

С.Н. Козлов, В.Б. Николаев, Е.Ю. Марков, Л.В. Миронова, Л.Я. Урбанович

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G СУБКЛЕТОЧНЫМИ ФРАКЦИЯМИ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 И O139 СЕРОГРУПП

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Иркутск)

С использованием диффузионного теста в субстратном агарозном геле в стерильных субклеточных фракциях холерного вибриона O1 и O139 серогрупп, полученных из лизированных мочевиной живых микробных клеток, обнаружена способность к протеолиту кроличьих и человеческих иммуноглобулинов G. Субстратный электрофорез выявил обладающие IgG-протеазной активностью полипептиды как в водорастворимой, так и мембранной фракциях исследованных штаммов, отличающихся молекулярными массами. Выявлены отличия в IgG-протеазной активности субклеточных фракций *ompT*⁺ и *ompT*⁻ штаммов холерного вибриона.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, протеазы, субклеточные фракции, энзим-электрофорез, иммуноглобулины G

PROTEOLYTIC CLEAVAGE OF IMMUNOGLOBULINS G BY SUBCELLULAR FRACTIONS OF *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 AND O139 SEROUGROUPS

S.N. Kozlov, V.B. Nikolaev, E.Yu. Markov, L.V. Mironova, L.Ya. Urbanovich

Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор, Irkutsk

With the use of diffusion test in substrate agarose gel in sterile subcellular fractions of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups, got from by the lysis urea of living microbial cells, found out a ability for the proteolysis of rabbit and human immunoglobulins of class G. Substrate electrophoresis detected polypeptides with IgG-protease activity both in water-soluble and membrane fractions of the strains with different molecular masses. Differences in IgG-protease activity of subcellular fractions of *V. cholerae ompT*⁺ and *ompT*⁻ strains were determined.

Key words: *Vibrio cholerae*, proteases, subcellular fraction, enzyme-electrophoresis, immunoglobulins G

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в патогенезе холеры центральное место принадлежит холерному токсину, однако вирулентность возбудителя холеры носит выраженный полидетерминантный характер [11]. К настоящему времени описан ряд дополнительных факторов патогенности холерного вибриона, в том числе представляющих собой ферменты, такие как нейраминидаза [10], гемагглютинин-протеаза [15], протеаза PrtV [18]. Тем не менее, роль дополнительных факторов в развитии заболевания остается недостаточно изученной. Интерес к исследованию дополнительных факторов патогенности холерного вибриона обусловлен и тем, что у больных острыми кишечными инфекциями обнаруживаются патогенные штаммы холерного вибриона, вызывающие диарейные заболевания за счет дополнительных факторов патогенности [5]. Одним из условий реализации холерным вибрионом своего патогенного потенциала является способность к противодействию различным звеньям иммунной системы хозяина [7]. Известно, что многие патогены обладают иммуноглобулиндеградирующими протеазами (IdeS-протеазы и т.д.), однако сведения о их наличии у холерного вибриона отсутствуют. Ранее нами было показано наличие в препаратах субклеточных фракций холерного вибриона O1 и O139 серогрупп желатиназной и казеиназной протеазной активности [4], задача настоящей работы заключалась в изучении способности субклеточных фракций холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп разной эпидзначимости гидролизовать кроличьи и человеческие иммуноглобулины класса G.

Цель работы: изучить способность субклеточных фракций холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп разной эпидзначимости гидролизовать кроличьи и человеческие иммуноглобулины класса G.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стерильные препараты субклеточных фракций – мочевиновые экстракты (МЭ) и наружные мембраны (НМ) – получали, лизируя (и одновременно обеззараживая) живые клетки холерного вибриона 4,5 М раствором мочевины по методу A. Lohia с соавт. [12] в нашей модификации [3]. Всего в работе использовали 10 штаммов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп: два токсигенных штамма (*Vibrio cholerae eltor* M 878, И-1263 и восемь нетоксигенных штаммов, выделенных из воды поверхностных водоемов (*V. cholerae eltor* И-129-05-В, 2-01, И-1369, И-1368, И-638, 2131, 1291, *V. cholerae* O139 И-16).

