 1989]. Трансформанты отбирали на среде LBA, содержащей 100 мкг/мл ампициллина.

Индукция экспрессии гена. 1 мл ночной культуры трансформантов разводили в 10 мл LB-бульона с ампициллином (100 мкг/мл) и культивировали до достижения OD₅₉₀≈0.5. Далее к культурам добавляли L-арабинозу в конечной концентрации 0.02% и инкубировали 4 часа. Затем культуры осаждали в течение 5 мин при 13000 об/мин. Осадок промывали в 0.85% растворе NaCl и замораживали.

Выделение рекомбинантного белка. Разрушение клеток-трансформантов проводили методом замораживания-оттаивания. Бактерии ресуспензировали в растворе, содержащем 5 мМ трис-HCl и 0.1 мМ CaCl₂ (pH 7.5). Суспензии замораживали-оттаивали 6-7 раз, после чего центрифугировали в течение 30 мин при 4 °C и 15000 об/мин. Супернатант отбирали в чистую пробирку и замораживали.

Анализ экспрессии рекомбинантного гена. Экспрессию гена в клеточных экстрактах трансформантов определяли методом SDS-ПААГ-электрофореза [Laemmli, 1970] с последующим вестерн-блоттингом [Towbin *et al.*, 1979] с использованием специфичных к His-tag-последовательности антител Anti-6×-His Epitope Tag Monoclonal Antibody (Thermo Scientific, США).

11 Биоинформатический анализ данных

Для поиска референсных генов была использована БД GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и программа BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Конструирование праймеров проводили с помощью программы Primer-BLAST. Идентификацию и выравнивание секвенированных последовательностей осуществляли с помощью blastn. Для поиска открытых рамок считывания использовали программу «Трансляция нуклеотидной последовательности» (http://molbiol.ru/scripts/01_13.html). Программа BPROM была использована для анализа промоторных участков исследуемых генов [Solovyev, Salamov, 2010]. Графические изображения множественного выравнивания последовательностей были получены с помощью MUSCLE [Edgar, 2004] и BioEdit (v. 7.0.0) [Hall, 1999]. Программу Phyre2 использовали для определения аминокислотных остатков активного центра ферментов [Kelley, Sternberg, 2009].

Анализ результатов полногеномного секвенирования и сборку геномов проводили с помощью программного обеспечения на базе ОС Linux-4.4.0-103-generic-x86_64-with-Ubuntu-16.04-xenial с использованием программ Trimmomatic-0.36 [Bolger *et al.*, 2014] и SPAdes-3.10.0 [Bankevich *et al.*, 2012]. Геномы были проаннотированы с использованием NCBI Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline (NCBI PGAP) [Angiuoli *et al.*, 2008] и сервера RAST [Aziz *et al.*, 2008]. Для поиска родственных геномов использовали программу JSpeciesWS [Richter *et al.*, 2016]. Выравнивание геномов относительно референсной последовательности проводили в программах MeDuSa [Bosi *et al.*, 2015] и BRIG [Alikhan *et al.*, 2011], расчет пан-генома и универсального генома – на платформе EDGAR 2.0 [Blom *et al.*, 2016]. Для сравнительного анализа геномных локусов использовались программы Easyfig [Sullivan *et al.*, 2011] и MAUVE [Darling *et al.*, 2004]. Присутствие фаговых последовательностей в геномах оценивали с помощью программы PHASTER [Arndt *et al.*, 2016] и Virus-Host DB [Mihara *et al.*, 2016], островов патогенности – IslandViewer4 [Bertelli *et al.*, 2017]. GC-состав последовательностей рассчитывали с использованием GC Content Calculator (<https://jamiemcg.github.io/bioinf/gc.html>).

12 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel 2013 и Statgraphics Plus 5.1. Достоверность полученных данных оценивали путем расчета t-критерия Стьюдента при уровне значимости $\alpha = 5\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Характеристика штаммов *Morganella morganii*

Исследовали морфологию клеток трех штаммов *M. morganii* методом окраски по Граму и с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ): клетки штаммов ММ 1 и ММ 4 представляют собой грамотрицательные короткие палочки с закругленными концами, в то время как бактерии *M. morganii* ММ 190 представлены длинными крупными палочками.

Отмечены различия в характере роста штаммов *M. morganii* в жидкой среде: *M. morganii* ММ 190, в отличие от двух остальных штаммов, обладает более низкой скоростью роста и способностью к самоагрегации с формированием в жидкой среде конгломератов, наблюдаемых невооруженным глазом. Причиной самоагрегации могут быть гидрофобные свойства клеток, взаимодействие положительно или отрицательно заряженных структур на поверхности клеток с противоположно заряженными агглютинидами, но чаще всего – гомотипические взаимодействия белков внешней мембраны (фимбрии, *curli*-волокна, жгутики, интегральные трансмембранные белки, белки-аутотранспортеры) [Trunk *et al.*, 2018].

Методом последовательных микроразведений установили, что все штаммы *M. morganii* обладают резистентностью к ампициллину, амоксициллин-клавуланату, колистину, что согласуется с данными литературы [Chen *et al.*, 2012; Экспертные правила EUCAST, 2016], а также имипенему, а штаммы ММ 1 и ММ 4 в добавок проявляют устойчивость к тигециклину. Отмечен высокий уровень МПК имипенема по сравнению с другими карбапенемами, а также повышение МПК при добавлении клавулановой кислоты к цефтазидиму, что характерно для продуцентов AmpC [Jacoby, 2009]. Исходя из результатов анализа категории чувствительности в присутствии ингибиторов β-лактамаз, ни один из штаммов не является продуцентом БЛРС.

Таким образом, показано, что урологические изоляты *M. morganii* ММ 1, ММ 4 и ММ 190 обладают уреазной активностью и природной устойчивостью к некоторым пенициллинам и полимиксинам. *M. morganii* ММ 190 отличается от остальных штаммов крупными размерами клеток, замедленным ростом и отсутствием резистентности к тигециклину.

2 Геномы клинических изолятов *Morganella morganii*

2.1 Сборка геномов *M. morganii* и их общая характеристика

Сравнительный анализ геномов бактерий позволяет выявить внутривидовую вариабельность между штаммами, что может объяснить их фенотипические различия, в частности, по степени вирулентности [Tettelin *et al.*, 2008]. Геномы штаммов *M. morganii* ММ 1, ММ 4 и ММ 190 были секвенированы на платформе Illumina HiSeq2500, собраны в 21, 36 и 63 контига соответственно и аннотированы с помощью программы NCBI PGAP. Результаты аннотирования загружены в БД нуклеотидных последовательностей DDBJ/ENA/GenBank под следующими идентификационными номерами: QUOO000000000 для ММ 1, QPLM000000000 для ММ 4 и QMKL000000000 для ММ 190.

Геномы *M. morganii* ММ 1, ММ 4 и ММ 190 имеют размеры 3.88 Мб, 3.82 Мб и 3.97 Мб с GC-составом 51.0%, 51.0% и 50.9% соответственно, что согласуется со

значениями из БД Genome. Пан-геном штаммов составляет 4038 генов, а универсальный геном включает 3279 последовательностей. 221, 30 и 244 последовательностей *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 являются уникальными для данных штаммов (рисунок 1А), большинство из которых кодируют фаговые, либо гипотетические белки.

Ближайшим гомологом штамма *M. morganii* MM 1 (98.98%) является штамм *M. morganii* FDAARGOS_63 (CP026046.1), выделенный из раны. В отличие от него, *M. morganii* MM 4 и MM 190 обнаружили наибольшую степень сходства (99.92% и 99.91% соответственно) со штаммом *M. morganii* FDAARGOS_172 (CP014026.2), который выделен из мочи пациента с ИМП. Штаммы MM 1, MM 4 и MM 190 обладают 98.58%, 99.88% и 99.89% гомологией с геномом *M. morganii* KT (CP004345.1), используемым в качестве референсного. Структура геномных локусов штаммов характеризуются высокой гомологией, однако, геном MM 1 содержит участки небольшого размера, не обнаруженные у штаммов MM 4 и MM 190, что может свидетельствовать об общем происхождении последних. Количество общих генов для штаммов *M. morganii* FDAARGOS_172, KT, MM 1, MM 4 и MM 190 составляет 3123, а уникальных последовательностей – 78, 223, 181, 30 и 200 соответственно (рисунок 1Б).

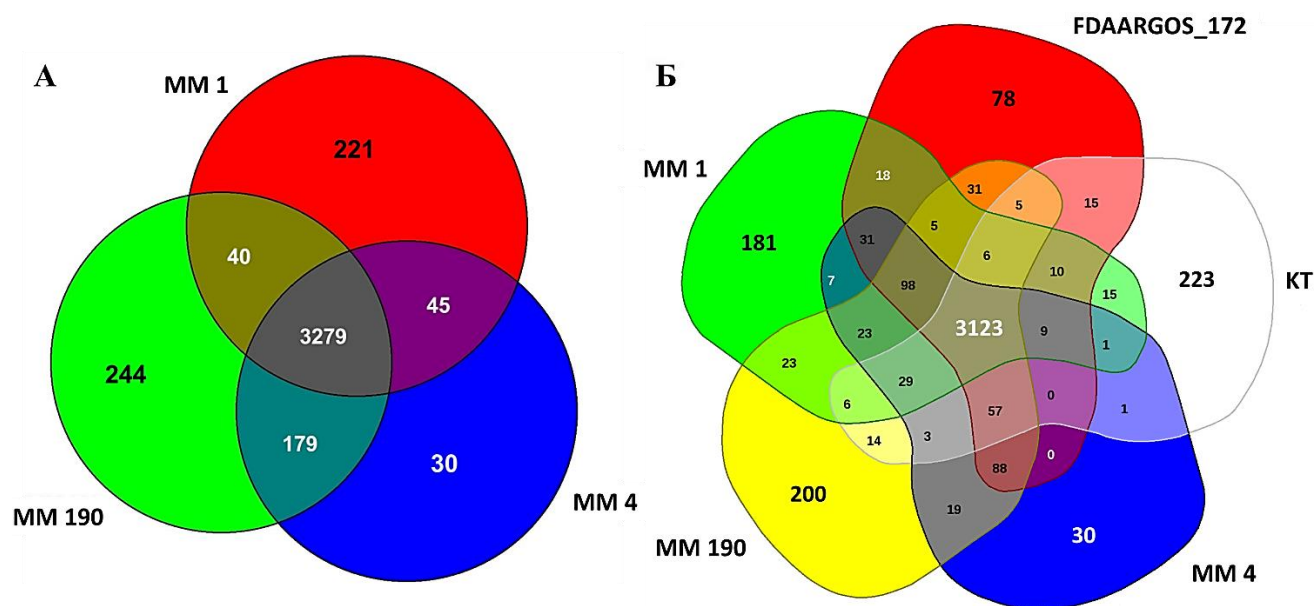


Рисунок 1. Диаграмма Венна, показывающая количество общих и уникальных последовательностей для штаммов: А – *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190, Б – *M. morganii* MM 1, MM 4, MM 190, KT и FDAARGOS_172. Получено с помощью программы EDGAR 2.0.

2.2 Функциональная аннотация геномов

Функциональная аннотация геномов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 показала, что они очень схожи по количеству генов, ассоциированных с вирулентностью. По суммарным данным RAST и NCBI PGAP геномы MM 1, MM 4 и MM 190 содержат (включая гены факторов транскрипции и компонентов систем секреции) 73-77 генов, ответственных за синтез адгезинов и образование фимбрий, 60-65 генов, связанных с формированием жгутиков, 30-33 генов, кодирующих токсины, 4 гена, регулирующих синтез капсул и других поверхностных структур, и 7 генов

уреазного кластера. Подобная ситуация характерна и для штаммов *M. morganii* SC01 [Khatrī *et al.*, 2013] и *M. morganii* TW17014 [Singh *et al.*, 2015], выделенных из кала.

