

5. Rothschild M., Jacobson C., Vaske D. et al. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1996. – **93**. – P. 201–205.
6. Matousek V., Kernerova N., Kolarikova O. et al. Effect of RYR1 and ESR genotypes on the fertility of sows of Large White breed in elite herds // Czech. J. Anim. Sci. – 2003. – **48**, No 3. – P. 129–133.
7. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M. et al. Rapid and simple method of purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. – 1990. – **28**, No 3. – P. 495–503.

Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК  
Національного аграрного університету, Київ  
ННІ охорони природи і біотехнологій  
Національного аграрного університету, Київ

Надійшло до редакції 29.11.2007

УДК 579.861.2

© 2008

Г. М. Олешко, Г. А. Любченко

## Поверхневі білки-адгезини стафілококів та їх амінокислотні послідовності

(Представлено академіком НАН України Д. М. Гродзинським)

*The Staphylococcus aureus infection remains a problem of today's time. Adhesion of the cells of bacteria to fabrics of the owner is an initial critical step in the pathogenic process. On the literary data, the important role in adhesion of S. aureus is played by surface adherence proteins. The purpose of our work was to perform the analysis of aminoacides of the surface adherence proteins received by us from strain Wood-46(2351) and to compare the obtained data with the literary ones. As a result of the analysis, we note two different pairs: methionine-cysteine and glutamine-asparagine. These amino acids can influence the adhesion properties of S. aureus and can be a stimulus for the formation of the immune answer.*

Протягом останніх десятиріч проблема захворювань стафілококової етіології залишається актуальною у зв'язку з їх широким поширенням. Стафілококова інфекція і в теперішній час охоплює 15–45% всього населення України. Значну роль у розповсюдженні золотистого стафілокока відіграють характерні для нього компоненти захисту та фактори патогенності, через які дослідження поширення стафілококів в організмі ускладнюється [1]. *Staphylococcus aureus* продукує поверхневі білки, серед яких найбільшу увагу привертають білки-адгезини. Відомо [1, 2], що важливу роль у колонізації, проникненні та адгезії відіграють поверхневі білкові антигени стафілокока. Адгезія — це один з ключових моментів розповсюдження клітин бактерій у патогенному процесі. На даний час увага дослідників зосереджена на з'ясуванні амінокислотних послідовностей поверхневих білків-адгезинів. На сьогодні існують дані щодо амінокислотних послідовностей поверхневих білків з родини Ear-білків.

Після узагальнення досліджень [2–4] встановлено, що білки, які виділено з різних штамів *S. aureus*, мають подібні, але не ідентичні характеристики. Так, із *S. aureus* штаму Newman виділено Ear (extracellular adherence protein — позаклітинний адгезивний білок) [4]. Мар-білок (Major histocompatibility complex class II analog protein — аналог білків II класу

головного комплексу гітосумісності) виділено зі штаму FDA-574, а p70 (70 кD protein — 70 кДа-білок) — зі штаму Wood-46 [2, 5].

Амінокислотна послідовність Ear-білка *S. aureus* Newman (за даними [4]):

/translation = “HVPYAITVNGTSQNILSSLTFNKNQNISYKDLEDRVKSVLKSD  
RGISDIDLRLSKQAKYTVYFKNGTKKVIDLKAGIYTADLINTSE  
IKAININVDTKKQVEDKKKDKANYQVPYTITVSGTSQNILSNL  
TFNKNQNISYKDLEDKVKSVLESNRGITDVDLRLSKQAKYTV  
NFKNGTKKVIDLKSGIYTANLINSSDIKSININVDTKKHIENKA  
KRNYQVPYSINLNGTSTNILSNLSFSNKPWTNYKNLTSQIKSVL  
KHDRGISEQDLKYAKKAYYTVYFKNGGKRILQLNSKNYTANL  
VHAKDVKRIEITVKTGTAKADRYVPYTIAVNGTSTPILSDLK  
FTGDPVGVYKDISKKVKSVLKHDRGIGERELKYAKKATYTVH  
FKPYTIAVNGTSTNGTKKVININSNISQLNLLYVQDIKKIDIV  
KTGTAKAKADSYVPILSKLKISNKQLISHKYLNDKVKSVLKSERG  
ISDLDLKFAKQAKYTVYFKNGGKQVNLKSDIFTPNLFSAKDIK  
KIDIDVKQYTKSKKNK”

