9 Hauge C. et al. Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation // EMBO J. – 2007. - №26. - P.2251-2261.
10 Hara K., Maruki Y., Long X., Yoshino K., Oshiro N., Hidayat S., Tokunaga C., Avruch J., Yonezawa K.. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action // Cell. – 2002. - №110 (2). - P.177-189.
11 Bogre L., Henriques R., Magyar Z. TOR tour to auxin // EMBO J. - 2013. - №32. - P.1069-1071.
12 Turck F., Kozma S., Thomas G., Nagy F. A heat-sensitive Arabidopsis thaliana kinase substitutes for human p70S6K function in vivo // Mol. Cell. Biol. – 1998. - №18 (4). - P.2038-2044.
13 Feldman M., Apsel B., Uotila A., Loewith R., Knight Z., Ruggero D., Shokat K. Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-Resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2 // PLoS. Biol. – 2009. - №7 (2). - P.38.

УДК 57.083.1; 57.088.3; 577.29; 579.6

С.М*. Шайхин, А.К. Молдагулова, А.К. Кажыбаев, Э.Е. Бекенова,
М.Ж. Каирова, К.Г. Ли, М.С. Уразова, К.Х. Алмагамбетов
Республиканская коллекция микроорганизмов, г. Астана, Казахстан
*e-mail: rkm_shaikhin@mail.ru

Изучение физиолого-биохимических характеристик чистых культур молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии синтезируют пептидогликангидролазы (PG гидролазы), которые способны расщеплять ковалентные связи собственных PG и играют важную роль в моделировании PG, необходимом для роста бактерий и деления. Целью настоящей работы было изучение физиолого-биохимических характеристик чистых культур молочнокислых бактерий, выделенных из продуктов питания и микрофлоры организма клинически здорового человека, на примере основных PG гидролаз методом ренатурации в полиакриламидном геле.

Ключевые слова: Молочнокислые бактерии, пептидогликангидролазы, субстратная специфичность, протеолиз, метод ренатурации в полиакриламидном геле.

Шайхин С.М., Молдагулова А.К., Кажыбаев А.К., Бекенова Э.Е.,
Каирова М.Ж., Ли К.Г., Уразова М.С., Алмағамбетов Қ.Х.

Сүт қышқылды бактериялардың таза культурасының физиолого-биохимиялық қасиеттерін зерттеу

Бактериялар, PG өзіндік коваленттi байланыстарын ажырататын, бактерияның өсуіне және бөлінуіне қажетті PG модельдеуінде негізгі рөл атқаратын пептидогликангидролазаларын (PG гидролазалар) синтездейді. Бұл жұмыстың мақсаты полиакриламидті гелінде ренатурация әдісімен клиникалық сау адам организміндегі микрофлорарадан және тағам өнімдерінен сүтқышқылды бактериялардың таза культураларының физиолого-биохимиялық қасиеттерін зерттеу.

Түйін сөздер: Сүт қышқылды бактериялар, пептидогликангидролазалар, субстрат ерекшелігі, протеолиз, полиакриламидті гелінде ренатурация әдісі.

Shaikhin S.M., Moldagulova A.K., Kazhybaev A.K., Bekenova E.E.,
Kairova M.J., Lee K.G., Urazova M.S., Almagambetov K.Kh.

Study of physiological and biochemical characteristics of pure cultures of lactic acid bacteria

Bacteria synthesize PG hydrolases which are capable of cleaving the covalent bonds of own PG and play an important role in modeling PG, required for bacterial growth and division. The aim of the present work was to study the physiological and biochemical characteristics of pure cultures of lactic acid bacteria isolated from food and microflora of clinically healthy person, on an example of the main PG hydrolases by.