Наличие у штаммов холерного вибриона гена *ompT* определяли в ПЦР с использованием специфических праймеров с последующей электрофоретической детекцией результатов в 1,5 % агарозном геле: *ompT* F – ATTTGGTTCTGGTTCTTCC и *ompT* R – TTTGCAATATCTTCTGGA [14].

Солюбилизацию белков фракции НМ, предварительно обработанной саркозинатом натрия [16], проводили раствором Тритона X-100 (Sigma) в присутствии 0,005 М ЭДТА (Sigma).

Суммарную протеазную активность препаратов оценивали в субстратном диффузионном тесте в 1%-ом агарозном геле, используя в качестве субстрата 0,5%-й раствор IgG, а в качестве положительного кон-

троля – раствор трипсина и протеиназы К. Ферментативную активность определяли по образованию вокруг лунок прозрачного ореола на фоне матового субстрата после осаждения 10%-й трихлоруксусной кислотой, степень активности оценивалась по величине радиуса ореола в миллиметрах. Для оценки наличия IgG-протеазной активности использовали иммуноглобулины, выделенные комбинированным методом из нормальной кроличьей сыворотки [13] и препараты коммерческих человеческих IgG (Sigma, ICN) в конечной концентрации 0,5 %. Для оценки степени чистоты иммуноглобулинов проводили диск-электрофорез в 12,5%-ом полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия по общепринятому методу.

Состав протеаз определяли методом энзим-электрофореза в 7,5 %-ном полиакриламидном геле, импрегнированном желатином, казеином, кроличьими и человеческими IgG (конечная концентрация 0,1 %) по методу С. Neussen и Е.В. Dowdle [8], с окраской гелей кумасси ярко-синим. О протеолитической активности судили по светлым зонам гидролиза на фоне окрашенного субстрата.

Анализ полученных электрофореграмм проводили с использованием системы гель-документирования Gel-Doc XR⁺ и компьютерной программы Image Lab 2.01 (Bio-Rad). Статистическую обработку проводили общепринятыми методами, рассчитывая среднеарифметические величины и их ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что обработка живых клеток холерного вибриона 4,5 М раствором мочевины позволяет получать стерильные лизаты, сохраняющие свои нативные свойства, включая гидролазную (липолитическую и протеазную) активность [1]. Это позволило приступить к дальнейшему изучению выявленных протеаз, в частности, оценить их способность гидролизовать различные субстраты, включая иммуноглобулины человека, что может представлять один из существенных механизмов патогенеза холерной инфекции [9]. Из числа дополнительных ферментативных факторов, потенциально подходящими на эту роль, могут быть белки наружной мембраны, в особенности белок OmpT, обладающий у энтеробактерий протеазной активностью [17]. Результатами ПЦР-анализа было продемонстрировано наличие гена *ompT* у большинства взятых в работу штаммов холерного вибриона [2].

Субклеточные фракции, полученные лизисом клеток холерного вибриона раствором мочевины с последующим дифференциальным центрифугированием, оказались способными гидролизовать IgG человека и кролика, что было продемонстрировано как в диффузионном тесте, так и в энзим-электрофорезе, с использованием в качестве субстрата человеческих коммерческих и выделенных нами кроличьих иммуноглобулинов G. В экспериментах использовали препараты IgG, свободные от примесей, что подтверждено результатами SDS-электрофореза.

Результаты диффузионного теста с использованием IgG показал, что все препараты МЭ холерных ви-

брионов обладают IgG-деградирующей активностью с разной степенью интенсивности, что выразилось в неодинаковых размерах зон гидролиза: у штамма *V. cholerae* eltor И-1263 – $2,00 \pm 0,03$ мм ($p < 0,05$), *V. cholerae* М 878 – $3,00 \pm 0,03$ мм ($p < 0,05$), *V. cholerae* И-638 и И-1368 – $1,00 \pm 0,03$ мм ($p < 0,05$), *V. cholerae* 2-01, 129-05-В, И-1369, И-1368 – $2,00 \pm 0,04$ мм, *V. cholerae* О139 И-16 – $1,00 \pm 0,03$ мм ($p < 0,05$). У препаратов НМ из штаммов *V. cholerae* М 878, 129-05-В, 2131, 1291 размер зон гидролиза составил $1,00 \pm 0,03$ мм ($p < 0,05$), из штаммов *V. cholerae* И-638, И-1368, И-1369 – $1,70 \pm 0,03$ мм ($p < 0,05$), из штамма *V. cholerae* И-1263, 2-01 – $1,00 \pm 0,03$ мм ($p < 0,05$), из штамма *V. cholerae* О139 И-16 – $1,00 \pm 0,03$ мм ($p < 0,05$).