Амінокислотна послідовність Map-білка *S. aureus* FDA-574 (за даними [2]):

/translation = “MKFKSLITTTALGVIASTGANLDTNEASAAAKQIDKSSSSLHH  
GYSKIQIPYTITVNGTSQNILSSLTFNKNQQISYKDIENKVKSVLY  
FNRGISDIDLRLSKQAKYTVHFKNGTKRVDLKGITADLINT  
SDIKAISVNVDTKKQVKDKAKANVQVPYTITVNGTSQNILSN  
LTFKKNQQISYKDLENNVKSVLKSNRGITDVDLRLSKQAKFTV  
NFKNGTKKVIDLKAGIYTANLINTGGIKNININVETKKQAKDK  
EAKVNNQVPYSINLNGTTTNIQSNLAFSNKPWTNYKNLTTKV  
KSVLKSDRGVSERDLKHAKKAYYTVYFKNGGKRVIHLSNIYT  
ANLVHAKDVKRIEITVKTVSKVKAERYVPYTIAVNGASNPTLS  
DLKFTGDSRVSYSDIKKVKSVLKHDRGIGERELKYAEKATYT  
VHFKNGTKKVINLNSNISQLNLLYVKDIKNIDIDVKTGAKAKVY  
SYVPYTIAVNGTTTPIASKLKLNSKQLIGYQDLNKKVKSVLKHD  
RGINDIELKFAKQAKYTIHFKNGKTQVVDLKSDFTRNLFSVKD  
IKKIDINVKQQSKSNKALNKVTNKATKVKFPVTINGFSNLVSNE  
FAFLPHKITTTNDLNAKLRLALRSDQGITKHDIGLSERTVYKVY  
FKDGSSKLEDLKAQKQDSKVFKATDIKKVDIEIKF”

Амінокислотна послідовність p70-білка *S. aureus* штаму Wood-46 (за даними [5]):

/translation = “AAKPLDKSSSTLHHGHSNTQIPYTITVNGTSQNILSSLTFNKNQ  
NISYKDIENKVKSVLYFNRGISDIDLRLSKQAEYTVHFKNGTKR  
VIDLKSGTYTADLINTSDIKAISVNVDTKKQPKDKAKANVQVP  
YTITVNGTSQNILSNLTFNKNQNISYKDLEDRVKS SVLESNRGITD  
VDLRLSKQAKYTVNFKNGTKKVIDLKAGIYTANLINSSDIKSIN  
INVDTKKHIENKAKRNYQVPYSINLNGTSTNILSNLSFSNKPWT  
NYKNLTSQIKSVLKHDRGISEQDLKYAKKAYYTVYFKNGGKRI  
LQLNSKNYTANLVHVKDVKRIEITVKTGTAKADRYVPYTIAV  
NGTSTPILSDLKFTGDPVGVYKDKITKKVKSVLKHDRGIGEREL  
KYAKKATYTVHFKNGGKVINLNSKISQLNLLYVQDIKKIDIV

KTGSKAKADSYVPYTIAVNGTSTPILSKLKISNKQLISYKYLND  
KVKSVLKNERGISDLDLKFAKQAKYTVYFKNGKKQVVNLKSDI  
FTPNLFSAKDIKKIDIDVKTGSKAKADSYVPYTIAVNGTSTPIL  
SKLKISNKQLISYKYLNDKVKSVLKSERGISDLHLKFAKQAKYTV  
YFKNGKKQVVNLKSDIFTPNLFSAKDIKKIDIDVKQYTKSKKNK”

Метою нашого дослідження було здійснити амінокислотний аналіз і порівняти отримані результати з даними літератури відносно виділеного нами зі *S. aureus* штаму Wood-46(2351) поверхневого білка-адгезину р70.

**Матеріали і методи.** Комбінацією декількох методів нами отримано та очищено [6] поверхневий білок-адгезин р70, для якого проведено амінокислотний аналіз у співробітництві з лабораторією хроматографії Інституту біохімії ім. О.В. Паладіна. Для вивчення амінокислотного складу білків використовують кислотний, лужний або ферментативний гідроліз. Нами застосовано кислотний гідроліз.

Аналіз поверхневого білка-адгезину р70 проводили на автоматичному аналізаторі амінокислот Т339 („Мікротехна”, Чехія) [7]. Для цього застосовано метод гідролізу соляною кислотою [8]. Після підготування зразків їх розміщували на дно пробірки з пірексу по 1 мл зразка. Додавали 1 мл концентрованої соляної кислоти та 5 мл 6 N соляної кислоти. Пробірку охолоджували в рідкому азоті. Після замерзання вмісту пробірки з неї відкачували повітря за допомогою вакуумного насоса для запобігання окислюванню амінокислот у результаті гідролізу. Потім пробірки запаювали та витримували в термостаті при постійній температурі 106 °С протягом 24 год. Після закінчення гідролізу пробірки охолоджували до кімнатної температури і розпаювали. Вміст пробірок переносили в скляний бюкс і проводили випарювання соляної кислоти на водяній бані. Після висушування зразків у бюкс додавали 3–4 мл деіонізованої води і повторювали процедуру висушування. Підготовлені у такий спосіб зразки розчиняли у 0,3 N літій цитратному буфері (рН 2,2) і наносили на іонообмінну колонку аналізатора амінокислот.

Для реєстрації амінокислот у елюатах використовували метод детекції нінгідридом. Нінгідрин взаємодіє з амінокислотою по аміногрупі, що дає кольорову реакцію, яка реєструється фотоколориметрично при  $\lambda = 560$  нм [9–11].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Амінокислотний аналіз отриманого нами білка р70 зі штаму Wood-46(2351) показав, що у його складі присутні 17 амінокислот: лізин, гістидин, аргінін, аспарагінова кислота, треонін, серин, глутамінова кислота, пролін, гліцин, аланін, цистин, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, тирозин, фенілаланін. У переважаючій кількості міститься лізин (127,750 мг) та глутамінова кислота (123,584 мг), а в слідовій кількості — цистин (0,500 мг) (табл. 1, рис. 1).

Аналіз біохімічних властивостей амінокислот, що входять до складу білка р70, проводили, використовуючи сучасну раціональну класифікацію амінокислот, засновану на полярності радикалів (R-груп), за якою розрізняють п’ять класів амінокислот, що містять такі радикали: 1) неполярні (гідрофобні), 2) полярні (гідрофільні), 3) ароматичні (більшість неполярні), 4) від’ємно заряджені, 5) позитивно заряджені [10, 11]. У табл. 2 зведено дані по амінокислотах згідно з даною класифікацією. Підсумовуючи проаналізовані результати, відзначимо, що амінокислотному складу білка р70 притаманна перевага нейтральних гідрофобних амінокислот — 47,06%. Вміст нейтральних гідрофільних амінокислот становить 23,53%, а кислих іоногенних амінокислот — 11,76%. Кількість позитивно та від’ємно заряджених амінокислот дорівнює 17,64 та 11,76% відповідно.

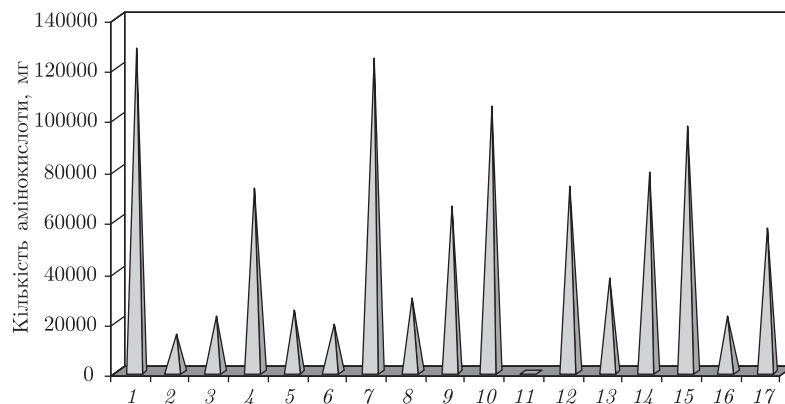


Рис. 1. Кількість амінокислот в очищеному білку p70, виділеному з *Staphylococcus aureus* Wood-46(2351). 1 — лізин; 2 — гістидин; 3 — аргінін; 4 — аспарагінова кислота; 5 — треонін; 6 — серин; 7 — глутамінова кислота; 8 — пролін; 9 — гліцин; 10 — аланін; 11 — цистин; 12 — валін; 13 — метіонін; 14 — ізолейцин; 15 — лейцин; 16 — тирозин; 17 — фенілаланін

Оскільки порівняльний аналіз послідовностей та структур споріднених білків дозволяє виявляти набори можливих заміни амінокислот та оцінювати вплив мутацій на структуру і функцію білка, нами було приділено увагу амінокислотному складу спорідненого білка з молекулярною масою 70 кДа, виділеного зі штаму Wood-46 M. Hussain, K. Becker, C. von Eiff [5]. Порівняльний аналіз проводили відносно виділеного нами білка p70 із штаму Wood-46 (2351), який було отримано із Чехословацької колекції мікроорганізмів. Амінокислотний склад порівнюваних білків був подібний на 98%, але не ідентичний. Відмінності у складі відмічались по двох амінокислотах. Білку, отриманому нами, притаманні такі амінокислоти, як цистин (0,05% мкмоль) та метіонін (3,07% мкмоль). У складі білка, отри-

Таблиця 1. Амінокислотний аналіз очищеного білка-адгезину p70, виділеного зі *Staphylococcus aureus* Wood-46(2351)

Амінокислота	Вміст амінокислоти			
	мкмоль	мг	% за мкмоль	% за мг
Лізин	875,000	127,750	10,92	12,91
Гістидин	96,154	14,904	1,20	1,51
Аргінін	128,378	22,338	1,60	2,26
Аспарагінова кислота	543,478	72,283	6,78	7,30
Треонін	206,897	24,621	2,58	2,49
Серин	177,305	18,617	2,21	1,88
Глутамінова кислота	840,708	123,584	10,49	12,49
Пролін	250,000	28,750	3,12	2,90
Гліцин	867,347	65,051	10,82	6,57
Аланін	1177,083	104,760	14,69	10,58
Цистин	4,167	0,500	0,05	0,05
Валін	621,875	72,759	7,76	7,35
Метіонін	245,935	36,644	3,07	3,70
Ізолейцин	601,449	78,790	7,50	7,96
Лейцин	740,625	97,022	9,24	9,80
Тирозин	119,650	21,657	1,49	2,19
Фенілаланін	341,495	56,347	4,26	5,69
Сума	8014,469	989,730		

Таблиця 2. Класифікація амінокислот білка р70 зі *Staphylococcus aureus* Wood-46(2351)

Назва амінокислоти	Клас амінокислот					
	Нейтральні гідрофобні	Нейтральні гідрофільні	Кислі	Основні	Позитивно заряджені	Від'ємно заряджені
Лізин				+	+	
Гістидин				+	+	
Аргінін				+	+	
Аспарагінова кислота			+			+
Треонін		+				
Серин		+				
Глютамінова кислота			+			+
Пролін	+					
Гліцин		+				
Аланін	+					
Цистин	+					
Валін	+					
Метіонін	+					
Ізолейцин	+					
Лейцин	+					
Тирозин		+				
Фенілаланін	+					

маного М. Hussain зі співавт. [5], ці амінокислоти відсутні, але присутні дві інші амінокислоти — це глютамін (3,35%) та аспарагін (7,61%). Тобто амінокислотний склад білків, які ми порівнювали, відрізняється за вмістом нейтральних амінокислот [10, 11]. Нами також проаналізовано властивості саме цих відмінних амінокислот. Цистин, метіонін, аспарагін та глютамін належать до полярних незаряджених амінокислот [9], але метіонін та цистин — це й до сірковмісних амінокислот. Одна із основних функцій цистину — утворювати вторинну структуру білків за рахунок утворення дисульфідних зв'язків між різними частинами поліпептидного ланцюга. Також його характерною особливістю є здатність до самовільного окислення у складі молекули білка [9]. Оскільки цистин може містити сірку, він здатний зв'язувати важкі метали, наприклад мідь, кадмій, ртуть. Метіонін відіграє важливу роль у метилюванні і бере участь в утворенні нуклеїнової кислоти. Аспарагін є сировиною для утворення аспарагінової кислоти, що бере участь в роботі імунної системи та синтезі ДНК і РНК. Глютамін дуже важливий для перенесення енергії, що може бути задіяна в імунореактивності. У процесах катаболізму глютамін є незамінною амінокислотою, оскільки підтримує синтез білка та стабілізує рівень рідини у клітинах [9–11].

Підсумовуючи отримані результати, відзначимо також, що вищезгадані амінокислоти можуть впливати на адгезивні властивості *S. aureus* та брати участь в індукції імунної відповіді [9–13].

Таким чином, нами зі *S. aureus* штаму Wood-46(2351) комбінацією декількох методів виділено та очищено поверхневий білок з молекулярною масою 70 кДа, для якого встановлено особливості якісного та кількісного амінокислотного складу відносно білка адгезину р70.

1. Олешко Г. М., Любченко Г. А. Біохімічні складові та імунобіологічна активність факторів патогенності стафілококів // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 20–28.
2. Jonsson K., McDevitt D., McGavin M. H. et al. *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog // J. Biol. Chem. – 1999. – **270**, No 37. – P. 21457–21460.
3. Lawrence Y., Lee J. C., Yuko J. et al. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses // J. Clin. Invest. – 2002. – **110**, No 10. – P. 1461–1471.

4. Peacock S. J., Moore C. E., Justice A. et al. Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus* // Infect. and Immun. – 2002. – 70, No 9. – P. 4987–4996.
5. Hussain M., Becker K., Eiff C. Analogs of Eap protein are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2001. – 8, No 6. – P. 1271–1276.
6. Олешко Г. М., Любченко Г. А. Адгезивні властивості поверхневого білка стафілококів // Доп. НАН України. – 2006. – № 12. – С. 158–161.
7. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Под ред. Ю. А. Овчинникова. – Москва: Мир, 1974. – 420 с.
8. Козаренко Т. Д. Ионообменная хроматография аминокислот. – Новосибирск: Наука, 1975. – 230 с.
9. Химическая энциклопедия. Большая российская энциклопедия. – Москва: Мир, 1998. – Т. 1–5.
10. Якубку Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. – Москва: Мир, 1985. – 456 с.
11. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509 с.
12. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней / Под ред. В. И. Покровского. – Москва: Медицина, 1993. – Т. 2. – 463 с.
13. Harraghy N., Hussain M., Haggan A. et al. The adhesive and immunomodulating properties of the multi-functional *Staphylococcus aureus* protein Eap // Microbiology. – 2003. – 149. – P. 2701–2707.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 19.06.2007

УДК 616.94-02.617-089

© 2008

В. В. Позур, Л. М. Сківка, Г. П. Потебня

## Вплив пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 на киснезалежний метаболізм макрофагів і нейтрофілів

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

*The effect of peptidoglycan from Staphylococcus aureus Wood 46 on the cytotoxic activity of macrophages and neutrophils is investigated. It is shown that bacterial peptidoglycan increases spontaneous and stimulated TPA (respiratory burst) in both populations of phagocytes. More sensible to murein is neutrophil. The action of peptidoglycan from S. aureus Wood 46 on the metabolism of these cells is dose-dependent with maximal stimulating effect at the addition of 10 mkg/ml of peptidoglycan in combination with TPA.*

Цитотоксична дія, заснована на продукції активних форм кисню, властива широкому спектру клітин організму, серед яких особливе значення належить макрофагам і нейтрофілам. Незважаючи на те що як макрофаги, так і нейтрофіли є ефекторами природної резистентності, їх функції в імунній системі відрізняються. Макрофаги локалізовані переважно в тканинах [1–3]. У системі мононуклеарних фагоцитів макрофаги виконують функцію санітарів організму: розпізнають, поглинають і знешкоджують або лізують різні чужорідні агенти, а також власні клітини зі зміненими поверхневоклітинними молекулами, наприклад, у результаті загибелі їх шляхом апоптозу [4]. Популяція гранулоцитів, до якої входять нейтрофіли, є найбільшою (50–70%) субпопуляцією лейкоцитів крові. Першочерговою функцією нейтрофілів є генерація запалення. Саме вони першими локалізуються в місці мікробної