Keywords: Lactic acid bacteria, peptidoglycan hydrolases, substrate specificity, proteolysis, method of renaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

Пептидогликан (PG) является основным компонентом клеточной стенки у грамположительных бактерий и играет ключевую роль в сохранении целостности и формы бактериальной клетки. PG состоит из гликановых цепей, состоящих из чередующихся звеньев мономеров N-ацетил-глюкозамина (GlcNAc) и N-ацетил-мурамовой кислоты (MurNAc), с межмономерными β-1 ,4-связями. Гликановые цепи сшиты пептидными цепочками, состав которых варьирует в зависимости от вида бактерий [1]. PG клеточной стенки является мишенью для PG гидролаз (также называемых автолизинами), и синтезируемых самими бактериями [2]. По субстратной специфичности гидролизуемой связи PG гидролазы подразделяются на различные классы. В эту категорию белков

входят некоторые бактериоцины энтерококков (энтероцины третьего класса), лизоцимы и эндолизины бактериофагов [3].

Молочнокислые бактерии (МКБ) являются важными компонентами пищеварительного тракта человека и некоторые штаммы также признаются как пробиотические бактерии. Пробиотиками называют живые микроорганизмы, которые при попадании в пищеварительный тракт в достаточном количестве, полезны для здоровья помимо их традиционных питательных эффектов [4]. МКБ влияют на иммунные ответы, в частности, на понижение и регуляцию воспалительных ответов посредством индукции противовоспалительных механизмов, опосредованных иммунокомпетентными клетками и секретируемыми цитокинами [5] и определенные формы пептидогликангидролаз (p40, p75) вовлечены в механизмы взаимодействий микроорганизмов с клетками тканей макроорганизма хозяина. Целью настоящей работы было изучение физиолого-биохимических характеристик чистых культур молочнокислых бактерий, выделенных из продуктов питания и микрофлоры организма клинически здорового человека, на примере основных PG гидролаз методом ренатурации в полиакриламидном геле.

Материалы и методы

Объектами исследований служили 7 штаммов: *Lactococcus lactis* 17A и *Lactococcus garvieae* 19A, изолированные из мясного продукта казы, *L. delbrueckii subsp. lactis* СГ-1 B-RKM 0044, выделенный из сыра, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* B-RKM 0200 из микрофлоры здорового человека, *Lactobacillus casei subsp. casei* B-RKM 0202, из масла домашнего изготовления, а также *Lactobacillus rhamnosus* BSR из «Простокваши FOOD MASTER, Био-с иммун +» Компании ФудМастер. Выделение и генотипирование штаммов *L. lactis* 17A, *L. garvieae* 19A и *L.* rhamnosus BSR описано в работе Каировой и Молдагуловой [6]. Остальные штаммы взяты из Центрального музея Республиканской коллекции микроорганизмов КН МОН РК.

Получение клеточного субстрата для зимографии PG гидролаз, подготовку клеточных экстрактов и обработку додецилсульфатом натрия (ДСН) проводили согласно протоколу, описанному в работе Лепьюпл и соавт. с применением небольших модификаций [7]. ДСН-полиакриамидный (ПАА) гель-электрофорез и получение зимограмм проводили по общеизвестным стандартным методикам [4, 7-9].

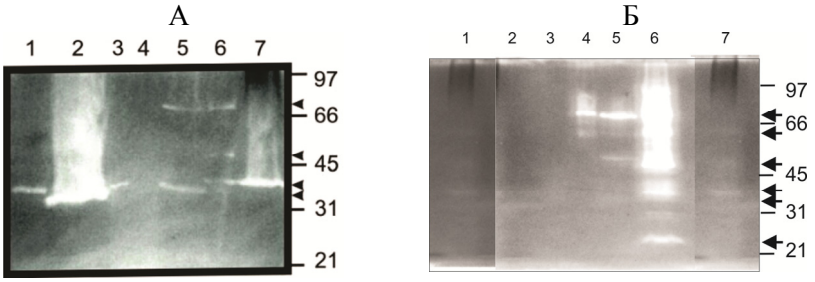
Сравним PG активности на дорожках под номером 4 на зимограммах А и Б, в которые добавлены разные субстраты. На зимограмме А с субстратом *L.garvieae* 19A полосы автолизиновой активности на дорожках под номерами: 1, 2, 3 и 7 ярче, чем на зимограмме Б. Исключение составляет автолизин штамма СГ-1 B-RKM 0044, который активен с собственным субстратом (зимограмма Б). По-видимому, смена субстрата PG гидролазы, могла быть причиной отсутствия полосы ≥75 кДа лизиса на дорожке 4 зимограммы А, т.е. имело место проявление субстратной специфичности фермента. Этот основной автолизин штамма СГ-1 B-RKM 0044 (≥ 75 кДа) сравним по молекулярной массе с цитируемой в другой работе PG - гидролазой из штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* с молекулярной массой 80 кДа [10].

Аналогично, PG гидролаза штамма 19A (зимограмма А, дорожка 2) проявляла субстратную специфичность по отношению к собственному субстрату и отсутствие таковой когда PG гидролазным субстратом выступал штамм СГ-1 B-RKM (сравните зимограммы А и Б, дорожка 2). Причину искажений полос лизиса в районе 40 кДа, которая наблюдается на дорожке 2 зимограммы А, в литературе объясняют участием белков S-слоя, которые располагаются на клеточной стенке грамположительных бактерий и имеют молекулярные массы того же порядка 40 кДа [11]. Надо отметить, что протеиназы являются еще одной причиной вариабельности интенсивности полос лизиса. Бьюст и соавторы [12] показали, что автолизин AcmA из *Lactococcus lactis* с молекулярной массой порядка 40 кДа, (который присутствует на дорожке 1 зимограммы А), разрушается внеклеточной протеиназой [12].

Результаты и обсуждение

На рис.1 представлены зимограммы PG гидролаз 7 штаммов молочнокислых бактерий. Согласно данным *in silico* комплемент PG гидролаз штамма *L. casei* BL23, содержит тринадцать PG гидролаз [4]. Те же авторы подтвердили транскрипцию этих генов с помощью метода обратной транскрипции с ПЦР анализом (ОТ-ПЦР). Протеомный анализ, комбинированный с использованием ДСН-ПАА гель электрофореза и жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрией (LC-MS/MS), выявил основные семь PG гидролаз, синтезированных в процессе роста *L. casei* BL23 [4]. Среди них

PG гидролаза, LCABL_02770 является гомологом высокоэкспрессируемого белка p75 из штамма *L. rhamnosus* GG (LGG) он же MSP1 [9, 13]. Авторы цитируемых работ показали, что p75 (MSP1), способствует выживанию и росту клеток эпителия кишечника [9, 13]. Иммунофлуоресцентными экспериментами было показано, что Lc-p75 локализуется на перегородках двух делящихся бактерий в соответствии со своей ролью в разделении дочерних клеток. Кроме того, они секретируются в активной форме, о чем свидетельствовали результаты зимографии [9, 13].



А - гель содержит клетки *L. garvieae* 19А в качестве субстрата PG гидролазы. Б - гель содержит клетки *L. delbrueckii subsp. lactis* СГ-1. 1 -, клеточный экстракт *L. lactis* 17А; 2 - клеточный экстракт *L. garvieae* 19А; 3 - клеточный экстракт *L. casei subsp. rhamnosus* 13-П; 4 - клеточный экстракт *L. delbrueckii subsp. lactis* СГ-1 B-RKM 0044; 5 - клеточный экстракт *L. casei subsp. rhamnosus* B-RKM 0200; 6 - клеточный экстракт *L. casei subsp. casei.* B-RKM 0202; 7 - клеточный экстракт *L. rhamnosus BRS*. Расположения полос лизиса отмечены стрелками. Цифры справа обозначают молекулярные массы в кДа (килодальтонах).

Рисунок 1 - Профиль PG гидролазной активности МКБ, полученный методом ренатурации в ПАА-геле

Таким образом, идентифицированные нами гомологи Lc-p75 в виде пептидов с молекулярными массами порядка 70-75 кДа, являются основными PG гидролазами в исследованных штаммах 0200 и 0202 (дорожки 5 и 6 зимограмм). У штамма *L. casei subsp. rhamnosus* 13-П не проявилась PG активность в районе p75, хотя для двух субстратов обнаружена активность в районе 40 кДа, близкая по молекулярной массе гомологу Lc-p40 – мажорному белку с пробиотической активностью [14]. Профиль PG гидролазной активности с единственным гомологичным Lc-p40 белком (Дорожка 3, зимограммы А), отличен от профилей двух других штаммов родственной группы 0200 и 0202, в которых проявляются активности как Lc-p40, так и Lc-p75, что может отражать иные физиолого-биохимические характеристики этих штаммов.

Лактобациллы представляют интерес для медицины не только в качестве пробиотиков, но и в качестве транспортеров вакцин. Их иммуностимулирующая активность установлена в опытах над животными и при клинических испытаниях выявлен их антидиарейный эффект (*Lactobacillus rhamnosus u Lactobacillus paracasei*). Объект изучения настоящей работы – пептидогликангидролазы молочнокислых бактерий - участвуют в механизмах усиления пробиотических активностей лактобацилл. По этой причине изучения физиолого-биохимических характеристик пептидогликангидролаз лактобацилл актуальны и находятся в русле современных исследований, направленных на расшифровку механизмов взаимодействий микроорганизмов с макроорганизмом хозяина.

Литература

1 Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture // FEMS Microbiol Rev. - 2008. – V 32. – P. 149–167.

2 Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases // FEMS Microbiol Rev. - . 2008. – V. 32. – P. 259–286.

3 Donovan D.M. Bacteriophage and peptidoglycan degrading enzymes with antimicrobial applications // Recent Pat Biotechnol. – 2007/ - V.1. – P. 113-122.

4 Regulski, K., Courtin, P., Meyrand, M., Claes, I. J., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Hols, P., Guillot, A., and Chapot-Chartier, M. P. Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of Lactobacillus casei and characterization of the major gamma-D-glutamyl-L-lysyl-endopeptidase // PLoS One 7, e32301. - 2012.

5 Corthesy B., Gaskins H.R., Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system // J Nutr. – 2007. - V. 137. - P. 781S–790S.

6 Kairova M. and Moldagulova A. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria from horsemeat and homemade sour cream // J. World academy of Science, Engineering and Technology.Dubai. - 2013. – № 73. - P. 1220-1225

7 Lepeuple A.S., Van Gemert E., Chapot-Chartier M.P. Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic Lactococcus lactis subsp. cremoris strain AM2 by renaturing polyacrylamide gel electrophoresis: identification of a prophage encoded enzyme // Appl Environ Microbiol. - 1998. – V. – 64. – P. 4142–4148.

8 Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature (London). - 1970. – V. 227. – P. 680–685.

9 Claes I., Schoofs G., Regulski K., Courtin P., Chapot-Chartier M.-P., et al. Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of Lactobacillus rhamnosus GG // Plos One;doi. – 2012. - 10.1371/ journal.pone.0031588.

10 O.J. Kang, S. Laberge, R.E. Simard. Detection and Localization of a Peptidoglycan Hydrolase in Lactobacillus delbrueckiisubsp. Bulgaricus // Journal of Dairy Science. - 2003. – V. 86. – P. 96–104

11 Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S. Genes and molecules of Lactobacillus supporting probiotic action // Microbiol Mol Biol Rev. - 2008. – V. 72. – P. 728-764.

12 G. Buist, G. Venema, and J. Kok. Autolysis of Lactococcus lactis Is Influenced by Proteolysis. // Journal of Bacteriology. – 1998. - 5947–5953 Vol. 180, No. 22

13 Yan F., Polk D.B. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V. 277. – P. 50959–50965.

14 Bäuerl C., Pérez-Martínez G., Yan F., Polk D.B., Monedero V. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from Lactobacillus casei BL23 // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V.19. – P.231–241.