Зимографический анализ препаратов МЭ и НМ выявил количественные и качественные различия в спектре протеаз, что выразилось в расположении зон гидролиза в полиакриламидном геле. В препаратах МЭ обнаружено до 6 зон гидролиза, соответствующие полипептидам с молекулярными массами от 100 до 80 кДа, тогда как в препаратах НМ выявлено до двух зон гидролиза субстрата с мол. массой 40–38 кДа (рис. 1).

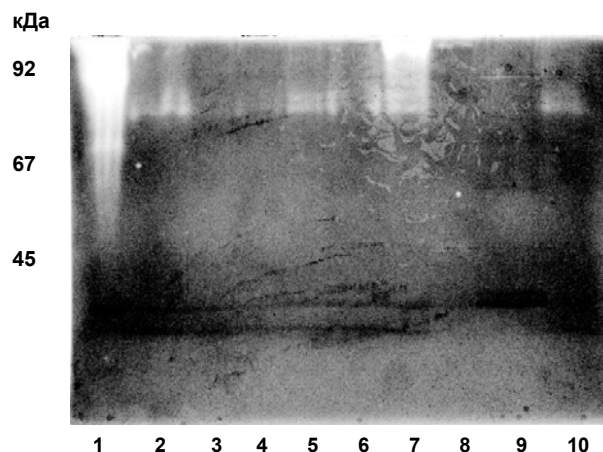


Рис. 1. Энзим-электрофорез мочевиновых экстрактов (МЭ) *V. cholerae* с использованием в качестве субстрата человеческого IgG. 1 – препарат МЭ *V. cholerae* eltor О1 М-878; 2 – препарат МЭ *V. cholerae* eltor О1 И-1368; 3 – препарат МЭ *V. cholerae* eltor 129-05-В; 4 – препарат МЭ *V. cholerae* eltor 2-01; 5 – препарат МЭ *V. cholerae* eltor И-1369; 6 – препарат МЭ *V. cholerae* eltor 2131; 7 – Препарат МЭ *V. cholerae* eltor И-1263; 8 – Препарат МЭ *V. cholerae* eltor 1291; 9 – препарат МЭ *V. cholerae* О139 И-16; 10 – препарат МЭ *V. cholerae* eltor И-638.

Сравнивая IgG-протеазную активность субклеточных фракций с активностью по отношению к стандартным субстратам (желатин, казеин) нами отмечено то, что используемые для положительного контроля трипсин и протеиназа К не гидролизуют иммуноглобулины, обладающие резистентностью к действию протеаз с широкой субстратной специфичностью, что вполне согласуется с опубликованными данными [6].

Используя препараты НМ токсигенного и не содержащего холерный токсин штаммов проведена экстракция мембраносвязанных протеаз. Зимографический анализ выявил в экстракте НМ из нетоксигенного штамма *V. cholerae* И-638 две протеазы

с молекулярными массами 38 и 40 кДа, тогда как в экстракте НМ токсигенного *V. cholerae* И-1263 – одну протеазу с молекулярной массой 120 кДа. Необходимо отметить, что *ompT*⁺ штаммы гидролизуют препараты IgG, образуя зоны протеолиза, соответствующие полипептиду с молекулярной массой 38 кДа, в то время как у препаратов экстрактов из наружных мембран, полученных из *ompT*⁻ штаммов (*V. cholerae* eltor 129-05 В, 2131) таких зон протеолиза не было, что указывает на возможное участие в этом процессе мембранного белка OmpT.

