



Серия «Биология. Экология»
2024. Т. 47. С. 64–70
Онлайн-доступ к журналу:
<http://izvestiabiо.isu.ru/ru>

ИЗВЕСТИЯ
Иркутского
государственного
университета

Краткое сообщение

УДК 616.932(471)+57.579
<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2024.47.64>

Ингибиторный анализ протеаз препаратов бесклеточных фракций холерных вибрионов

С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Л. В. Миронова, А. В. Корнева,
А. А. Дорощенко*

*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока Роспотребнадзора, г. Иркутск, Россия
E-mail: ejimei@mail.ru*

Аннотация. Изучена протеолитическая активность препаратов культуральной жидкости холерных вибрионов серогрупп О1 и О139 разной эпидемической значимости. Установлено, что гидролитические ферменты патогенных микроорганизмов усиливают их патогенность (вирулентность) и участвуют в процессах адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды. Отмечено, что у холерного вибриона ранее электрофоретически были обнаружены гидролазы, относящиеся к разным подклассам, и установлены различия по их спектру у штаммов с разной эпидемиологической значимостью, что делает изучение их характеристик (определение типа с использованием активаторов/ингибиторов) актуальным направлением исследований. Указано, что при проведении ингибиторного анализа секретируемых протеаз штаммов холерных вибрионов серогруппы О1 Е1 Тог биовара и серогруппы О139 в составе протеаз определено присутствие сериновых и металлопротеаз.

Ключевые слова: зимография, полиакриламидный гель, бесклеточные экстракты, *V. cholerae*, ингибиторы, активаторы.

Для цитирования: Ингибиторный анализ протеаз препаратов бесклеточных фракций холерных вибрионов / С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Л. В. Миронова, А. В. Корнева, А. А. Дорощенко // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2024. Т. 47. С. 64–70. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2024.47.64>

Short communication

Inhibitory Analysis of Protease Preparations of Cell-Free Fractions of Cholera Vibrios

S. N. Kozlov, E. Yu. Markov, V. B. Nikolaev, L. V. Mironova, A. V. Korneva,
A. A. Doroshchenko*

*Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор, Irkutsk,
Russian Federation*

Abstract. One of the important areas of research into the pathogenesis of diseases caused by pathogens of especially dangerous infections is the study of the system of hydrolytic enzymes. It has been established that hydrolytic enzymes of pathogenic microorganisms enhance their pathogenicity (virulence) and participate in the processes of adaptation to unfavourable environmental factors. Cholera

© Козлов С. Н., Марков Е. Ю., Николаев В. Б., Миронова Л. В., Корнева А. В., Дорощенко А. А., 2024

*Полные сведения об авторах см. на последней странице статьи.
For complete information about the authors, see the last page of the article.

vibrio has previously electrophoretically detected hydrolases belonging to different subclasses and established differences in their spectrum in strains with different epidemic significance. Therefore, the study of their characterisation (type determination using activator/inhibitor assays) is a relevant area of research. The inhibitor analysis of secreted proteases of cholera vibrio strains of O1 serogroup El Tor biovar and O139 serogroup determined that the proteases include serine and metalloproteases.

Keywords: zymography, polyacrylamide gel, cell-free extracts, *Vibrio cholerae*, inhibitors, activators.

For citation: Kozlov S.N., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Mironova L.V., Korneva A.V., Doroshchenko A.A. Inhibitory Analysis of Protease Preparations of Cell-Free Fractions of Cholera Vibrios. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2024, vol. 47, pp. 64-70. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2024.47.64> (in Russian)

Гидролитические ферменты многих патогенных микроорганизмов играют роль в патогенезе и адаптации возбудителей многих инфекционных заболеваний [Fierer, Looney, Pechère, 2017]. Среди их продуцентов пристальное внимание привлекают холерные вибрионы, поскольку установлена их значимость в качестве дополнительных факторов патогенности и персистенции, они обладают устойчивостью к разным химическим агентам и широкой субстратной специфичностью [*Vibrio cholerae* classification ... , 2023]. Ранее нами было сообщено об обнаружении у *Vibrio cholerae* El Tor серогрупп O1 и O139 гидролитических ферментов, относящихся к разным подклассам, и межштаммовых различиях в спектрах гидролаз при их исследовании в субстратном энзим-электрофорезе [Зимографическая детекция ... , 2017]. Наиболее глубоко изученными среди них являются ферменты, осуществляющие гидролитическое расщепление белков до аминокислот, – протеазы. Выполненное пептидное картирование подтвердило наличие различных каталитических специфичностей для каждой фракции протеиназ, выделенных из культурального фильтрата штамма *Vibrio cholerae* NCTC 10732 с использованием ограниченного числа ингибиторов на диметилказеине [Stewart-Tull, Bleakley, Galloway ... , 2004]. На настоящий момент в публикациях отсутствует подробная информация о типах протеаз холерных вибрионов O1 и O139 в зависимости от типа чувствительности к действию различных химических соединений, обладающих как активаторными, так и ингибиторными свойствами.

Цель настоящей работы – выполнить ингибиторный анализ секретируемых протеаз в зависимости от действия активаторов/ингибиторов *Vibrio cholerae* серогрупп O1 и O139 разной эпидемической значимости и происхождения методом зимографии.

В качестве объекта исследования использованы лиофилизированные препараты супернатантов культуральной жидкости (СКЖ) *V. cholerae* El Tor O1 И-1334, И-638 и *V. cholerae* O139 И-16, полученные первоначальным выращиванием культуры холерного вибриона на щелочном мясопептонном агаре pH 7,6 в течение суток. Суточную культуру смывали физраствором и засеивали во флаконы с мясопептонным бульоном с pH 7,6 в концентрации 10^8 м.к./мл. После двухчасовой инкубации при комнатной температуре во флаконы с целью стерилизации засеянной культуры добавляли мертиолят натрия в концентрации 0,01 %, затем бактериальную суспензию выдержива-

ли на холоде в течение 48 ч. После контроля и подтверждения специфической стерильности суспензию центрифугировали при 10 000 об/мин. Получившийся супернатант подвергали диализу и лиофильному высушиванию. Лиофилизированные образцы суспендировали в буфере для образцов для электрофореза в концентрации 4 мг/мл по белку. Выявление протеаз осуществляли методом субстратного энзим-электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), используя в качестве субстрата коммерческий препарат желатина (Sigma-Aldrich), взятого в конечной концентрации 0,1 %, и с помощью тестов радиальной энзимодиффузии (RED-тесты) в 1,5%-ной агарозе с 0,5%-ным желатином в чашках Петри. Для оценки влияния на активность и протеазный спектр использованы следующие соединения: PMSF, DIFP, NaN_3 , EDTA, CaCl_2 , 1,10-фенантролин, ZnSO_4 , MgCl_2 , CdCl_2 , AlCl_3 , MnSO_4 и гепарин, смешанные предварительно с исследуемыми образцами для полу-часовой преинкубации перед нанесением образцов и взятые в конечной концентрации 50 мМ. Для сравнения в качестве контроля использовали исходный (необработанный) препарат СКЖ *V. cholerae* И-1334. О наличии активности протеаз после окончания электрофореза судили по формированию бесцветных полос протеолиза субстрата на фоне окрашенного ПААГ и образованию прозрачных зон гидролиза на фоне мутного геля в тестах радиальной энзимодиффузии. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica v.6.0 для Windows, достоверность различий значений размеров зон гидролиза в RED-тестах и полос гидролиза в ПААГ анализировали посредством *t*-критерия Стьюдента. Эксперименты проводили в трёх повторностях.

Анализ полученных энзим-электрофореграмм показал вариабельность наличия полос активных протеаз в зависимости от типа используемого активатора/ингибитора по сравнению с исходным препаратом, в составе которого наблюдались семь полос протеаз (трек 1 на рис. 1–3). Так, при использовании PMSF (ингибитор сериновых протеаз) отмечается практически полное исчезновение полос протеаз (трек 2 на рис. 1–4), что свидетельствует о том, что в состав данного препарата входят сериновые протеазы, при использовании DIFP (ингибитор ацетилхолинэстеразы) происходит уменьшение интенсивности протеазных полос (трек 3 на рис. 3), что говорит о слабой ингибции протеаз. При воздействии NaN_3 изменений профиля протеаз не наблюдается (трек 4 на рис. 1; трек 5 на рис. 2 и 4; трек 7 на рис. 3), однако при воздействии EDTA наблюдается исчезновение всех протеазных полос, что указывает на ингибирование металлопротеаз (трек 5 на рис. 1). Хлорид кальция и 1,10-фенантролин не ингибировали активность протеаз. Сульфат цинка привёл к ингибированию высокомолекулярных протеаз, хлористый магний и гепарин не вызвали ингибирование протеаз, полосы протеаз под их воздействием более интенсивные. В RED-тестах отмечается достоверное исчезновение зон гидролиза желатина при использовании PMSF и DIFP, при использовании EDTA зона гидролиза уменьшилась вдвое по сравнению с исходным препаратом, воздействие MgCl_2 и гепарина привели к незначительному увеличению зон гидролиза желатина.

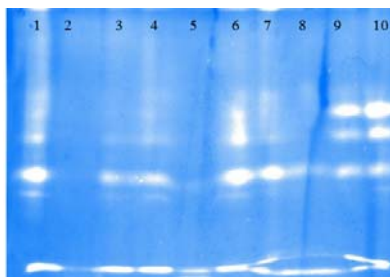


Рис. 1. Субстратный электрофорез препарата СКЖ *V. cholerae* И-1334 в 8%-ном ПААГ с 0,1%-ным желатином. Окраска 0,1%-ный Coomassie R-250. 1 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334 исх.; 2 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+PMSF; 3 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+DIFP; 4 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+NaN₃; 5 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+ЭДТА; 6 – *V. cholerae* El Tor И-1334+CaCl₂; 7 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+1,10 фенантролин; 8 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+ZnSO₄; 9 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+MgCl₂; 10 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+гепарин

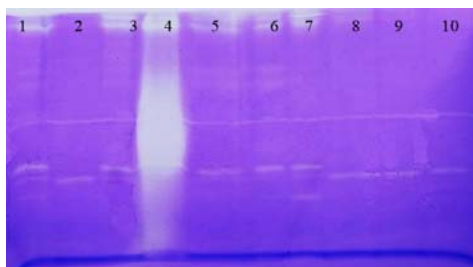


Рис. 2. Субстратный электрофорез препарата СКЖ *V. cholerae* И-1334 в 8%-ном ПААГ с 0,1%-ным желатином. Окраска 0,1%-ный Coomassie R-250. 1 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334 исх.; 2 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+PMSF; 3 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+DIFP; 4 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+гепарин; 5 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+NaN₃; 6 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+CaCl₂; 7 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+1,10 фенантролин; 8 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+MnSO₄; 9 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+AlCl₃; 10 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-1334+CdCl₂

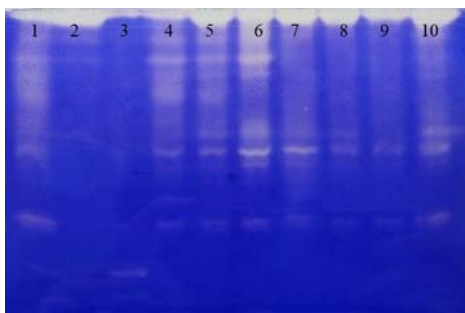


Рис. 3. Субстратный электрофорез препарата СКЖ *V. cholerae* И-680 в 8%-ном ПААГ с 0,1%-ным желатином. Окраска раствором 0,1%-ный Coomassie R-250. 1 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680 исх.; 2 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680+PMSF; 3 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680+DIFP; 4 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680+гепарин; 5 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680+1,10 фенантролин; 6 – *V. cholerae* El Tor И-680+CaCl₂; 7 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680+NaN₃; 8 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680+EDTA; 9 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680+MgCl₂; 10 – СКЖ *V. cholerae* El Tor И-680+MnSO₄

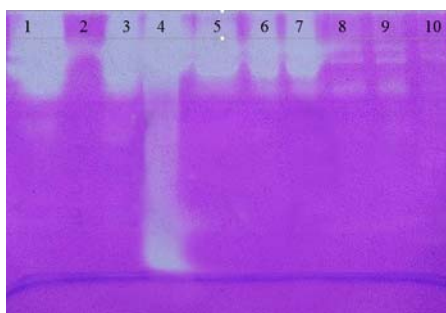


Рис. 4. Субстратный электрофорез препарата СКЖ *V. cholerae* O139 И-16 в 8%-ном ПААГ с 0,1%-ным желатином. Окраска раствором 0,1%-ный Coomassie R-250. 1 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16 исх.; 2 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+PMSF; 3 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+DIFP; 4 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+гепарин; 5 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+NaN₃; 6 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+CaCl₂; 7 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+1,10 фенантролин; 8 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+MnSO₄; 9 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+MnCl₂; 10 – СКЖ *V. cholerae* O139 И-16+CdCl₂

Зимографический анализ показал, что практически полное ингибирование активности протеаз происходит при использовании ингибитора сериновых протеаз PMSF – высокомолекулярные протеазы ингибируются, остаётся только низкомолекулярная протеаза, DIFP и азид натрия ингибируют протеазы слабо, ингибитор металлопротеаз ЭДТА ингибирует их практически полностью, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $AlCl_3$ и $CdCl_2$ ингибируют до одной низкомолекулярной полосы.

Таким образом, использование гепарина приводит к значительному усилению интенсивности протеазных полос, что свидетельствует о его безусловно активаторном действии в отношении сериновых протеаз [Yu, Woessner, 2001], несмотря на то, что он является известным ингибитором калликреин-кининовой системы ферментов крови [Heparin blocks the inhibition ... , 2020], хотя механизм действия гепарина в данном случае сложен [Molecular mechanism ... , 2021]. Электрофоретическая картина действия испытанных химических соединений на активность экстрацеллюлярных протеаз препаратов СКЖ *V. cholerae* O1/O139 практически одинакова, что указывает на общий каталитический механизм их действия на активные центры детектируемых экзопротеаз, а также подтверждает обнаружение идентичных протеаз.

Исследуемые препараты СКЖ *V. cholerae* O1 El Tor содержат активные сериновые протеазы, металлопротеазы. Использование $MgCl_2$ и гепарина привело к повышению интенсивности полос желатиназ, т. е. они действовали как активаторы. Использование комплекса различных активаторов/ингибиторов статистически достоверно приводит к значительному одинаковому изменению спектра протеаз (желатиназ) у штаммов *V. cholerae* O1 El Tor И-1334, И-638 и *V. cholerae* O139 И-16 и изменению радиуса зон гидролиза желатина. Возможность получать информацию о способности различных химических соединений ингибировать активность протеаз холерных вибрионов можно использовать в целях синтеза новых веществ и разработки перспективных препаратов для подавления жизнеспособности холерных вибрионов.

Список литературы

Зимографическая детекция гидролаз *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп с использованием специфических субстратов / С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Л. В. Миронова, С. К. Миткеева, Л. Я. Урбанович // Междунар. научно-исследовательский журнал. 2017. №11. С. 70–76. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2017.65.131>

Fierer J., Looney D., Pechère J. C. Nature and pathogenicity of microorganisms // Infect. Dis. 2017. Vol. 1. P. 4–25. e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00002-2>

Heparin blocks the inhibition of tissue kallikrein 1 by kallistatin through electrostatic repulsion / L. Ma, J. Wu, Y. Zheng, Z. Shu, Z. Wei, Y. Sun, R. W. Carrell, A. Zhou // Biomolecules. 2020. Vol. 10, N 6. P. 828. <https://doi.org/10.3390/biom10060828>

Molecular mechanism of the anti-inflammatory action of heparin / L. Litov, P. Petkov, M. Rangelov, N. Ilieva, E. Lilkova, N. Todorova, E. Krachmarova, K. Malinova, A. Gospodinov, R. Hristova, I. Ivanov, G. Nacheva // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, N 19. e10730. <https://doi.org/10.3390/ijms221910730>

Stewart-Tull D. E. S., Bleakley C. R., Galloway T.S. Characteristics of *Vibrio cholerae* proteases: potential, candidate vaccine antigens // Vaccine. 2004. Vol. 22, Is. 23–24. P. 3026–3034. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.02.012>

Vibrio cholerae classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development / D. A. Montero, R. M. Vidal, J. Velasco, S. George, Y. Lucero, L. A. Gómez, L. J. Carreño, R. García-Betancourt, M. O’Ryan // *Front. Med.* 2023. Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1155751>

Yu W. H., Woessner J. F. Heparin-enhanced zymographic detection of matrilysin and collagenases // *Anal. Biochem.* 2001. Vol. 293, Is. 1. P. 38–42. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5099>

References

Kozlov S.N., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Mironova L.V., Mitkeeva S.K., Urbanovich L.Ya. Zimograficheskaya detektsiya gidrolaz *Vibrio cholerae* O1 i O139 serogrupp s ispol'zovaniem spetsificheskikh substratov [Zymographic detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups hydrolases using specific substrates]. *Int. Res. J.*, 2017, no.11, pp. 70-76. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2017.65.131>. (in Russian)

Fierer J., Looney D., Pechère J. C. Nature and pathogenicity of microorganisms. *Infect. Dis.*, 2017, vol. 1, pp. 4-25. e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00002-2>

Ma L., Wu J., Zheng Y., Shu Z., Wei Z., Sun Y., Carrell R.W., Zhou A. Heparin blocks the inhibition of tissue kallikrein 1 by kallistatin through electrostatic repulsion. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no. 6, p. 828. <https://doi.org/10.3390/biom10060828>

Litov L., Petkov P., Rangelov M., Ilieva N., Lilkova E., Todorova N., Krachmarova E., Malinova K., Gospodinov A., Hristova R., Ivanov I., Nacheva G. Molecular mechanism of the anti-inflammatory action of heparin. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 19, e10730. <https://doi.org/10.3390/ijms221910730>

Stewart-Tull D.E.S., Bleakley C.R., Galloway T.S. Characteristics of *Vibrio cholerae* proteinases: potential, candidate vaccine antigens. *Vaccine*, 2004, vol. 22, is. 23-24, pp. 3026-3034. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.02.012>

Montero D.A., Vidal R.M., Velasco J., George S., Lucero Y., Gómez L.A., Carreño L.J., García-Betancourt R., O’Ryan M. *Vibrio cholerae* classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development. *Front. Med.*, 2023, vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1155751>

Yu W.H., Woessner J.F. Heparin-enhanced zymographic detection of matrilysin and collagenases. *Anal. Biochem.*, 2001, vol. 293, is. 1, pp. 38-42. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5099>

Сведения об авторах

Козлов Станислав Николаевич

научный сотрудник

Иркутский научно-исследовательский

противочумный институт

Роспотребнадзора

Россия, 664047, г. Иркутск, Трилиссера, 78

e-mail: ejimei@mail.ru

Марков Евгений Юрьевич

доктор биологических наук, старший

научный сотрудник

Иркутский научно-исследовательский

противочумный институт

Роспотребнадзора

Россия, 664047, г. Иркутск, Трилиссера, 78

e-mail: mark_evgenii@mail.ru

Николаев Валерий Борисович

кандидат медицинских наук, старший

научный сотрудник

Иркутский научно-исследовательский

противочумный институт

Information about authors

Kozlov Stanislav Nikolaevich

Research Scientist

Irkutsk Anti-Plague Research Institute

of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор

78, Trilisser st., Irkutsk, 664047,

Russian Federation

e-mail: ejimei@mail.ru

Markov Evgeniy Yurievich

Doctor of Sciences (Biology)

Senior Research Scientist

Irkutsk Anti-Plague Research Institute

of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор

78, Trilisser st., Irkutsk, 664047,

Russian Federation

e-mail: mark_evgenii@mail.ru

Nikolaev Valeriy Borisovich

Candidate of Sciences (Medicine),

Senior Research Scientist

Irkutsk Anti-Plague Research Institute

of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор

Роспотребнадзора
Россия, 664047, г. Иркутск, Трилиссера, 78
e-mail: eaverschinin@mail.ru

Миронова Лилия Валерьевна
доктор медицинских наук, заместитель
директора,
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора
Россия, 664047, г. Иркутск, Трилиссера, 78
e-mail: mironova-lv@yandex.ru

Корнева Александра Владимировна
младший научный сотрудник
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора
Россия, 664047, г. Иркутск, Трилиссера, 78
e-mail: korneva@inbox.mail.ru

Дорощенко Антон Александрович
младший научный сотрудник
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора
Россия, 664047, г. Иркутск, Трилиссера, 78
e-mail: yashik.genry@mail.ru

78, Trilisser st., Irkutsk, 664047,
Russian Federation
e-mail: eaverschinin@mail.ru

Mironova Lilya Valerievna
Doctor of Sciences (Medicine), Deputy Director
Irkutsk Anti-Plague Research Institute
of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor
78, Trilisser st., Irkutsk, 664047, Russian
Federation
e-mail: mironova-lv@yandex.ru

Korneva Aleksandra Vladimirovna
Junior Research Scientist
Irkutsk Anti-Plague Research Institute
of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor
78, Trilisser st., Irkutsk, 664047, Russian
Federation
e-mail: korneva@inbox.mail.ru

Doroschenko Anton Aleksandrovich
Junior Research Scientist
Irkutsk Anti-Plague Research Institute
of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor
78, Trilisser st., Irkutsk, 664047, Russian
Federation
e-mail: yashik.genry@mail.ru