Многие болезнетворные бактерии содержат в своем геноме интактные или поврежденные профаги [Casjens, 2003; Davies *et al.*, 2016], несущие гены, ассоциированные с вирулентностью [Brüssow *et al.*, 2004]. Высокая частота рекомбинации в данных участках позволяет профагам быстро эволюционировать, а вместе с ними и бактериям, что создает высокую вариабельность внутри вида [Javadi *et al.*, 2017]. В геномах *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 было обнаружено 7, 6 и 10 профагов, составляющих соответственно 5.4%, 3.1% и 6.2% от размера генома. Количество интактных профагов равно 4 для MM 1 и MM 4, и 5 для MM 190. В геномах штаммов MM 4 и MM 190 обнаружен профаг, гомологичный фагу 118970_sal4 (NC_030919) рода *Salmonella* [Paradiso *et al.*, 2016], содержащий последовательность *hlyCABD*-оперона, ответственного за синтез RTX-токсина. Общее количество уникальных профагов для трех штаммов составило 16. Полученные данные являются типичными для энтеробактерий. Например, *E. coli* K-12 содержит в своем геноме 9 профагов, составляющих 3.6% генома [Wang *et al.*, 2010]. Подобное характерно и для бактерий *M. morganii*. Так, штамм *M. morganii* F675 содержит в своем геноме 9 участков фагового происхождения (6 полных и 3 неполных), которые составляют 7.3% от его размера [Olaitan *et al.*, 2014]. Геном *M. morganii* INSRAV892a включает 10 профагов [Jones-Dias *et al.*, 2016]. Наконец, для штамма *M. morganii* KT характерно 2 полных и 12 неполных профагов, представляющих 7% последовательности генома, которые обнаруживаются также у *P. mirabilis*, *Providencia alcalifaciens* и *Providencia rustigianii* [Chen *et al.*, 2012].

Гены факторов вирулентности часто входят в состав островов патогенности (PAIs), которые широко распространены среди возбудителей инфекций [Hacker, Kaper, 2000]. К примеру, ген α -гемолизина уropатогенных штаммов *E. coli* (UPEC) кодируется PAIs [Schmidt, Hensel, 2004; Javadi *et al.*, 2017]. В геномах *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 было обнаружено 16, 15 и 25 PAIs соответственно размером от 4.2 до 19.1 кб, которые несут гены фаг-ассоциированных белков, гены устойчивости к мышьяку и гены некоторых токсинов. Показано, что штаммы *M. morganii* MM 4 и MM 190 содержат в своем геноме PAI размером в 11.3 кб, который несет ген RTX-токсина. В отличие от штаммов MM 4 и MM 190, один из островов патогенности *M. morganii* MM 1 (24.1 кб) включает 2 оперона флагеллярного регулона. Для UPEC характерно присутствие от 4 до 8 PAIs на геном [Vejborg *et al.*, 2011], однако в литературе недостаточно данных о распространенности PAIs среди штаммов *M. morganii*. Так, известно лишь, что штамм *M. morganii* DG56-16, выделенный из печени крокодиловой ящерицы, содержит в своем геноме 11 PAIs [Jiang *et al.*, 2019].

Таким образом, между штаммами *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 не обнаружено существенных различий по количеству генов, ассоциированных с вирулентностью. Однако, установлено, что они отличаются по количеству и составу встроенных в геном профагов и островов патогенности, несущих гены факторов вирулентности. Наибольшее количество подобных элементов обнаружено у штамма *M. morganii* MM 190, обладающего также наибольшим размером генома.

3 Характеристика адгезивных свойств *Morganella morganii*

Способность уропатогенных бактерий прикрепляться к поверхности уретральных катетеров и эпителию мочевыводящих путей является необходимым этапом для возникновения ИМП [Kalita *et al.*, 2014; Lüthje, Brauner, 2014]. Определяли способность бактерий *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 адгезировать к поверхности пластиковых чашек Петри (d=4 см) в течение 2 ч при температурах культивирования 30 °C и 37 °C. Показано, что все штаммы *M. morganii* способны прикрепляться к поверхности пластиковых чашек Петри независимо от температуры культивирования, хотя наибольшую адгезивность проявил штамм MM 190, что может быть связано с его способностью к самоагрегации (рисунок 2).

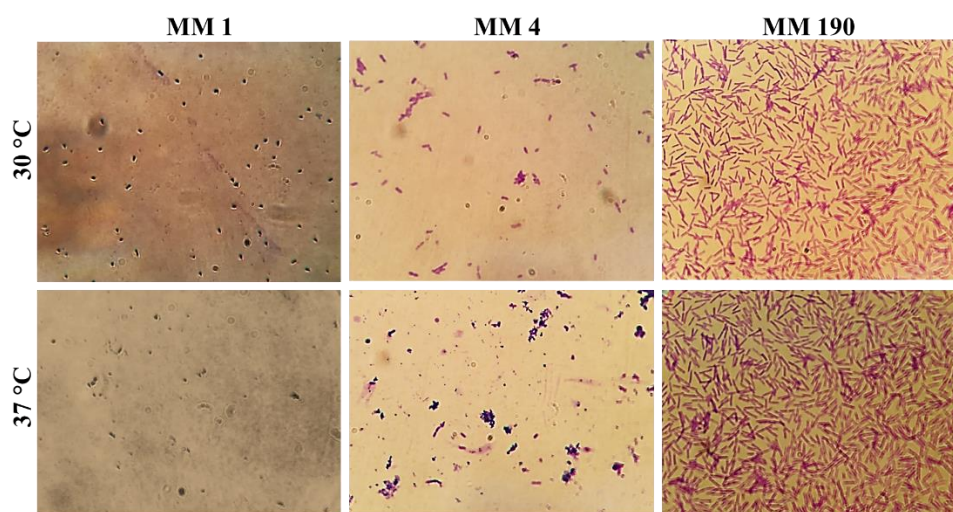


Рисунок 2. Адгезия клинических изолятов *M. morganii* к поверхности пластиковых чашек Петри за 2 ч инкубирования при температурах 30 °C и 37 °C. Окраска генциановым фиолетовым, увеличение 100×.

Известно, что способность бактерий к самоагрегации чаще всего обусловлена гомотипическими взаимодействиями белков внешней мембраны, в частности, фимбриальных адгезинов [Trunk *et al.*, 2018]. Существует простой метод выявления фимбрий на поверхности бактерий, основанный на агглютинации клеток дрожжей [Eshdat *et al.*, 1981]. Изучали способность 8, 10, 16 и 24-часовых культур *M. morganii*, выращенных при температурах 30 °C и 37 °C, к агглютинации 2% суспензии дрожжей. Тип фимбрий определяли по характеру агглютинации в присутствии 1% маннозы. Наибольшую способность к агглютинации манноза-резистентного типа проявил штамм MM 190, что может свидетельствовать о наличии у него MR-фимбрий. Штамм MM 1 обладает умеренной способностью к агглютинации манноза-чувствительного типа, что характерно для бактерий, экспрессирующих фимбрии I типа [Alcántar-Curiel *et al.*, 2013]. В отличие от них, *M. morganii* MM 4 обладает очень слабой способностью к MR-агглютинации дрожжевых клеток, что может быть связано с низкой экспрессией фимбрий соответствующего типа. Известно, что MS-фимбрии позволяют уропатогенам колонизировать эпителий мочевого пузыря, в то время как MR-фимбрии способствуют адгезии к эпителию почек [Kalita *et al.*, 2014; Lüthje, Brauner, 2014]. Существенного влияния температуры на способность к агглютинации выявлено не было, однако установлено, что она зависит от фазы роста

культуры. Так, наименьшая агглютинирующая активность штаммов наблюдалась на 8 ч роста и достигала максимума на 10 ч, после чего выходила на плато.

Исследовали способность штаммов *M. morganii* адгезировать к поверхности клеток карциномы мочевого пузыря T24 методом СЭМ. Показано, что уже через 1 ч инкубирования все штаммы прикреплялись к поверхности эукариотических клеток, при этом наибольшую адгезивность проявил штамм ММ 190 (рисунок 3А). Кроме того, бактерии оказались способными взаимодействовать с выростами на поверхности клеток уротелия, что является необходимым для инвазии возбудителей [Цаплина, 2013; Rottner *et al.*, 2005]. Взаимодействие подобных выростов со штаммом ММ 190 наблюдается уже через 30 мин инкубирования, в то время как штамм ММ 1 контактирует с ними лишь на второй час (рисунок 3Б). Таким образом, штаммы *M. morganii* различаются по адгезивным свойствам, что может быть обусловлено наличием фимбрий на поверхности их клеток.

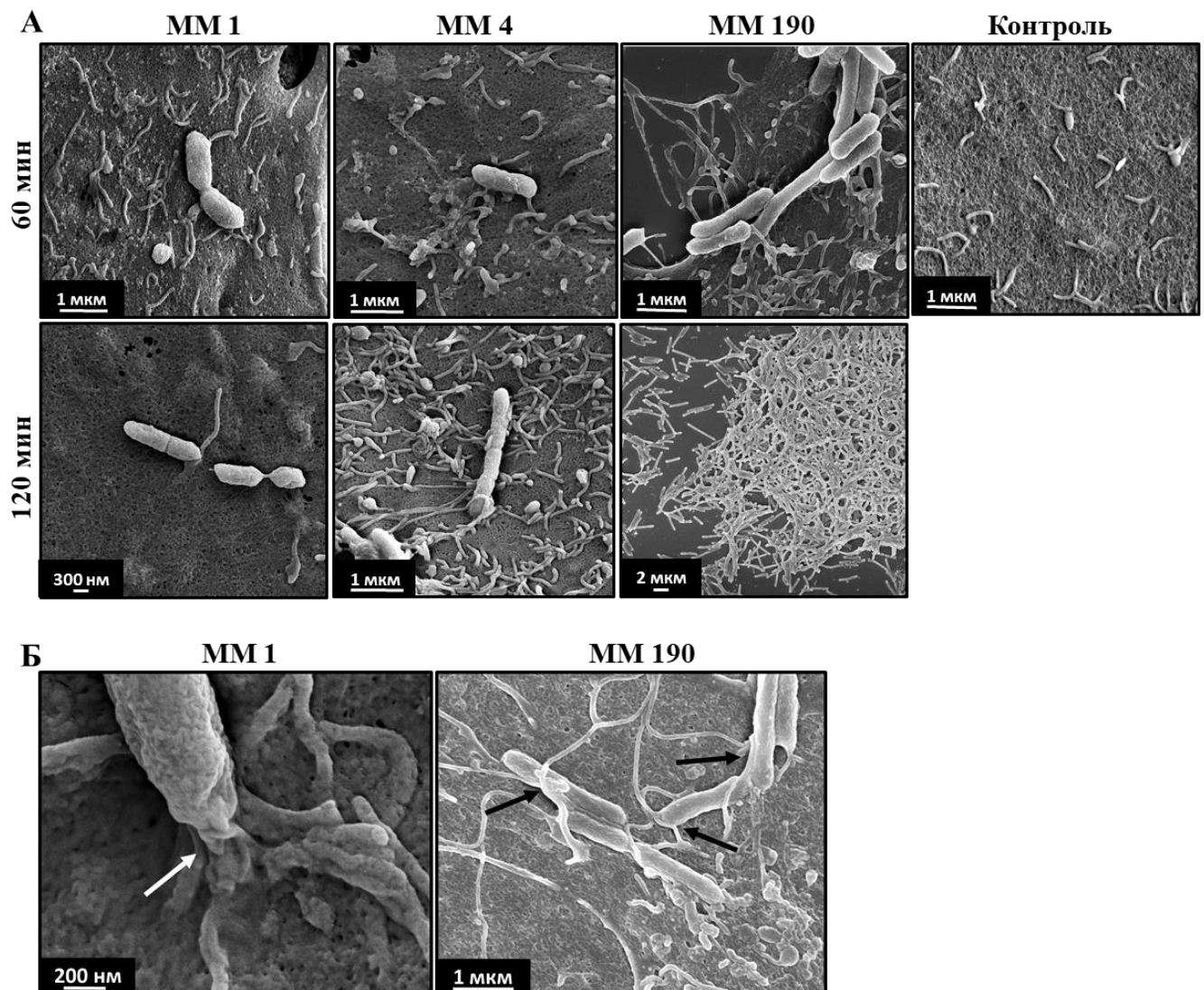


Рисунок 3. Взаимодействие штаммов *M. morganii* с клетками карциномы мочевого пузыря T24. А – адгезия штаммов *M. morganii* ММ 1, ММ 4 и ММ 190 к поверхности клеток T24 (увеличение 15000× и 2000×). Контроль – поверхность клетки в отсутствие бактерий. Б – взаимодействие выростов на поверхности клеток T24 со штаммами *M. morganii* ММ 1 (120 мин инкубирования, увеличение 50000×) и ММ 190 (30 мин инкубирования, увеличение 15000×).

В геномах исследованных штаммов *fim*-кластер, кодирующий фимбрии I типа, обнаружен только у *M. morganii* MM 1, а его структура несколько отличается от кластера уропатогенной *E. coli* CFT073 (идентичность 65.4%), но схожа с *P. mirabilis* HI4320 (рисунок 4А). Так, отсутствие генов рекомбиназ *FimB* и *FimE* может говорить о невозможности фазовой вариации [McCusker *et al.*, 2008], а отсутствие гена *fimG* – привести к формированию длинных фимбрий [Russell, Orndorff, 1992]. Установлено, что штаммы *M. morganii* содержат гены, ответственные за экспрессию *sfm*-фимбрий (*Salmonella*-like fimbriae), которые являются производными фимбрий I типа, но не способны взаимодействовать с маннозой [Kisiela *et al.*, 2013]. Показано, что ген *sfmD* штаммов MM 4 и MM 190 на 64% идентичен гену *fimD* *M. morganii* MM 1. Кроме того, во всех штаммах обнаружен полноразмерный *mrp*-кластер, ответственный за экспрессию MR/P-фимбрий [Li *et al.*, 2002], который отличается от локуса *P. mirabilis* HI4320 наличием дополнительного гена рекомбиназы с неизвестной функцией (рисунок 4Б).

Таким образом, показано, что штаммы *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 в разной степени способны к адгезии, которая не зависит от температуры окружающей среды. Наибольшей способностью к адгезии как к абиотическим, так к биотическим субстратам характеризуется штамм MM 190, что может быть связано с наличием большого количества MR/P-фимбрий на поверхности его клеток. Штаммы MM 1 и MM 4 проявляют слабую адгезивность, которая у *M. morganii* MM 1 связана с маннозачувствительными фимбриями. Поскольку идентичность *mrp*-локусов между штаммами составляет 99-100%, причина слабой MR-агглютинации у штамма MM 4 может заключаться в низком уровне экспрессии данного локуса.

4 Плавающая подвижность *Morganella morganii*

Экспрессия жгутиков позволяет уропатогенным бактериям распространяться из мочевого пузыря в верхние отделы мочевыводящих путей и колонизировать их [Yazdi, Ardekani, 2012]. Известно, что подвижность многих бактерий зависит от температуры среды. К примеру, увеличение температуры приводит к подавлению подвижности у *Listeria monocytogenes* и *Yersinia enterocolitica* и увеличению подвижности у *E. coli* [Lam *et al.*, 2014; Kapatral, Minnich, 1995].

Исследовали влияние температуры культивирования на плавающую подвижность штаммов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 на среде LBA, содержащей 0.33% агара. Установлено, что увеличение температуры культивирования приводит к подавлению подвижности *M. morganii*. Так, при 30 °C все штаммы характеризуются примерно одинаковой скоростью миграции – 50 ± 2.5 , 48 ± 2.4 и 45 ± 2.2 мм в диаметре для *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 соответственно на 7 ч роста. Тем временем, при температуре 37 °C скорость миграции штаммов *M. morganii* MM 4 и MM 190 уменьшается в 3-4 раза и остается постоянной только для штамма *M. morganii* MM 1 (рисунок 5).

Изучали влияние температуры на формирование жгутиков у штаммов *M. morganii* методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Как видно из рисунка 6, при температуре культивирования 30 °C на поверхности клеток *M. morganii* MM 4 и MM 190 имеются жгутики, которые исчезают при 37 °C. В отличие от них,

увеличение температуры культивирования приводило лишь к уменьшению количества жгутиков на поверхности клеток *M. morganii* MM 1. Таким образом, подвижность *M. morganii* коррелирует с наличием жгутиков.

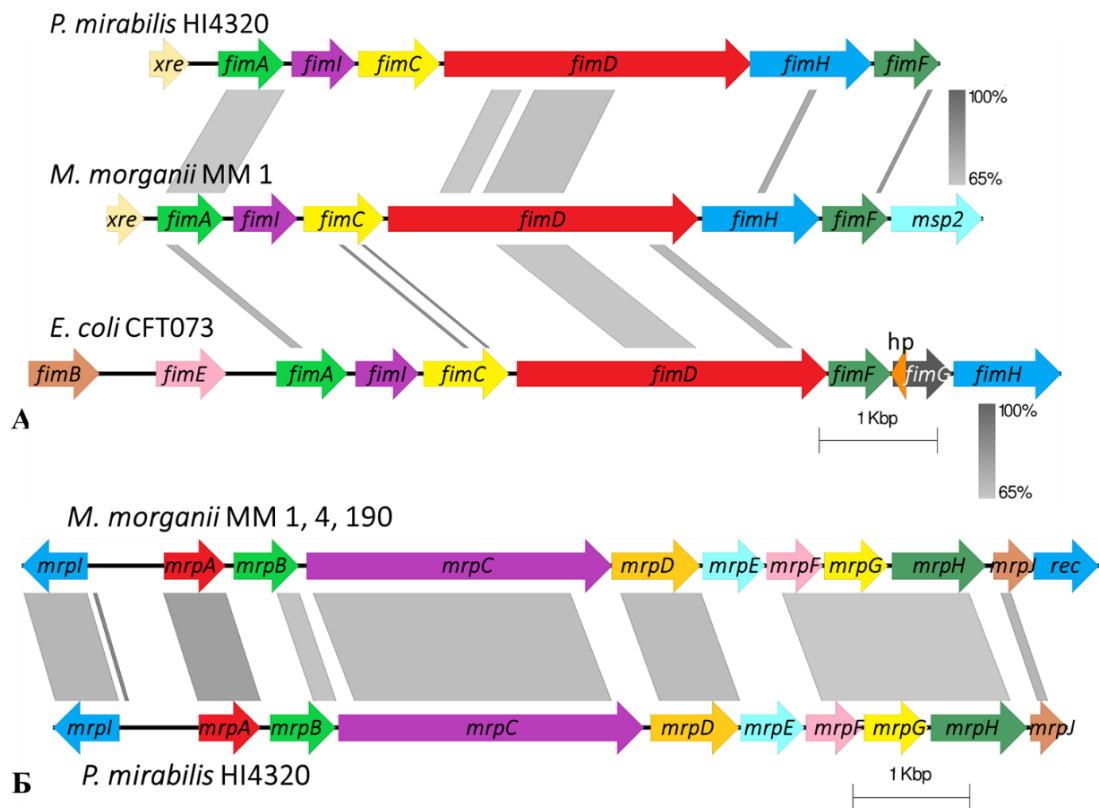


Рисунок 4. Структура локусов фимбриальных оперонов уropатогенных штаммов *M. morganii*, *P. mirabilis* HI4320 и *E. coli* CFT073: А – *fim*-локусы, кодирующие фимбрии I типа. Б – *mrp*-локусы, кодирующего MR/P-фимбрии. *fimB*, *fimE*, *mrpI*, *rec* – рекомбиназы, *fimA*, *mrpA* – основной белок фимбрий, *fimI*, *fimF*, *fimG*, *mrpB*, *mrpE*, *mrpF*, *mrpG* – субъединицы фимбрий, *fimC*, *mrpD* – белок-шаперон, *fimD*, *mrpC* – белок внешней мембраны, *fimH*, *mrpH* – адгезин, *xre*, *mrpJ* – регулятор транскрипции, *mcp2* – белок внешней мембраны, *hp* – гипотетический белок.

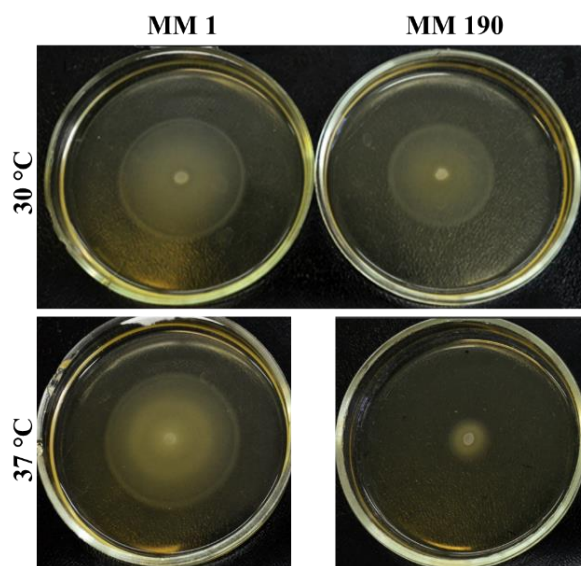


Рисунок 5. Диаметр колоний штаммов *M. morganii* MM 1 и MM 190 на 7 ч роста на среде LBA, содержащей 0.33% агара, при разных температурах культивирования.

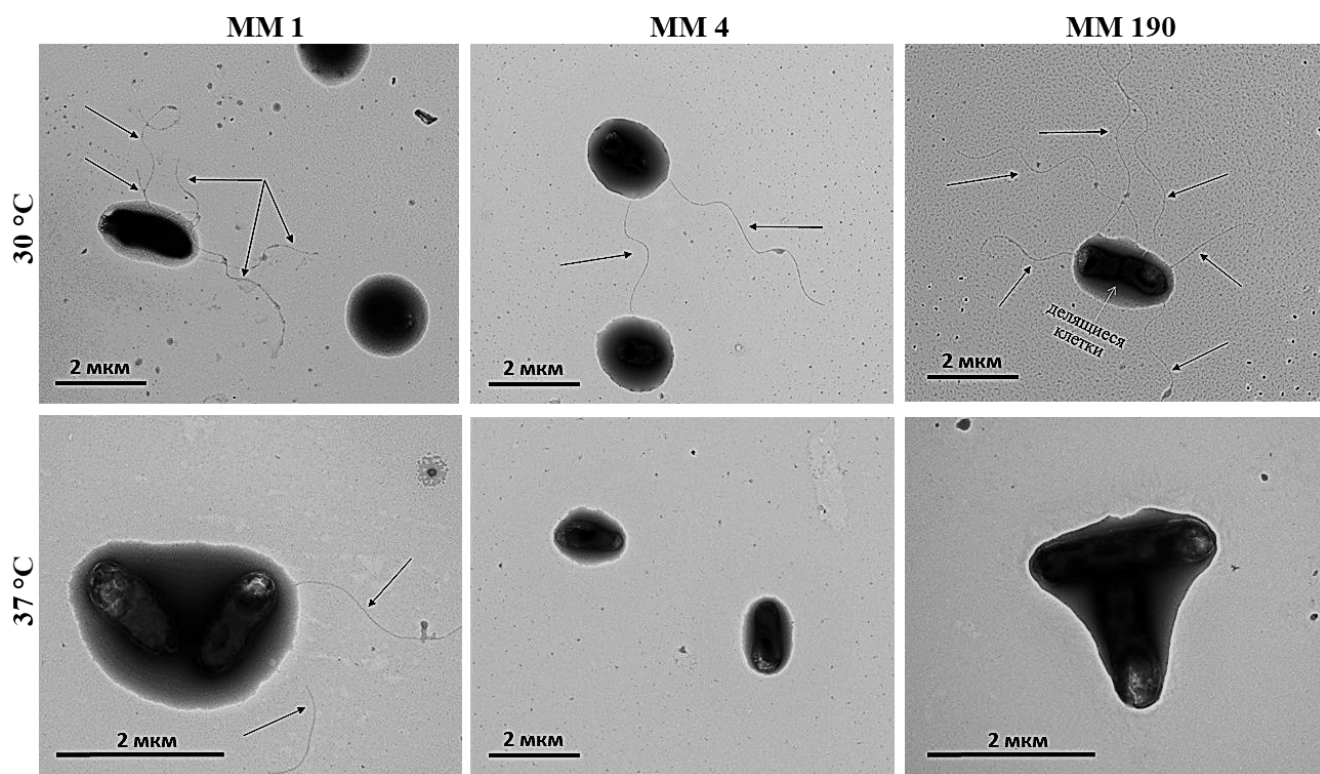


Рисунок 6. Трансмиссионная электронная микрофотография планктонных бактерий *M. morganii*, выращенных при разных температурах. Увеличение 5000× и 10000×, стрелками показаны жгутики.

В секвенированных геномах штаммов *M. morganii* обнаружено более 60 генов, ответственных за подвижность и хемотаксис. Основные компоненты флагеллярного регулона включают 49 генов, собранных в 14 оперонов: «ранние» гены – *flhDC*, «средние» гены – *flhBA*, *flgAMN*, *flgBCDEFGHIJ*, *fliLMNOPQR*, *fliFGHIJK*, *fliE*, *fliDST*, *fliAZ* и «поздние» гены – *flgMN*, *flgKL*, *fliDST*, *fliC1*, *fliC2*, *motAB-cheAW*, *tar-tap-cheRBYZ*. Обнаружена дупликация локуса *fliC*, кодирующего белок флагеллин, что говорит о возможности фазовой вариации [Ratiner, 1999]. Степень идентичности генов *fliC1* и *fliC2* у всех штаммов составляет 77-78%.

Изменение способности к подвижности бактерий в ответ на изменение температурных условий среды может быть связано с регуляцией экспрессии локуса *flhDC*, кодирующего транскрипционный активатор флагеллярного регулона [Chilcott, Hughes, 2000]. Степень идентичности генов *flhDC*, *hns* (ДНК-связывающий транскрипционный регулятор), *crp* (белок-активатор катаболических оперонов), *hdfR* (ингибитор экспрессии *flhDC*), *fliA* (альтернативный σ^{28} -фактор РНК-полимеразы), *flgM* (анти- σ^{28} -фактор), *fliZ* (регуляторный белок), прямо или косвенно задействованных в термочувствительной регуляции синтеза жгутиков [Soutourina *et al.*, 1999; Ko, Park, 2000; Rudenko *et al.*, 2019], у штаммов *M. morganii* MM 1 и MM 190 составила 98-100%. Однако у штамма MM 1, в отличие от штаммов MM 4 и MM 190, после гена *fliE* обнаружена вставка размером в 17.7 кб, в котором идентифицируется остров патогенности, включающий опероны *fliDST* и *fliC1* (рисунок 7). Помимо этого, между штаммами обнаружены различия по гену *fliC2*: идентичность гена *M. morganii* MM 1 (1089 н. п.) с последовательностями штаммов MM 4 и MM 190 (1071 н. п.) составляет 91%, а в его регуляторной области имеются

5 нуклеотидных замен. У некоторых штаммов *E. coli* описана фазовая вариация жгутиковых антигенов в зависимости от температуры культивирования, когда второй вариант флагеллина экспрессируется как при высокой, так и при низкой температуре [Ratiner, 1999]. Следовательно, различия в подвижности штаммов *M. morganii* при высокой температуре могут быть связаны с наличием вставки в флагеллярном регулоне у штамма ММ 1 и с особенностями экспрессии гена *fliC2*.

Таким образом, все штаммы *M. morganii* способны к подвижности, а наиболее подвижным является штамм ММ 1. У *M. morganii* ММ 4 и ММ 190 наблюдается уменьшение подвижности с увеличением температуры культивирования, что не характерно для *M. morganii* ММ 1. При этом подвижность штаммов коррелирует с наличием жгутиков на их поверхности. У штаммов *M. morganii* обнаружены различия в структуре локуса *fliE-fliDST*, что может объяснять различия в термочувствительной регуляции подвижности.

5 Определение цитотоксических свойств *Morganella morganii*

Многие уropатогенные бактерии, такие как *E. coli* и *P. mirabilis*, обладают цитотоксичностью в отношении клеток эпителия мочевыводящих путей, что способствует распространению возбудителя из очага инфекции [Armbruster *et al.*, 2018; Asadi Karam *et al.*, 2019].

Исследовали влияние штаммов *M. morganii* на жизнеспособность клеток карциномы мочевого пузыря Т24 методом окраски витальным красителем трипановым синим, который способен накапливаться в мертвых клетках. Установлено, что штамм ММ 190 обладает высокой цитотоксичностью, приводя к откреплению и гибели 100% клеток Т24 в поле зрения микроскопа через 2 ч инфицирования (рисунок 8). Тем временем, штамм ММ 4 способствует откреплению большинства и гибели небольшого количества клеток (примерно 10%), что говорит об его умеренной цитотоксичности. При культивировании клеток Т24 со штаммом ММ 1 было обнаружено лишь округление клеток и незначительное количество мертвых, сопоставимое с контрольным вариантом.

Таким образом, штаммы *M. morganii* ММ 190, ММ 4 и ММ 1 проявляют высокую, умеренную и низкую цитотоксичность соответственно в отношении культуры клеток карциномы мочевого пузыря Т24 на ранних часах роста, что может быть связано с синтезом токсинов либо гидролитических ферментов.

6 Характеристика протеолитических свойств *Morganella morganii*

6.1 Определение протеолитической активности штаммов *M. morganii*

Бактериальные металлопротеиназы вносят существенный вклад в вирулентность болезнетворных микроорганизмов. Так, металлопротеиназа Zpx бактерий рода *Cronobacter* активирует матриксную металлопротеиназу MMP-9, обладает цитотоксичностью в отношении культивируемых клеток эукариот и вызывает их округление [Eshwar *et al.*, 2018; Tapader *et al.*, 2019], а термолизин протеиназы протеализин *S. proteamaculans* и гримелизин *S. grimesii* способствуют инвазии бактерий в клетки эукариот [Bozhokina *et al.*, 2011; Chukhontseva *et al.*,

2019]. В связи с этим представляет интерес определение роли протеиназ бактерий *M. morganii* в патогенезе вызванных ими инфекций.

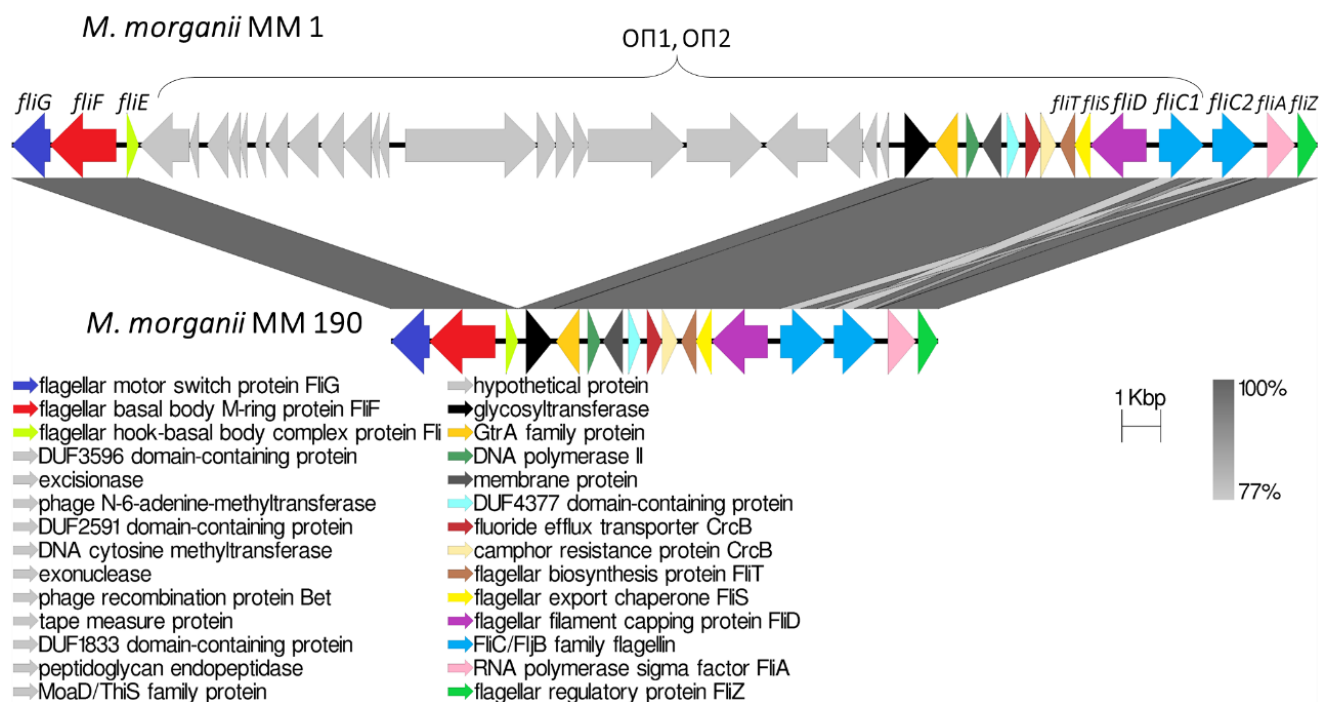


Рисунок 7. Сравнительный анализ геномного локуса, несущего опероны *fliE-fliAZ* у штаммов *M. morganii* MM 1 и MM 190. ОП1, ОП2 – острова патогенности, *fliG* – белок ротора, *fliF* – белковая субъединица М-кольца базального тела, *fliE* – белок комплекса крюк-базальное тело, *fliT* – белок биосинтеза жгутиков, *fliS* – экспортный шаперон, *fliD* – кэп-белок, покрывающий кончик филамента, *fliC* – флагеллин, *fliA* – альтернативный σ^{28} -фактор РНК-полимеразы, *fliZ* – регуляторный белок.

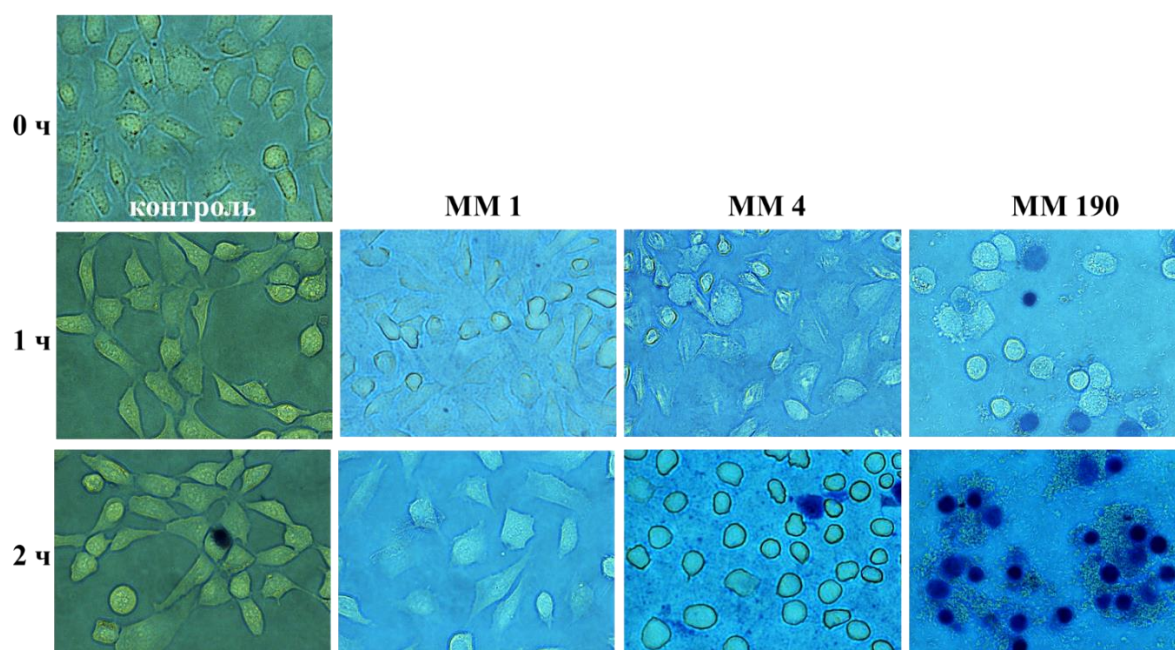


Рисунок 8. Влияние клинических изолятов *M. morganii* на монослой клеток карциномы мочевого пузыря T24 при наблюдении через инвертированный микроскоп (увеличении 63 $\times$, окраска трипановым синим). Контроль – культура клеток T24 без бактерий, 0-1-2 ч – время инкубирования.

Исследовали внеклеточную и внутриклеточную протеолитическую активность штаммов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 в отношении азоказеина и скелетно-мышечного актина. Было установлено, что бактерии не способны расщеплять азоказеин, однако их клеточные экстракты проявляют слабую активность в отношении актина. Внутриклеточная активность в отношении актина появлялась на 24 ч роста бактерий и достигала максимума на 72 ч (рисунок 9). При этом актин расщеплялся с образованием фрагментов массой менее 36 кДа. Так, гримелизин *S. grimesii* расщепляет актин на фрагменты массой 36 и 8 кДа [Bozhokina *et al.*, 2011]. Видимых различий по актинолитической активности между штаммами *M. morganii* обнаружено не было.

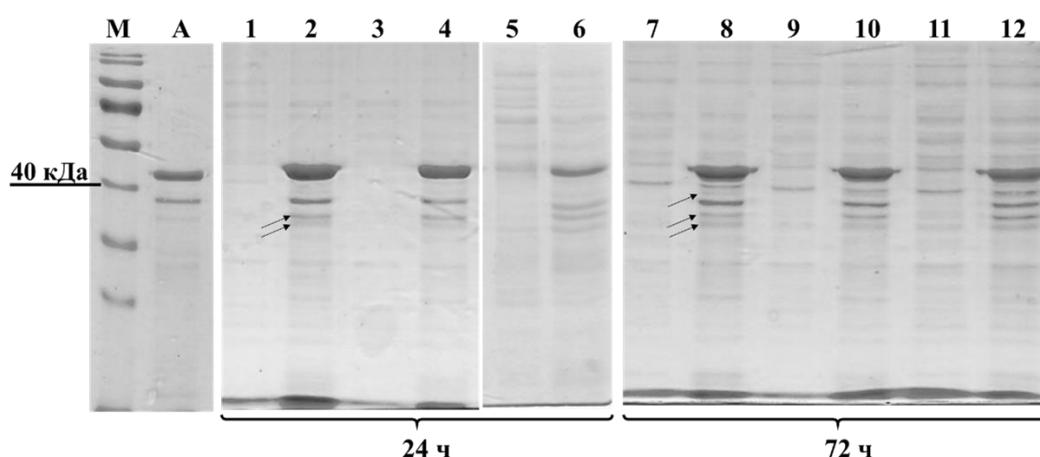


Рисунок 9. Протеолитическая активность клеточных экстрактов 24 и 72-часовых культур *M. morganii* в отношении актина. М – белковые маркеры, А – актин, нечетные цифры – клеточные экстракты, четные цифры – клеточные экстракты с актином, 1-2, 7-8 – штамм MM 1, 3-4, 9-10 – штамм MM 4, 5-6, 11-12 – штамм MM 190. Стрелкой показаны продукты протеолиза.

6.2 Идентификация гена термолизиновой металлопротеиназы и определение его экспрессии у штаммов *M. morganii*

В геномах штаммов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 методом ПЦР-амплификации был идентифицирован ген гипотетической металлопротеиназы *prt1* размером в 1101 н. п. (рисунок 10А), продукт которого относится к семейству M4 и имеет теоретическую молекулярную массу 42 кДа. Гены штаммов MM 1, MM 4 и MM 190 обладают 95%, 99% и 99% гомологией с референсным геном *M. morganii* КТ соответственно, предполагаемый продукт которого на 37% идентичен аминокислотной последовательности гримелизина и протеализина.

Определяли экспрессию гена металлопротеиназы *M. morganii* методом обратной транскрипции (ОТ), основанном на получении специфичной кДНК с РНК-матрицы [Rio, 2014]. Из культур *M. morganii* на разных стадиях роста (6, 24, 36 и 48 ч) выделяли тотальную РНК для проведения реакции ОТ. Было обнаружено, что ген гипотетической металлопротеиназы *M. morganii* не является псевдогеном, а его экспрессия начинается на 24 ч роста и достигает максимальных значений на 48 ч (рисунок 10Б), что коррелирует с внутриклеточной протеолитической активностью бактерий. Различий между штаммами *M. morganii* по степени экспрессии гена не обнаружено. Известно, что внутриклеточная активность *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в отношении актина появляется только на поздней стационарной фазе

роста, в частности, активность протеализина наблюдается с 49 ч [Bozhokina *et al.*, 2008; Цаплина, 2011]. Таким образом, можно предполагать, что внутриклеточная актинолитическая активность *M. morganii* связана с экспрессией гена термолизиновой протеиназы на стационарной фазе роста. Следовательно, данные факторы не вносят свой вклад в цитотоксичность бактерий в отношении культивируемых клеток эукариот на первых часах инкубирования, хотя, возможно, играют определенную роль в других процессах, ассоциированных с вирулентностью.

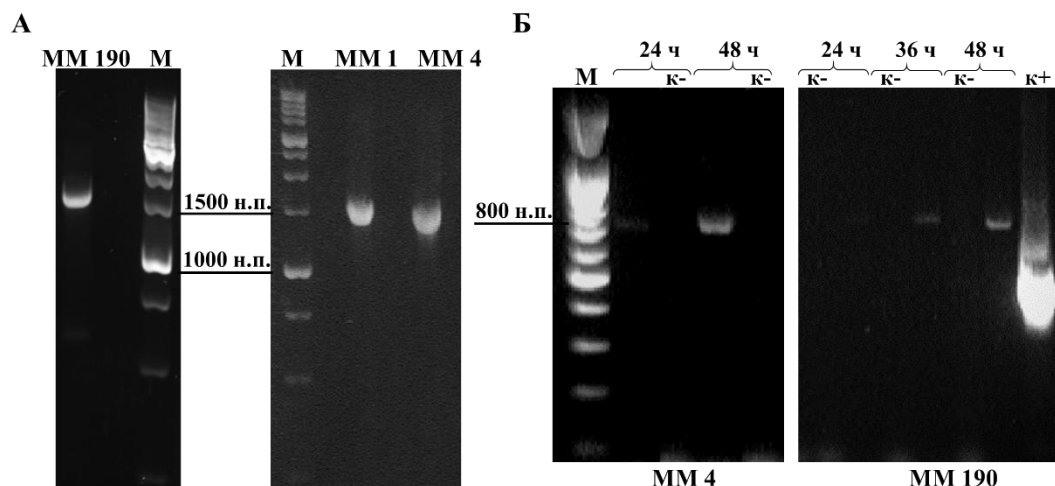


Рисунок 10. Идентификация гена термолизиновой металлопротеиназы штаммов *M. morganii* и определение его экспрессии. А – электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации гена металлопротеиназы *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190. М – ДНК-маркеры М11. Б – электрофореграмма ОТ-ПЦР-продуктов с тотальной РНК 24, 36 и 48-часовых культур *M. morganii* для определения экспрессии гена металлопротеиназы. М – ДНК-маркеры М23, k^- – тест на контаминацию геномной ДНК, k^+ – тест на активность обратной транскриптазы.

6.3 Клонирование гена металлопротеиназы *M. morganii*

С целью изучения физико-химических свойств нового фермента и его вклада в вирулентный потенциал бактерий ген металлопротеиназы *M. morganii* был клонирован в экспрессионный вектор pBAD/Мус-His С под контроль арабинозного промотора в клетках *E. coli* DH5 α (рисунок 11А). Для клонирования были выбраны гены штаммов *M. morganii* MM 4 и ZM.

Секвенирование плазмидной ДНК, выделенной из положительных на вставку гена клонов трансформантов, подтвердило, что рекомбинантные клетки *E. coli* DH5 α несут ген металлопротеиназы *M. morganii* MM 4 и ZM. После индукции экспрессии гена 0.02%-й L-арабинозой на вестерн-блоте клеточных экстрактов трансформантов обнаруживается белковый продукт массой ≈ 35 кДа, взаимодействующий с антителами к His-tag-последовательности, а также несколько менее выраженных бэндов меньшего размера (рисунок 11Б). Внутриклеточная протеолитическая активность в отношении актина в клетках *E. coli* DH5 α , экспрессирующих ген металлопротеиназы *M. morganii*, не выявлялась. Известно, что предшественники гримелизина и протеализина содержат короткий пропептид, который отщепляется в ходе посттрансляционной активации белка [Demidyuk *et al.*, 2015]. Различие между теоретической молекулярной массой металлопротеиназы *M. morganii* (42 кДа) и размером зрелого рекомбинантного

белка (35 кДа) может быть обусловлено отщеплением пропептида, что характерно для внутриклеточных металлопротеиназ.

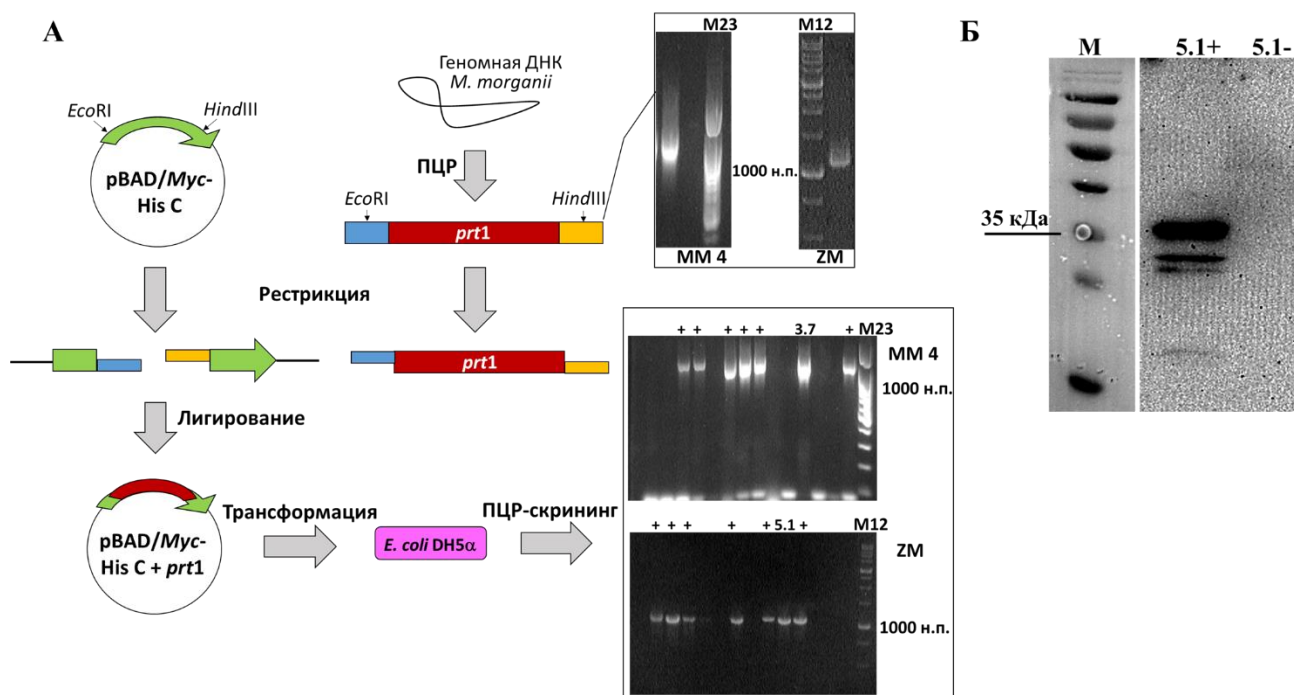


Рисунок 11. Клонирование и экспрессия генов металлопротеиназ *M. morganii* MM 4 и ZM в клетках *E. coli* DH5α. А – схема клонирования в экспрессионный вектор pBAD/Myc-His C. M12, M23 – ДНК-маркеры, + – позитивные на вставку гена колонии, 3.7, 5.1 – трансформанты, несущие гены штаммов MM 4 и ZM. Б – вестерн-блот клеточного экстракта трансформантов *E. coli* DH5α. М – белковые маркеры, 5.1+ – клеточный экстракт трансформанта с индукцией гена, 5.1- – клеточный экстракт трансформанта без индукции гена.

Таким образом, обнаруженные на вестерн-блоте белковые продукты можно идентифицировать как продукты экспрессии гена гипотетической металлопротеиназы *M. morganii*. Наличие полос с меньшей молекулярной массой, возможно, является результатом частичного протеолиза рекомбинантного фермента. Отсутствие актинолитической активности может свидетельствовать об образовании телец включения, формирующихся из агрегированных молекул металлопротеиназы. Подобные проблемы описаны многими исследователями при клонировании генов различных протеиназ, поскольку они представляют одну из самых трудных для гетерологической экспрессии и последующей очистки групп белков [Kwon *et al.*, 2011a].

7 Характеристика гемолитических свойств *Morganella morganii*

7.1 Определение способности к гемолизу штаммов *M. morganii*

Гемолизины проявляют цитотоксичность относительно широкого круга клеток различных организмов [Ostolaza *et al.*, 2019]. Так, Lin с соавторами показали, что штаммы *Vibrio cholerae*, секретирующие RTX-токсин, приводят к деструкции монослоя клеток карциномы гортани HEP-2 уже на 1 ч совместного культивирования [Lin *et al.*, 1999]. 30-56% UPEC синтезируют α-гемолизин [Hilbert *et al.*, 2012], который способен подавлять возникновение воспалительных реакций в мочевыводящих путях [Welch, 2016] и вызывать гибель клеток уротелия [Lu *et al.*, 2018].

Известно, что более 50% клинических изолятов *M. morganii* обладают гемолитической активностью [Kim *et al.*, 2007], которая коррелирует с экспрессией гомолога α -гемолизина [Eberspächer *et al.*, 1990]. Анализ роста бактерий на кровяном агаре (КА) показал, что штаммы ММ 4 и ММ 190 способны к β -гемолизу, поскольку приводят к полному обесцвечиванию среды вокруг колоний (рисунок 12А). При этом наибольшую активность проявляет штамм ММ 190, в то время как *M. morganii* ММ 1 проявляет способность только к α -гемолизу. Инкубация при низких температурах приводит к увеличению зоны гемолиза. Это свидетельствует о том, что некоторые гемолизины, вносящие свой вклад в лизис эритроцитов бактериями *M. morganii*, являются холодовыми токсинами [Okazaki *et al.*, 2003].

Синтез многих токсинов увеличивается с увеличением температуры среды [Lam *et al.*, 2014]. Показано, что гемолитическая активность штаммов *M. morganii* на КА выше при температуре культивирования 37 °С, чем при 30 °С, при этом зона гемолиза при 37 °С состоит из двух подзон – полупрозрачной вокруг колоний и прозрачной на периферии (рисунок 12Б). Поскольку известно, что экспрессия гена α -гемолизина находится под контролем термочувствительного репрессора H-NS [Lam *et al.*, 2014], который диссоциирует при увеличении температуры [Nieto *et al.*, 2000], можно предположить, что штаммы *M. morganii* секретируют комплекс гемолизинов, часть из которых, включая гомолог α -гемолизина, начинают синтезироваться при повышении температуры.

7.2 Гемолитическая активность в культуральной жидкости *M. morganii*

Для количественной оценки уровня гемолитической активности определяли степень высвобождения гемоглобина в среду после инкубирования 2% суспензии эритроцитов с культуральной жидкостью (КЖ) штаммов *M. morganii*, выращенных на среде LB при температуре 37 °С. Было показано, что для всех штаммов максимум гемолитической активности приходится на 2 ч роста, после чего резко снижается, что согласуется с данными литературы об экспрессии гена α -гемолизина [Senior, Hughes, 1988]. Исследуемые штаммы значительно различаются по уровню гемолитической активности: степень гемолиза на 2 ч роста составила $58.7 \pm 5.7\%$, $29.8 \pm 3.8\%$ и $3.2 \pm 2.1\%$ для штаммов ММ 190, ММ 4 и ММ 1 соответственно от уровня лизиса эритроцитов в деионизированной воде (рисунок 13А).

Изучали влияние состава питательной среды и температуры культивирования на гемолитическую активность в КЖ штаммов *M. morganii*. Бактерии растили на средах LB и натуральная моча при температурах 30 °С и 37 °С. Показано, что увеличение температуры культивирования приводит к увеличению гемолитической активности независимо от среды культивирования. Так, штамм ММ 190, выращенный на среде LB при 37 °С, разрушает эритроциты в 1.5 раза эффективнее ($43 \pm 3.4\%$), чем при 30 °С ($28.9 \pm 2.3\%$). При росте на натуральной моче гемолитическую активность проявил лишь штамм ММ 190: при 37 °С степень гемолиза составила $17.4 \pm 1.4\%$, что в 2 раза выше, чем при температуре 30 °С ($8.1 \pm 0.6\%$) (рисунок 13Б). Общая внеклеточная гемолитическая активность была 2.5 раза выше в случае роста бактерий на LB по сравнению с мочой. Однако, если учесть, что оптическая плотность культуры бактерий на моче была в несколько раз ниже, чем

при росте на среде LB, продуктивность бактерий по гемолизинам была выше на моче. Таким образом, гемолитическая активность штаммов *M. morganii* коррелирует с их цитотоксическим эффектом в отношении клеток уротелия, что может свидетельствовать о важной роли гемолизинов *M. morganii* в становлении ИМП.

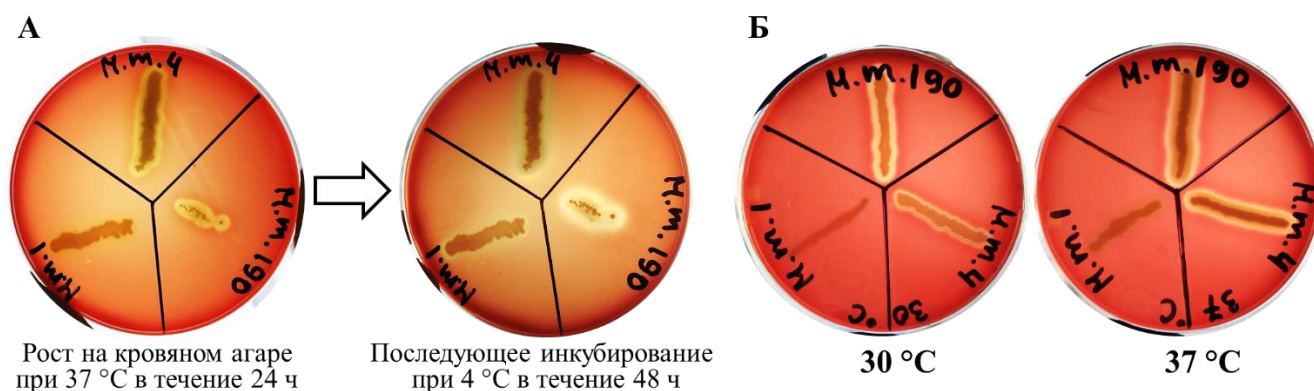


Рисунок 12. Определение гемолитических свойств штаммов *M. morganii* на кровяном агаре, содержащем 5% эритроцитов человека. А – выявление способности штаммов к синтезу холодowych токсинов, Б – влияние температуры культивирования на гемолитическую активность штаммов *M. morganii*. М.м. – *M. morganii*.

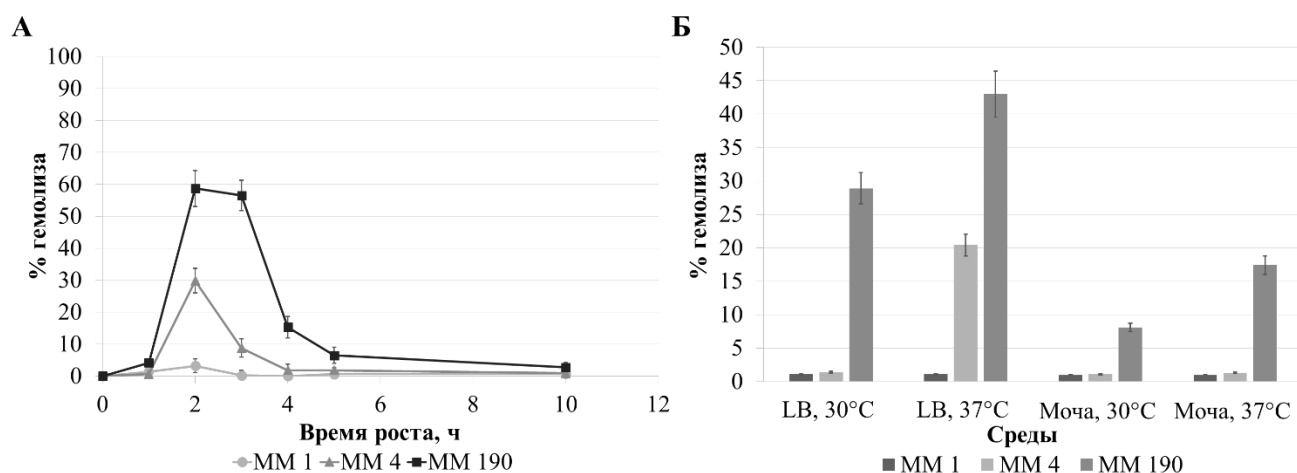


Рисунок 13. Гемолитическая активность в культуральной жидкости штаммов *M. morganii* относительно 2% суспензии эритроцитов человека. А – гемолитическая активность на разных стадиях роста. Б – влияние состава среды и температуры культивирования на гемолитическую активность штаммов *M. morganii* на 2 ч роста. % гемолиза рассчитан относительно уровня лизиса эритроцитов в деионизированной воде, который принимали за 100%.

7.3 Идентификация генов гемолизинов в геномах штаммов *M. morganii* и анализ их геномных локусов

Для определения токсина, вносящего наибольший вклад в цитотоксичность, провели идентификацию генов гемолизинов в геномах штаммов MM 1, MM 4 и MM 190. У всех штаммов *M. morganii* методом ПЦР-амплификации были идентифицированы гены гипотетических гемолизинов *osmY* (573 н. п.), *yidD* (258 н. п.), *corC* (1293 н. п.) и ген *hpmA* (4635 н. п.) (рисунок 14). В геномах штаммов MM 4 и MM 190 идентифицирован также ген *hlyA* (3075 н. п.), который не обнаружен у негемолитического штамма MM 1. Последовательности

идентифицированных генов *M. morganii* MM 4 и MM 190 проявили 99-100% гомологию с соответствующими генами *M. morganii* КТ и *M. morganii* FDAARGOS_172, в то время как степень идентичности последовательностей *M. morganii* MM 1 с референсными штаммами варьировала от 97 до 100%.

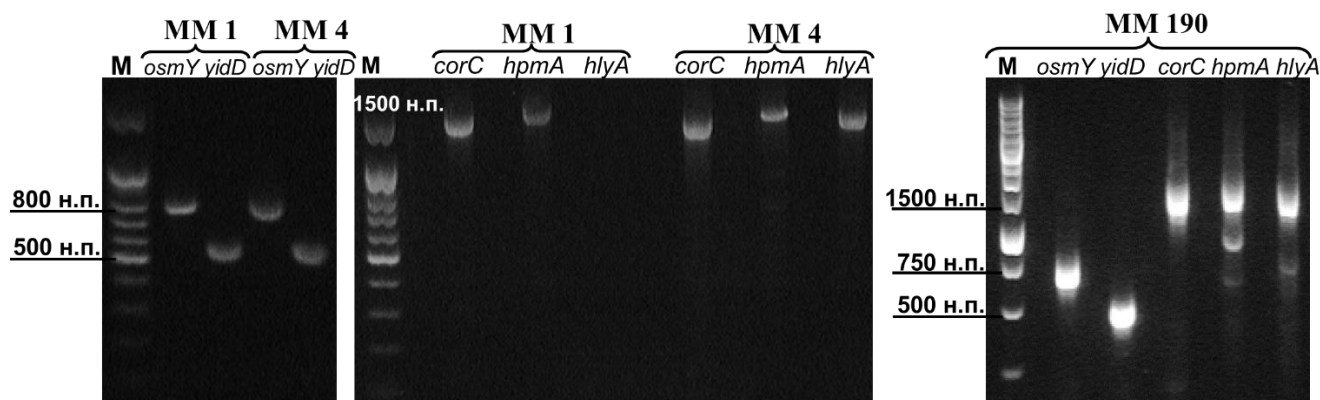


Рисунок 14. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации генов гемолизин с геномной ДНК клинических изолятов *M. morganii*. М – ДНК-маркеры M23 (для MM 1 и MM 4) и M11 (для MM 190), *osmY* – осмотически индуцируемый белок, *yidD* – мембранный белок, *corC* – белок с доменом DUF21, *hpmA* – кальций-независимый гемолизин, *hlyA* – α -гемолизин.

Особого внимания среди упомянутых генов заслуживают *hpmA* и *hlyA*. Гомологи гена *hpmA*, кодирующего кальций-независимый гемолизин *P. mirabilis* [Fraser *et al.*, 2002], были ранее описаны для штаммов *M. morganii* КТ и *M. morganii* F675 [Chen *et al.*, 2012; Olaitan *et al.*, 2014]. Данный ген обнаружен у всех трех штаммов *M. morganii*, и в литературе отсутствует информация о влиянии факторов среды на его экспрессию. Тем временем, экспрессия гена *hlyA*, кодирующего RTX-токсин – гомолог α -гемолизина *E. coli*, происходит на ранних часах роста [Senior, Hughes, 1988; Gołuszko *et al.*, 1988] и зависит от температуры среды [Lam *et al.*, 2014]. Таким образом, можно предполагать, что β -гемолитическая активность *M. morganii* MM 4 и MM 190 и их цитотоксичность связана с экспрессией гена *hlyA*.

Нами показано, что *hlyCABD*-опероны штаммов *M. morganii* MM 4 и MM 190, кодирующие синтез α -гемолизина, полностью идентичны как по последовательности входящих в них генов, так и по регуляторным областям, а также обладают 77% гомологией с последовательностью оперона уропатогенной *E. coli* 536 (CP000247.1) (рисунок 15). Все компоненты данного оперона отсутствуют у *M. morganii* MM 1. Известно, что некоторые штаммы *E. coli*, несущие ген α -гемолизина, не проявляют гемолитические свойства на кровяном агаре, что связано с особенностями экспрессии данного гена [Oloomi, Bouzari, 2008]. Так, уровень экспрессии генов *hlyCABD*-оперона зависит от длины и нуклеотидного состава 5'-нетранслируемой области, богатой АТ-последовательностями (около 64%), что увеличивает стабильность мРНК [Nhu *et al.*, 2019]. Однако между штаммами MM 4 и MM 190 не было обнаружено различий как по длине, так и по нуклеотидному составу промоторного участка *hlyCABD*-оперона. Помимо этого, на уровень гемолитической активности, связанной с α -гемолизином, влияют регуляторные белки H-NS, SpxR, RfaH, ферменты WaaC, WaaF, WaaG, RfaE, необходимые для биосинтеза ЛПС, цитоплазматические шапероны DnaK и DnaJ, а также РНКазы E и

белок-репрессор AcrR компонентов эффлюкс-системы AcrAB [Nhu *et al.*, 2019]. Штаммы проявили 100% идентичность по аминокислотной последовательности всех этих белков, но между ними обнаружены различия по гену *hha*, кодирующему ДНК-связывающий репрессор, который в комплексе с H-NS отвечает за термоосмотическую регуляцию экспрессии гемолизина [Nieto *et al.*, 2000]. Известно, что делеция данного локуса приводит к существенному увеличению синтеза гемолизина у *E. coli* [Nieto *et al.*, 1991]. Нами показано, что у штамма MM 190 имеется аминокислотное замещение остатка Glu34, который соответствует Glu39 для белка Hha *E. coli* и является консервативным [de Alba *et al.*, 2011], на Gly, что может влиять на сродство белка к промоторному участку оперона *hlyCABD* и способствовать увеличению экспрессии гемолизина.

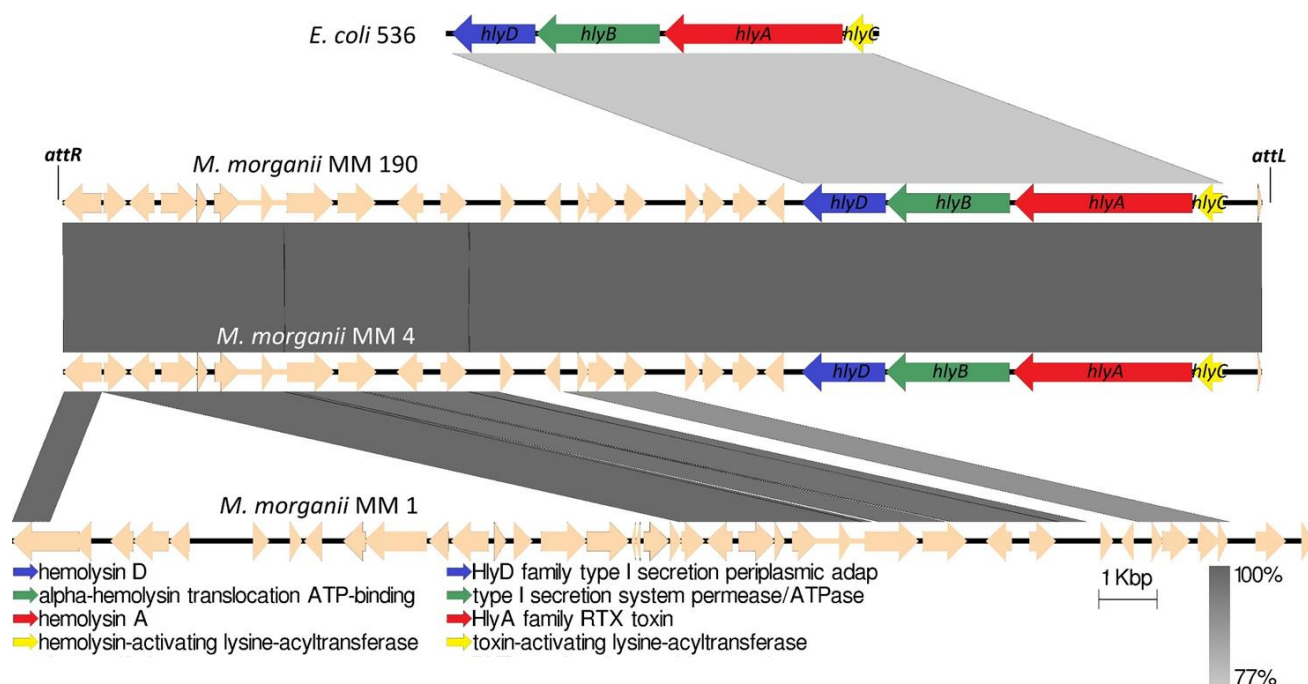


Рисунок 15. Структура геномного локуса, несущего *hlyCABD*-оперон, у уропатогенных штаммов *M. morganii* и *E. coli* 536. *hlyC* – ацетилтрансфераза, активирующая токсин, *hlyA* – RTX-токсин HlyA, *hlyB* – ABC-транспортер T1SS, *hlyD* – белок-порин MFP. *attL* и *attR* – сайты интеграции фага 118970_sal4.

Горизонтальный перенос генов токсинов является важным механизмом эволюции бактерий [Javadi *et al.*, 2017]. Так, шига-токсин, характерный для энтеропатогенных изолятов *E. coli*, кодируется профагом H-19B [Fortier, Sekulovic, 2013]. Нами установлено, что *hlyCABD*-оперон привнесен в геномы *M. morganii* MM 4 и MM 190 с помощью фага 118970_sal4, характерного для рода *Salmonella*. Участок генома, содержащий профаг, у обоих штаммов имеет размер в 20.9 кб с GC-составом 39.3%, в то время как для геномной ДНК бактерий характерен GC-состав 50.9-51.0%. Размер генома свободного фага 118970_sal4 равен 42.4 кб, он широко распространен среди изолятов *Salmonella* Heidelberg. Однако, ни представители рода *Salmonella*, ни сам фаг 118970_sal4 (NC_030919) не содержат в своем геноме последовательностей, гомологичных гену RTX-токсина. Помимо этого, *hlyCABD*-опероны *M. morganii* MM 4 и MM 190 входят в состав острова

патогенности размером в 11.3 кб и GC-составом 36.5%. Известно, что у многих UPEC локус *hlyCABD* обнаруживается в составе PAI-I, PAI-II, PAI-IV или PAI-V. Например, у *E. coli* C5 данный оперон входит в состав PAI-I, интегрированного в геном по соседству с локусом *leuX* [Javadi *et al.*, 2017]. У штамма *E. coli* 536 *hlyCABD*-оперон также находится в составе PAI-I [Hochhut *et al.*, 2006] и имеет GC-состав 40.2%, в то время как GC-контент его геномной ДНК составляет 50.5%. В большинстве случаев нуклеотидный состав PAIs отличается от состава геномной ДНК бактерии, что позволяет установить их происхождение [Schmidt, Hensel, 2004]. В 1987 г. Koronakis с соавт. предположили, что локус *hlyCABD* *E. coli* мог быть получен от представителей рода *Proteus* в ходе горизонтального переноса генов, поскольку GC-состав данного локуса равен 39%, что соответствует GC-составу геномной ДНК *Proteus* spp. [Koronakis *et al.*, 1987]. С этой точки зрения, штаммы *M. morganii* MM 4 и MM 190 также могли получить оперон α -гемолизина от бактерий рода *Proteus*. Таким образом, нами впервые установлено, что *hlyCABD*-оперон мог быть привнесен в геном *M. morganii* с помощью фага.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ геномов трех урологических изолятов *M. morganii* не выявил существенных различий по количеству генов вирулентности, однако обнаружил вариации по количеству и составу профагов и островов патогенности. Совмещение результатов аннотирования геномов с данными, полученными экспериментальным путем, позволило пролить свет на причины полиморфизма штаммов по некоторым признакам. Нами установлено, что способность штаммов *M. morganii* к манноза-чувствительной и манноза-резистентной агглютинации клеток дрожжей коррелирует с наличием генов, ответственных за экспрессию соответствующих типов фимбрий. Показано, что независимость подвижности штамма *M. morganii* MM 1 от температуры культивирования может быть обусловлена наличием вставки в флагеллярном регулоне. Внутриклеточная протеолитическая активность *M. morganii* в отношении актина коррелирует с экспрессией гена термолизиновой металлопротеиназы на стационарной фазе роста, продукт которого способен формировать тельца включения в рекомбинантных клетках *E. coli* DH5 α . Наконец, показано, что цитотоксичность штаммов *M. morganii* в отношении клеток уротелия связана с экспрессией гена-гомолога α -гемолизина.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Урологический изолят *M. morganii* MM 190 отличается от изолятов *M. morganii* MM 1 и MM 4 по морфологии, скорости роста, чувствительности к действию антибиотиков и цитотоксичности. Геномы трех штаммов секвенированы и занесены в базы данных DDBJ/ENA/GenBank. Геномы обладают высокой гомологией, имеют размеры и GC-состав равный 3.82-3.97 Мб и 50.9-51.0% соответственно и различаются по количеству и составу профагов и островов патогенности.

2. Степень адгезии штаммов *M. morganii* к абиотическим поверхностям коррелирует со способностью агглютинировать клетки дрожжей и прикрепляться к клеткам эукариот, и не зависит от температуры культивирования. Наибольшей способностью к адгезии обладает штамм *M. morganii* MM 190, характеризующийся

манноза-резистентной агглютинацией. В геномах штаммов обнаружены гены, ответственные за экспрессию MR/P-фимбрий, у штамма *M. morganii* MM 1 – гены, кодирующие фимбрии I типа.

3. Штаммы *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 способны к плавающей подвижности. Увеличение температуры культивирования приводит к уменьшению количества жгутиков и подавлению подвижности у *M. morganii* MM 4 и MM 190. Изменение температуры не влияет на подвижность *M. morganii* MM 1, у которого гены структурных компонентов жгутиков и их шаперонов расположены в острове патогенности.

4. Клеточные экстракты штаммов *M. morganii* MM 1, MM 4 и MM 190 обладают слабой протеолитической активностью, которая коррелирует с экспрессией гена термолизиновой металлопротеиназы *prt1* (1101 н. п.). Ген металлопротеиназы клонирован в экспрессионный вектор pBAD/Мус-His C в клетках *E. coli* DH5α. Ген экспрессируется в рекомбинантных клетках с образованием белкового продукта массой в 35 кДа, который формирует в цитоплазме тельца включения.

5. Штаммы *M. morganii* MM 4 и MM 190 обладают гемолитической активностью, уровень которой зависит от состава среды и температуры культивирования. Гемолитическая активность коррелирует с цитотоксичностью штаммов в отношении клеток уротелия и экспрессией гена RTX-токсина (3075 н. п.), который отсутствует у штамма *M. morganii* MM 1. *hlyCABD*-оперон, ответственный за синтез токсина, входит в состав профага, обладающего высокой гомологией с фагом 118970_sal4 *Salmonella*.

Публикации по теме диссертации

Статьи (включая публикации в журналах, индексируемых WoS, Scopus и РИНЦ)

1. **Minnullina, L.** Comparative genome analysis of uropathogenic *Morganella morganii* strains / L. Minnullina, D. Pudova, E. Shagimardanova, L. Shigapova, M. Sharipova, A. Mardanova // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2019. – 9:167. doi: 10.3389/fcimb.2019.00167 – (BAK, WoS, Scopus, IF=3.518).
2. **Minnullina, L.** Cloning and expression of a metalloprotease gene from *Morganella morganii* strain ZM / L. Minnullina, M. Sharipova, A. Mardanova // *BioNanoScience*. – 2017. – V. 7, No. 4. – P. 613-615. – (BAK, WoS, Scopus, IF= 0.53).
3. **Minnullina, L. F.** The hemolytic properties of clinical isolates of *Morganella morganii* / L. F. Minnullina, M. H. Al Allak, S. Y. Khaitlina, M. R. Sharipova, A. M. Mardanova // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2016. – V. 7, No. 5. – P. 1550-1556 – (BAK, WoS, IF=0.35).
4. **Zamaliutdinova, N. M.** New metalloendopeptidase of *Morganella morganii* ZM / N. M. Zamaliutdinova, **L. F. Minnullina**, M. R. Sharipova, A. M. Mardanova // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2014. – V. 40, No. 6. – P. 628-633. – (BAK, WoS, Scopus, IF=0.794).
5. **Миңнуллина, Л. Ф.** *Morganella morganii* бактерияләренең гемолитик активлыгы / Л. Ф. Миңнуллина, А. М. Мәрданова // Фәнни Татарстан. – 2017. – № 1. – 149-154 б. – (РИНЦ).
6. **Миңнуллина, Л. Ф.** Оппортунистик инфекцияләр сәбәпчесе *Morganella morganii*: антимикроб матдәләргә чыдамлылыгы һәм биоэпәләр хасил итүе / Л. Ф. Миңнуллина, Э. Р. Шәйдуллина, А. М. Мәрданова // Фәнни Татарстан. – 2017. – № 3. – 124-129 б. – (РИНЦ).
7. **Миңнуллина, Л. Ф.** Ген металлопротеиназы *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, Н. М. Замалютдинова, Е. О. Михайлова, М. Р. Шарипова, А. М. Марданова // *Вестник Казанского технологического университета*. – 2013. – Т. 16, № 23. – С. 143-146.

Тезисы докладов и материалы конференций

1. **Minnullina, L. F.** Comparative analysis of RTX toxin operon of uropathogenic *Morganella morganii* strains / L. F. Minnullina, D. S. Pudova, A. M. Mardanova // Interaction: from cell to human: abstract book of the Russian-German Seminar dedicated to the 30th anniversary of the partnership agreement between the Justus Liebig University (Giessen) and Kazan (Volga region) Federal University. – Kazan: Publishing House of Kazan University, 2019. – P. 19.
2. **Миннуллина, Л. Ф.** Полногеномное секвенирование для сравнительного анализа клинических изолятов *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, Д. С. Пудова, Е. И. Шагимарданова, А. М. Марданова // Материалы VI Международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики». – Санкт-Петербург, 2019. – С. 32-33.
3. **Миннуллина, Л. Ф.** Влияние температуры на гемолитическую активность штаммов *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, Ю. И. Вахитова, А. М. Марданова // Сборник тезисов III Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». – Казань: КФУ, 2018. – С. 20.
4. **Миннуллина, Л. Ф.** Влияние температуры культивирования на жгутикование уропатогенных штаммов *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, З. С. Тошева, В. Г. Евтюгин, А. М. Марданова // Материалы VI Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Микробиология в современной медицине». – Казань, 2018. – С. 34-36.
5. **Миннуллина, Л. Ф.** Влияние уропатогенных изолятов *Morganella morganii* на монослой клеток эукариот / Л. Ф. Миннуллина, А. М. Марданова // Проблемы медицинской микологии, Спецвыпуск «XX Кашкинские чтения: тезисы докладов». – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 106 – (БАК).
6. Гиляева, А. Г. Адгезия клинических изолятов *Klebsiella oxytoca* и *Morganella morganii* к клеткам карциномы мочевого пузыря Т-24 / А. Г. Гиляева, **Л. Ф. Миннуллина**, А. М. Марданова // Сборник тезисов 21-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2017. – С. 14-15.
7. **Миннуллина, Л. Ф.** Экспрессия гена металлопротеиназы *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, А. М. Марданова // Актуальные проблемы современной генетики. Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 40-летию кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского университета: тезисы докладов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2016. – С. 67-68.
8. Марданова А. М. Гемолизин *Morganella morganii*: биосинтез, выделение и цитотоксичность / А. М. Марданова, М. Х. Эль Эллак, **Л. Ф. Миннуллина**, З. Г. Гимадеев // Acta Naturae, Спецвыпуск «Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM». – 2016. – Т. 2 – С. 68-69. – (БАК, WoS, Scopus, IF=1.77).
9. **Миннуллина, Л. Ф.** Гемолитическая активность клинического изолята *Morganella morganii* на средах разного состава / Л. Ф. Миннуллина, А. М. Марданова // Сборник тезисов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». – Казань: КФУ, 2016. – С. 60.
10. **Minnullina, L. F.** Novel metalloprotease from *Morganella morganii* / L. F. Minnullina, A. G. Gilyazeva, A. M. Mardanova // FEBS J., Spec. Iss. “Abstracts submitted to the 41st FEBS Congress”. – (2016). – V. 283, Suppl. 1. – P. 228. – (БАК, WoS, Scopus, IF= 4.739).
11. **Миннуллина, Л. Ф.** Гемолитическая активность в культуральной жидкости и клеточном лизате клинического изолята *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, М. Х. Эль Эллак, А. М. Марданова // Биосистемы: организация, поведение и управление: тезисы докладов 69-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых. – Н. Новгород, Университет Лобачевского, 2016. – С. 92.
12. **Миннуллина, Л. Ф.** Идентификация генов гемолизина в геномах клинических изолятов *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, А. М. Марданова // Сборник тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2015. – С. 131.

13. Эль Эллак, М. Х. Гемолитическая активность изолятов *Morganella morganii* / М. Х. Эль Эллак, Л. Ф. Миннуллина, А. М. Марданова // Сборник тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2015. – С. 231.
14. Миннуллина, Л. Ф. Идентификация гена металлопротеазы в геномах клинических изолятов *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, Н. М. Замалютдинова, А. М. Марданова // Сборник тезисов 19-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2015. – С. 102-103.
15. Миннуллина, Л. Ф. Биоинформационный поиск генов гемолизина в секвенированных геномах бактерий *Morganella morganii* / Л. Ф. Миннуллина, А. Г. Гилязева // Тезисы XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье», посвященной двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2015. – С. 339-340.
16. Миннуллина, Л. Ф. Изучение экспрессии гена металлопротеазы *Morganella morganii* ZM / Л. Ф. Миннуллина, Н. М. Замалютдинова, А. М. Марданова // Сборник тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». – Казань.: Изд-во КФУ, 2014. – С. 45.
17. Миннуллина, Л. Ф. Металлопротеиназа *Morganella morganii* ZM: идентификация и клонирование гена / Л. Ф. Миннуллина, Н. М. Замалютдинова, А. М. Марданова // Тезисы докладов VII Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция». – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – С. 88.
18. Замалютдинова, Н. М. Новая металлопротеиназа *Morganella morganii* ZM / Н. М. Замалютдинова, Л. Ф. Миннуллина, А. О. Арапова // Сборник тезисов 18-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2014. – С. 205.

Е-mail автора: masaco@mail.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета КФУ.03.07 Кравцовой Ольге Александровне, Е-mail: okravz@yandex.ru