Определенный вклад в защитную реакцию слизистых оболочек кишечника, помимо sIgA, могут вносить и обнаруживаемые в секретах слизистых IgG. Гидролиз холерным вибрионом IgG может являться дополнительным механизмом, способствующим более интенсивной диссеминации возбудителя в организме, и возможно, быть одной из причин вибриононосительства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в субклеточных фракциях холерного вибриона обнаружена IgG-протеазная активность в отношении человеческих и кроличьих иммуноглобулинов, установлено наличие как растворимых, так и мембраносвязанных протеаз в препаратах МЭ и НМ соответственно, гидролизующих иммуноглобулины G, что может являться одним из дополнительных патогенетических механизмов развития холерной инфекции. Целесообразно для решения вопроса относительно природы IgG-протеазной активности провести пептидное картирование обнаруженных протеаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов С.Н., Николаев В.Б., Марков Е.Ю. и др. Гидролазная активность препаратов наружных мембран холерных вибрионов // Материалы XI межгосударственной научно-практической конференции. – 2012. – Саратов. – С. 119–121.
2. Козлов С.Н., Николаев В.Б., Марков Е.Ю. и др. Мембраносвязанные протеазы OmpT⁺ и OmpT⁻ штаммов холерного вибриона // Журн. микробиол. – 2013. – № 2. – С. 3–12.
3. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Голубинский Е.П. и др. Наружные мембраны холерного вибриона как потенциальный компонент химической вакцины // Журн. микробиол. – 1995. – № 2. – С. 86–89.
4. Николаев В.Б., Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я. и др. Протеазный спектр наружных мембран *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп // Журнал инфекционной патологии. – Иркутск, 2009. – Т. 16, № 3. – С. 41–44.
5. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А. и др. Холера в начале XXI века, прогноз // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2005. – № 3. – С. 44–48.
6. Brezski R.J., Jordan R.E. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? // Mabs. – 2010. – Vol. 2, N 3. – P. 212–220.
7. Haiko J., Suomalainen M., Ojala T. et al. Invited review: Breaking barrier - attack on innate immune

defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens // Innate Immun. – 2009. – Vol. 15, N 2. – P. 67–80.

8. Heussen C., Dowdle E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates // Anal. Biochem. – 1980. – Vol. 102, N 1. – P. 196–202.

9. Ingmer H., Brøndsted L. Proteases in bacterial pathogenesis // Res. Microbiol. – 2009. – Vol. 160, N 9. – P. 704–710.

10. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates // Microbiology. – 2002. – Vol. 148. – P. 3681–3693.

11. Kaper J. B. Morris J. G., Levine M. M. Cholera // Clin. Microbiol. Rev. – 1995. – Vol. 8, N 1. – P. 48–86.

12. Lohia A., Chatterjee A., Das J. Lysis of *Vibrio cholerae* cells: Direct isolation of the outer membrane from whole cells by treatment with urea // J. General. Microbiol. – 1984. – Vol. 130, N 8. – P. 2027–2033.

13. McKinney M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid // J. Immunol. Methods. – 1987. – Vol. 96, N 2. – P. 271–278.

14. Merrell D., Bailey C., Kaper J. et al. The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, N 9. – P. 2746–2754.

15. Silva A.J., Leitch G.J., Benitez J.A. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of El Tor biotype cholera // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 74, N 4. – P. 2072–2079.

16. Sugimura K., Nishihara T. Purification, characterization and primary structure of *E. coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT // J. Bacteriol. – 1988. – Vol. 170, N 12. – P. 5625–5632.

17. Thomassin J. L., Brannon J. R., Gibbs B. F. et al. OmpT outer membrane proteases of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* contribute differently to the degradation of human LL-37 // Infect. Immun. – 2012. – Vol. 80, N 2. – P. 483–492.

18. Vaitkevicius K., Rompikuntal P. K., Lindmark B. et al. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae* // FEBS Lett. – 2008. – Vol. 275, N 12. – P. 3167–3177.

REFERENCES

1. Kozlov S.N., Nikolaev V.B., Markov E.Ju. i dr. Hydrolase activity of preparations of external membranes of cholera vibrios // Materialy XI mezhgosudarstvennoy nauchno-prakticheskoy konferencii. – 2012. – Saratov. – S. 119–121.
2. Kozlov S.N., Nikolaev V.B., Markov E.Ju. i dr. Membrane-dependant proteases OmpT⁺ i OmpT⁻ of strains of cholera vibrio // Zhurn. mikrobiol. – 2013. – № 2. – S. 3–12.
3. Markov E.Ju., Urbanovich L.Ja., Golubinskij E.P. i dr. External membranes of cholera vibrio as a potential component of chemical vaccine // Zhurn. mikrobiol. – 1995. – № 2. – S. 86–89.
4. Nikolaev V.B., Markov E.Ju., Urbanovich L.Ja. i dr. Protease spectrum of external membranes *Vibrio cholerae*

of O1 and O139 serogroups // Zhurnal infekcionnoj patologii. – Irkutsk, 2009. – T. 16, № 3. – S. 41–44.

5. Onishhenko G.G., Lomov Ju.M., Moskvitina Je.A. i dr. Cholera in the beginning of the XXI century, prediction // Zhurn. mikrobiol., jepidemiol. i immunobiol. – 2005. – № 3. – S. 44–48.

6. Brezski R.J., Jordan R.E. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? // Mabs. – 2010. – Vol. 2, N 3. – P. 212–220.

7. Haiko J., Suomalainen M., Ojala T. et al. Invited review: Breaking barrier - attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens // Innate Immun. – 2009. – Vol. 15, N 2. – P. 67–80.

8. Heussen C., Dowdle E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates // Anal. Biochem. – 1980. – Vol. 102, N 1. – P. 196–202.

9. Ingmer H., Brøndsted L. Proteases in bacterial pathogenesis // Res. Microbiol. – 2009. – Vol. 160, N 9. – P. 704–710.

10. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates // Microbiology. – 2002. – Vol. 148. – P. 3681–3693.

11. Kaper J. B. Morris J. G., Levine M. M. Cholera // Clin. Microbiol. Rev. – 1995. – Vol. 8, N 1. – P. 48–86.

12. Lohia A., Chatterjee A., Das J. Lysis of *Vibrio cholerae* cells: Direct isolation of the outer membrane from whole cells by treatment with urea // J. General. Microbiol. – 1984. – Vol. 130, N 8. – P. 2027–2033.

13. McKinney M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid // J. Immunol. Methods. – 1987. – Vol. 96, N 2. – P. 271–278.

14. Merrell D., Bailey C., Kaper J. et al. The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, N 9. – P. 2746–2754.

15. Silva A.J., Leitch G.J., Benitez J.A. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of El Tor biotype cholera // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 74, N 4. – P. 2072–2079.

16. Sugimura K., Nishihara T. Purification, characterization and primary structure of *E. coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT // J. Bacteriol. – 1988. – Vol. 170, N 12. – P. 5625–5632.

17. Thomassin J. L., Brannon J. R., Gibbs B. F. et al. OmpT outer membrane proteases of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* contribute differently to the degradation of human LL-37 // Infect. Immun. – 2012. – Vol. 80, N 2. – P. 483–492.

18. Vaitkevicius K., Rompikuntal P. K., Lindmark B. et al. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae* // FEBS Lett. – 2008. – Vol. 275, N 12. – P. 3167–3177.

Сведения об авторах

Козлов Станислав Николаевич – младший научный сотрудник биохимического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-38; e-mail: ejimei@mail.ru)

Николаев Валерий Борисович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Марков Евгений Юрьевич – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий биохимическим отделом ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Миронова Лилия Валерьевна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории холеры ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Урбанович Людмила Яковлевна – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холеры ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Information about the authors

Kozlov Stanislav Nikolaevich – junior scientific officer of biochemical department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор (Irkutsk, Trilissera str., 78, 664047; tel.: 8 (3952) 22-01-38; e-mail: ejimei@mail.ru)

Nikolaev Valeriy Borisovich – candidate of medical sciences, senior scientific officer of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор

Markov Evgeniy Yurievich – doctor of biological sciences, senior scientific officer, head of biochemical department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор

Mironova Liliya Valerievna – candidate of medical sciences, senior scientific officer of laboratory of cholera of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор

Urbanovich Lyudmila Yakovlevna – doctor of medical sciences, senior scientific officer of laboratory of cholera of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор