

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Биолого-почвенный факультет

Кафедра микробиологии

РЕГУЛЯЦИЯ СЕКРЕЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ГИДРОЛАЗ БАЦИЛЛ

Учебное пособие

по курсу

«Регуляция клеточного метаболизма бактерий»

Казань

2008

Печатается по решению
учебно-методической комиссии
биолого-почвенного факультета КГУ

Составитель: профессор кафедры микробиологии, д.б.н. М.Р. Шарипова

Рецензент: профессор, д.б.н. Т.В.Багаева

Регуляция секреции внеклеточных гидролаз бацилл: Учебное пособие
/М.Р. Шарипова./ - Казань: Казанский государственный университет,
2008. – 22 с.

Пособие предназначено для студентов и аспирантов, обучающихся по специальностям: Регуляция клеточного метаболизма, Геномика, Молекулярная генетика, Биохимия микроорганизмов, Генная инженерия.

© Шарипова М.Р., 2008

Актуальность проблемы регуляции секреции у бактерий. Бациллы выделяют существенно больше внеклеточных белков, чем другие микроорганизмы. Многие штаммы бацилл используются в промышленности для получения амилаз и протеиназ, объем продукции которых составляет до 1000 т в год. Это объясняется тем, что эти микроорганизмы секретируют белки в культуральную жидкость, что существенно упрощает способ их получения. Культивирование бактерий основано на доступных и дешевых питательных средах. Известна полная последовательность генома этих микроорганизмов, имеется широкий выбор генно-инженерных и биотехнологических методов для решения многих задач. Тем не менее, практика показала, что рекомбинантные штаммы секретируют гетерологичные белки эукариотического происхождения неэффективно, что ограничивает использование потенциала этих микроорганизмов. Одна из причин может быть связана с трудностями на поздних стадиях экспорта полипептидов, что приводит к несбалансированности процессов трансляции и транслокации и в конечном итоге - к накоплению неактивных предшественников, которые не могут принять конечную конформацию и расщепляются клеточными протеиназами. За последние годы у *B. subtilis* идентифицированы узкие места в белковой секреции, которые связаны как с механизмом экспорта, так и со свойствами секретируемых полипептидов. Гетерологичные белки могут формировать нерастворимые комплексы в цитоплазме в связи с отсутствием активности соответствующих шаперонов. Ограничивающим фактором в секреции может стать некорректный процессинг предшественника гетерологичного белка. Специфические фолдинговые шапероны *B. subtilis* (PrsA и др.), связанные с наружной стороной мембраны, могут ограничивать секрецию некоторых гетерологичных белков. Клеточная стенка бацилл может быть барьером для выхода эукариотических белков. В некоторых случаях низкий выход белка может быть связан с его чувствительностью к протеиназам бацилл, которые в большом количестве секретируются бактериями в культуральную жидкость и остаются связанными с поверхностью клетки. В учебном пособии обобщены данные о поздних

стадиях белковой секреции бацилл - освобождением белков с мембраны и транслокацией через клеточную стенку в среду.

Постановка цели. Анализируются данные об экзогенных эффекторах, включая молекулярные шапероны, которые могут способствовать скручиванию полипептидов на поздних стадиях секреции у бацилл, а также о роли структурных компонентов клеточной стенки грамположительных бактерий в секреции белков, о необходимости сохранения секреторной функции для нормального развития процесса споруляции у этих бактерий. При универсальности механизма транслокации белка через цитоплазматическую мембрану у грамотрицательных и грамположительных бактерий, пути секреции белков после освобождения с мембраны в среду различны, что связано с различием в строении клеточной оболочки. У бацилл белки подвергаются пост-трансляционным модификациям при прохождении через клеточную стенку в среду, т. е. основные отличия в секреции белков у бактерий связаны именно с поздними стадиями в экспорте полипептидов.

Становится очевидным, что зависимость эффективности секреции от свойств секретлируемого белка связана также с поздними стадиями экспорта. Это установлено при сравнительном исследовании секреции бактериями *B. subtilis* четырех гетерологичных белков: α -амилазы *Bacillus licheniformis* (AmyL) (КФ 3.2.1.1, 55 кДа), β -лактамазы *Escherichia coli* (Bla) (КФ 3.5.2.6, 30 кДа), α -амилазы из поджелудочной железы человека (HPA) (КФ 3.2.1.1, 50 кДа), одноцепочечного антитела против лизоцима (SCA-Lys). Секреция этих белков изучалась в одинаковых условиях экспрессии под одним и тем же сигнальным пептидом. Эксперименты с использованием радиоактивной метки, флуоресцентных методов и иммуноблоттинга показали, что все гетерологичные белки нормально транслоцируются через цитоплазматическую мембрану *B. subtilis*, а эффективность экспрессии определяют стадии, следующие за транслокацией. Узким местом в секреции β -лактамазы *E. coli*, α -амилазы *B. licheniformis* и белка SCA-Lys является процессинг, прохождение через клеточную стенку и протеолиз. Амилаза из поджелудочной железы человека

после транслокации через мембрану накапливалась в клеточной стенке ввиду полного отсутствия фолдинга белка. Зрелая конформация молекулы является результатом формирования трех дисульфидных связей. Авторы показали, что оксидоредуктазы *B. subtilis*, которые необходимы для эффективной секреции белков с дисульфидными связями, не способны корректно провести этот процесс в отношении НРА-белка. Наиболее важный результат этих исследований - необходимость выявления узких мест в секреции гетерологичных белков и их коррекция посредством генно-инженерных методов в штаммах-хозяевах.

Транслокация через мембрану. Секретируемые белки переносятся через цитоплазматическую мембрану бацилл с помощью препротейн транслоказы, в формировании которой участвуют интегральные мембранные белки: SecY, SecE, SecG, и SecDF. В инициации транслокации ключевую роль играет периферический мембранный белок SecA, специфически взаимодействующий с сигнальной последовательностью. SecA-белок является АТФазой, его активность стимулируется высокоаффинным взаимодействием с предшественниками секретируемых белков. Анализ секреции левансахаразы (КФ 2.4.1.10, 50 кДа) и α -амилазы (КФ 3.2.1.1, 68 кДа) *B. subtilis* в период экспоненциального роста в условиях, когда варьирует уровень SecA-белка в клетке, показал различие в связывании предшественников этих белков с SecA. Секреция левансахаразы коррелировала с клеточным уровнем SecA-белка, секреция α -амилазы повышалась в условиях сильного истощения клеток по SecA-белку. Сделано заключение, что различие в секреции белков в ответ на изменение количества SecA соответствует различию в сродстве соответствующих предшественников к SecA-белку. В клетках *E. coli* предшественники экзобелков стабилизируются в состоянии, компетентном для транслокации, при участии анфолдазы SecB, гомолог которой не обнаружен у *B. subtilis* после анализа полной последовательности генома этих микроорганизмов. Функцию шаперонов у бацилл может выполнять структурный домен предшественника, называемый пропептидом и

расположенный между сигнальным пептидом и последовательностью, соответствующей зрелому белку, а также такие специфические факторы цитоплазмы как рН, концентрация ионов металлов и т. д.

Этот факт указывает на значимость информации, которая заключена в последовательности предшественника, включая участки в структуре зрелого полипептида. Так, на примере щелочной фосфатазы *E. coli* (КФ 3.1.3.1, 80 кДа) показано, что эффективность секреции мутантных белков с заменами аминокислот в N-концевой области зрелой полипептидной цепи снижается тем больше, чем ближе к сигнальному пептиду расположена замена.

В процессинг секретируемых белков *B. subtilis* вовлечены две сигнальные пептидазы I типа (SipS и SipT), которые отщепляют сигнальные пептиды пробелков, и одна сигнальная пептидаза II типа (Lsp), которая отщепляет сигнальный пептид пролипопротеина. Идентифицирована сигнальная пептидаза SipW, необходимая для процессинга спороспецифичного TasA-белка. У бацилл обнаружены еще две сигнальные пептидазы - SipU и SipV, они синтезируются конститутивно на низком уровне на всех фазах роста.

Транскрипция SipS контролируется двухкомпонентной регуляторной системой DegS–DegU, а значит, экспрессия SipS регулируется теми же факторами, которые контролируют экспрессию большинства генов секретируемых гидролаз *B. subtilis*. В отличие от сигнальной пептидазы *E. coli* отсутствие SipS не является критическим для секреции белка и выживания *B. subtilis*. Снижается скорость процессинга ряда экзобелков, а скорость процессинга α -амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* (КФ 3.2.1.1, 50 кДа) и двух пока неидентифицированных белков, наоборот, повышается. Таким образом, субстратная специфичность сигнальной пептидазы, от которой зависит скорость процессинга сигнального пептида, является одним из определяющих факторов эффективной белковой секреции у бацилл.

После процессинга предшественника сигнальные пептиды расщепляются в мембране или цитоплазме. Олигопептиды, образующиеся в результате расщепления, могут иметь сигнальную функцию. Эти данные свидетельствуют

о важной роли пептидаз, которые участвуют в гидролизе сигнальных пептидов. Было установлено, что бактерии *B. subtilis* имеют два гена, кодирующих белки SppA и TerA, гомологичные пептидазе A, гидролизующей сигнальные пептиды у *E. coli*. Если основываться на гомологии известным протеиназам, то вполне вероятно, что пептидазы TerA и SppA необходимы для специфической деградации сигнальных пептидов, фрагменты гидролиза которых вызывают сдерживание белковой транслокации. Было показано, что SppA является интегральным мембранным белком *B. subtilis*, TerA-белок локализован в цитоплазме. Утрата обоих ферментов имеет сильный эффект на мембранную транслокацию предшественников внеклеточных белков у бацилл.

Влияние экзогенных эффекторов на секрецию белков. Секретируемые белки принимают зрелую конформацию на наружной стороне цитоплазматической мембраны. Кинетика белкового фолдинга играет значительную роль на этапе освобождения белков в среду. В экспериментах с импульсным мечением показано, что скорость транслокации белков через клеточную стенку коррелирует со скоростью фолдинга соответствующих полипептидов и независима от размера их молекул.

У *E. coli* эффекторы, сдерживающие фолдинг белка (анфолдазы), идентифицированы в цитоплазме. Они сохраняют белок в статусе, компетентном для экспорта. Эффекторы, локализованные на наружной стороне цитоплазматической мембраны *B. subtilis*, помогают на этапе свертывания белка до нативной конформации и приводят к необратимой транслокации. Природа фолдинговых эффекторов разнообразна.

PrsA-белок. Одну из подгрупп эффекторов бацилл составляют специфические белки - фолдазы, способствующие формированию третичной и даже четвертичной структур секретируемых белков: VdbB, VdbC, VlaP и PrsA. Мембраносвязанный липопротеин PrsA является пептидил-пролил-*цис-/транс-*изомеразой (КФ 5.2.1.8), белковый домен которой локализован с наружной стороны мембраны и обращен к клеточной стенке. PrsA- липопротеин

активируется в клетках во время посттрансляционной фазы секреции и необходим для многих, но не всех секретиромемых белков.

Мембраносвязанный липопротеин PrsA функционирует как цитоплазматический шаперон в фолдинге секретиромемых белков после их транслокации через мембрану. Увеличение уровня синтеза PrsA-липопротеина при использовании мульткопийной плазмиды в клетках *B. subtilis* приводило к повышению выхода в среду α -амилаз и протеиназ в 2-6 раз. В штаммах *B. subtilis*, дефектных по PrsA, накопление внеклеточных белков, включая α -амилазу и субтилизин (КФ 3.4.21.62, 27,5 кДа), резко снижается. При изучении индуцибельной экспрессии химерного белка субтилизин–щелочная фосфатаза в PrsA3-мутантах *B. subtilis* была обнаружена полная потеря его активности. Авторы сделали заключение, что PrsA-липопротеин *in vivo* выполняет функцию шаперона на поздних стадиях секреции у бацилл, а именно, при формировании зрелой конформации на этапе освобождения различных экзобелков в среду. Установлена прямая зависимость между количеством молекул PrsA в клетках *B. subtilis* дикого типа – ($2 \cdot 10^4$), и числом секретиромемых белковых молекул α -амилазы. Резкое снижение количества PrsA-белка в клетках *B. subtilis* приводит к изменению клеточной морфологии, а затем и к гибели клеток. Факт, что PrsA-подобные белки не обнаружены у *E. coli*, поднимает вопрос о функционировании этих липопротеинов в качестве специфических шаперонов в клеточной стенке грамположительных бактерий.

Компьютерный анализ показал, что *B. subtilis* содержит около 300 генов, которые кодируют секретиромемые белки, содержащие N-концевой сигнальный пептид, 114 из них являются липопротеинами, связанными с цитоплазматической мембраной. Значимость липопротеинов для клеточного гомеостаза *B. subtilis* установлена с помощью мутантов, дефектных по сигнальной пептидазе II. Показано, что процессинг липопротеина PrsA существенен для выживания клеток *B. subtilis* при низких и высоких температурах (но не для роста этих бактерий при 37°), развития состояния компетентности клеток, для нормального протекания процессов споруляции и

последующего прорастания споры. Клетки, утратившие сигнальную пептидазу II, накапливали липид-модифицированный предшественник PrsA с низкой активностью. В таких мутантах секреция α -амилазы была сильно нарушена. Неожиданным для бацилл оказался факт отсутствия альтернативного процессинга липопротеина, который должен осуществляться посредством сигнальных пептидаз I типа. Охарактеризован *lgt*-ген *B. subtilis*, ответственный за липомодификацию липопротеинов. *lgt*-Мутанты жизнеспособны. Немодифицированные формы липопротеинов PrsA и VlaP функционально активны, но теряют способность связываться с мембраной и освобождались в культуральную жидкость. Это приводило к снижению общего количества липопротеинов, связанных с клеткой. Низкий уровень липопротеина PrsA вызывал нарушения в белковой секреции и описан как фенотип *lgt*-мутантов.

Катионы металлов. Другую группу экзогенных фолдинговых эффекторов бацилл представляют катионы металлов. Мембрана *B. subtilis* окружена толстой клеточной стенкой (от 10 до 50 нм) из гетерополимерного матрикса, состоящего из пептидогликана и тейхоевых кислот. За счет карбоксильных групп пептидогликана и фосфатных групп тейхоевых кислот клеточная стенка *B. subtilis* имеет анионную природу и характеризуется высокой способностью к иммобилизации положительно заряженных катионов металлов - Ca^{2+} , Fe^{3+} и др. Секретируемые белки по мере экспорта в культуральную жидкость должны пересечь клеточную стенку как заключительную стадию секреции, принимая зрелую конформацию до момента выхода в культуральную жидкость.

Было высказано предположение, что разница в концентрации ионов металлов (Fe^{3+} и Ca^{2+}), возникающая между внутренней и наружной сторонами цитоплазматической мембраны бацилл, вызывает фолдинговую реакцию тех секретируемых полипептидов, которые имеют металлсвязывающие сайты в зрелой структуре. Скорость и эффективность фолдинга за счет катионов металлов являются критическими для продукции этих белков. Белковая транслокация в этом случае соответствует химической асимметрии

определенного эффектора между *цис*- и *транс*- сторонами мембраны и является результатом сопряжения двух процессов: фолдинга белка и его транслокации через цитоплазматическую мембрану.

Ca^{2+} -Зависимые сайты идентифицированы в третичной и четвертичной структурах многих секретируемых белков бацилл. Так, субтилизин BPN' (или Карлсберг) (КФ 3.4.21.62, 27,5 кДа) обладает двумя различными Ca^{2+} -зависимыми сайтами: один из них имеет высокое сродство к ионам Ca^{2+} ($K_a 10^8 \text{ M}^{-1}$), другой – низкое ($K_a 32 \text{ M}^{-1}$). Второй сайт может связывать Ca^{2+} только в Ca^{2+} -обогащенной среде (>40 мМ), которая почти никогда не встречается в природе. Таким образом, сайты с низкой аффинностью могут быть вовлечены в секрецию лишь тогда, когда белки находятся в слое клеточной стенки, которая характеризуется высокой концентрацией по ионам Ca^{2+} . Тот факт, что Ca^{2+} не является свободным, а иммобилизован полимерами клеточной стенки, может быть благоприятным для конформационного перехода белковой молекулы в силу более высокого сродства связанного кальция к секретируемым белкам. Такая секреция осуществляется по пути шаперон-независимого экспорта.

Первой моделью таких исследований была внеклеточная левансахараза *B. subtilis* (SacB). Ген белка не содержит последовательности, кодирующей пропептидную область между сигнальным пептидом и зрелой структурой, которая функционирует как эндогенный шаперон. Ca^{2+} -Связывающий сайт с низким сродством ($K_a 0,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, pH 7) был идентифицирован в зрелой структуре левансахаразы. Аминокислотная замена в этом участке Thr263Ile приводила к изменению аффинности белка в отношении ионов Ca^{2+} и снижению эффективности секреции полипептида. Авторы изучили способность клеточной стенки *B. subtilis* концентрировать экзогенные ионы Ca^{2+} . Степень концентрирования составила 100-120 раз, что обеспечивает высокое содержание ионов Ca^{2+} (>2 мМ) с наружной стороны мембраны. Такое микроокружение мембраны обеспечивает конформационный переход молекулы левансахаразы в процессе секреции и приводит к образованию зрелого

внеклеточного белка. Сделано заключение, что Ca^{2+} играет ключевую роль на последнем этапе секреции этого белка в среду.

Показано, что левансахараза *B. subtilis* секретируется в два этапа. Первый этап – протеолитическое отщепление N-концевой сигнальной последовательности с образованием мембраносвязанного фермента, второй этап, лимитирующий скорость секреции, – освобождение фермента с мембраны в среду, что сопряжено с конформационными изменениями белка.

Переход анфолдинг – фолдинг левансахаразы зависит от степени ионизации фермента. При выращивании *B. subtilis* в питательной среде при $\text{pH} < 6$ концентрация ионов H^+ на внешней стороне мембраны может в 200 раз превышать ту, что на внутренней стороне мембраны. Эффект транс мембранного ΔpH на секрецию белков у *B. subtilis* описан ранее, но механизм неясен. В настоящее время для левансахаразы *B. subtilis* показано, что ионы H^+ и Ca^{2+} вовлекаются в процесс свертывания белка, сопряженный с его секрецией. *In vitro* при 30° в отсутствие Ca^{2+} равновесие между состоянием анфолдинг – фолдинг белка быстро переходило в состояние завершеного фолдинга левансахаразы в результате смещения pH от 7,4 до 6,0. Ca^{2+} (>5 мМ) действовал как катализатор фолдинга белковой молекулы при $\text{pH} > 7$. Эксперименты с меткой *in vivo* при 30° показали, что в отсутствие Ca^{2+} скорость второго этапа секреции левансахаразы зависит от pH среды. В кислой среде (pH 5,8) секреция более эффективна. При $\text{pH} > 7$ присутствие Ca^{2+} существенно для секреции. При повышенной температуре (48°) оба фактора, низкие pH и концентрация Ca^{2+} были необходимы для эффективной секреции. Кроме того, модифицированная левансахараза с измененной аффинностью к Ca^{2+} (Thr263Ile) эффективно секретировалась в кислой среде, т. е. в Ca^{2+} -независимых условиях.

Таким образом, авторами показано, что концентрация внешних эффекторов (H^+ или Ca^{2+}), которая сохраняется между цис-/транс- сторонами цитоплазматической мембраны за счет свойств клеточной стенки бактерий, играет ключевую роль на поздних этапах секреции белка у бацилл.

Другим примером секреции является фермент внеклеточная α -амилаза *B. subtilis*. Путь секреции α -амилазы сходен с таковым для левансахаразы - оба включают отщепление сигнального пептида с образованием мембрано связанной формы и последующее высвобождение полипептида в среду, которое зависит от конформационной перестройки белковой молекулы.

При сравнении эффективности секреции этих белков штаммом *B. subtilis*, показано, что ферменты имеют различную аффинность к Ca^{2+} . Основное отличие в секреции α -амилазы и левансахаразы заключалось в кинетике процессов: скорость процессинга сигнального пептида была выше в случае α -амилазы, тогда как время освобождения α -амилазы в среду было в 2 раза больше, чем для левансахаразы. С помощью флуоресцентных методов исследования был обнаружен промежуточный продукт фолдинга на этапе освобождения α -амилазы *B. subtilis* с мембраны в среду. Он был неактивен, характеризовался относительной стабильностью и устойчивостью к протеиназам. Установлено, что термодинамически более выгодным является взаимодействие с помощью переноса катионов от лиганда к лиганду, например от тейхоевой кислоты к белку, чем связывание полностью гидратированных катионов из раствора. При переходе белковой молекулы в зрелую конформацию на промежуточных этапах было необходимо присутствие в среде ионов Ca^{2+} , хотя в конечном итоге металл не сохранялся ассоциированным со зрелой формой белка. Продукция мутантной α -амилазы *B. subtilis*, которая характеризовалась увеличением общего положительного заряда белковой глобулы, оказалась значительно ниже, чем для исходного штамма. Скорость фолдинга мутантного белка проявляла более выраженную зависимость от присутствия ионов Ca^{2+} в среде. Когда концентрация ионов Ca^{2+} в среде была увеличена, возрастала и продукция фермента. Чтобы определить влияние общего заряда белковой молекулы на поздние этапы секреции α -амилазы *B. licheniformis* использовали мутантные белки с pI 5 и 10 и нативный белок с pI 7. Физико-химические и энзиматические характеристики белков с измененным

зарядом были сохранены. Положительно заряженный белок взаимодействует с компонентами клеточной стенки, что влияет на его высвобождение в среду.

Таким образом, формирование нативной конформации секретлируемых белков происходит в наружных компартментах клеток бацилл и во многом определяется условиями среды, изменение которых приводит к образованию продуктов с незавершенным фолдингом, которые расщепляются протеиназами. Этот процесс, сопряженный с выходом белка в среду через матрикс клеточной стенки, является скоростью ограничивающим этапом секреции. Исключением являются случаи неконтролируемой секреции, когда в экспериментах использовали протопласты *B. subtilis* и разрушали ультраструктуру клеточной стенки. Это приводило к снижению секреции α -амилазы, что наблюдалось также в состоянии стрессов, при которых сверхэкспрессия стрессовых белков блокирует секрецию других полипептидов.

В Казанском университете мы исследовали секрецию в среду различных гидролитических ферментов *Bacillus intermedius*, которые существенно различаются по физико-химическим свойствам. Гуанилспецифичная рибонуклеаза (12,3 кДа) содержит большое количество гидрофобных аминокислот, что в отсутствие остатков цистеина обеспечивает высокую устойчивость фермента в широком диапазоне pH и температуры. Ионы Ca^{2+} участвуют в стабилизации субтилизиноподобной сериновой протеиназы (32,5 кДа). Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1, 46 кДа), в молекуле которой отсутствуют свободные SH-группы или S-S-связи, отличается лабильностью. По сравнению с РНКазой, стабильной в диапазоне pH 2-10 и устойчивой к нагреванию до 90°, протеиназа является относительно стабильным (pH 6,3-10,5; 10%-ная инактивация за 30 мин при 55°), а фосфатаза лабильным белком (pH 8-10; 60%-инактивация за 30 мин при 55°).

Показано совпадение динамики синтеза полиаденилированной мРНК в клетках *B. intermedius* и динамики синтеза внеклеточных ферментов (РНКазы и фосфатазы) на бесфосфорной среде, а также корреляция между накоплением поли(А)⁺РНК и синтезом щелочной протеиназы у этих бактерий.

Электрофоретический и иммунологический анализы продуктов, полученных после трансляции бактериальной поли(А)⁺РНК в ооцитах шпорцевой лягушки, позволили идентифицировать среди них изучаемые гидролазы. Таким образом, мРНК внеклеточных гидролитических ферментов *B. intermedius* полиаденилирована, вследствие чего увеличивается ее стабильность, способствующая сохранению высокого уровня синтеза гидролаз в фазах замедления и полной остановки роста культуры.

Полученные нами данные свидетельствуют о различии в локализации и секреции этих белков. Фосфатаза (70%) и протеиназа (~10%) обнаружены в каталитически активной форме в цитоплазматической мембране в отличие от РНКазы, которая практически полностью освобождается бактериями в культуральную жидкость (более 99%). Активная РНКаза обнаружена в клеточной стенке – менее 1% от секретируемого фермента. Иммуноблоттинг не показал присутствия РНКазы или ее промежуточных продуктов в мембранной фракции. В отличие от РНКазы секреция протеиназы и фосфатазы происходит по двухэтапному механизму с образованием активной мембраносвязанной формы. Была установлена необходимость участия ионов металлов (Co^{2+} и Ca^{2+}) в заключительном этапе секреции – при освобождении в среду фосфатазы и протеиназы. Катионы металлов не влияют на экспорт РНКазы. Был получен мутантный белок - рибонуклеаза с заменой аминокислот, которые участвуют в формировании элементов вторичной структуры зрелой молекулы. Так, замена аминокислоты Trp34Asn, участвующей в формировании α -спиральной структуры на N-конце молекулы рибонуклеазы, приводила к блокированию транслокации белка, но не препятствовала взаимодействию белка с мембраной. Сделано заключение, что эффективность секреции РНКазы зависит от скорости формирования элементов вторичной структуры в молекуле белка. Для РНКазы характерно самопроизвольное формирование активной конформации, которое реализуется после транслокации и процессинга. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что структурные свойства белков налагают отпечаток на пути их выхода из клеток бактерий в среду. Таким образом, на поздних

стадиях секреции экзобелков у бацилл могут быть реализованы различные механизмы освобождения полипептидов, которые определяются структурными особенностями секретируемых белков.

Нами обнаружены гидролазы, в частности протеиназы, которые секретируются бактериями на поздних стадиях спорообразования, соответствующих созреванию спор и автолизу спорангия. При изучении экспрессии гена субтилизина *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, дефектным по внеклеточным протеиназам, установлено, что характер кривой накопления фермента такой же, как в исходном штамме. Субтилизин секретируется в среду на стадии инициации спорообразования культуры, а максимальный уровень секреции субтилизина соответствует поздним стадиям споруляции. При этом мы наблюдали изменение физико-химических характеристик фермента, например незначительный сдвиг рН-оптимума протеиназы. Не исключено, что изменения в микросреде, где происходит активация фермента, влияют на этот процесс. При формировании споры происходят изменения в структуре клеточной стенки, приводящие к изменению состава и концентрации фолдинговых эффекторов. К ним можно отнести молекулярные шапероны, участвующие в созревании субтилизина, а также ионы Ca^{2+} , которые способны повлиять на формирование заключительной зрелой структурной конформации фермента.

Роль компонентов клеточной стенки на поздних стадиях секреции.

Следующим критическим фактором на заключительных стадиях секреции белков у бацилл является клеточная стенка. Она служит средой, где завершается экспорт белков и формируется их зрелая конформация. Клеточная стенка бацилл состоит из пептидогликана и ковалентно связанных с ним тейхоевых кислот. Свертывание белка *in vivo* в этой микроокружающей среде реализуется в сочетании с изменениями, которые происходят в этом компартменте во время транслокации. В вегетативных клетках бацилл клеточная стенка и тейхоевые кислоты содержат остатки D-аланина, количество которых в конечном итоге определяет плотность общего

отрицательного заряда клеточной поверхности. Свободные гидроксильные группы в молекулах тейхоевых кислот могут быть замещены остатками D-аланина, что уменьшает отрицательный заряд клеточной стенки и ее способность связывать катионы, необходимые в качестве кофакторов для посттрансляционного фолдинга белков. Эксперименты с меткой показали, что эффективность секреции экзобелков протопластами, которые образуются после удаления клеточной стенки, существенно ниже, чем неповрежденными клетками *B. subtilis*, т. е. клеточная стенка необходима для процесса эффективной секреции. Белки, которые транслоцируются через клеточную стенку в частично или полностью свернутом состоянии, могут быть подвергнуты временной ассоциации с компонентами клеточной стенки. В случае секреции α -амилазы более длительное время её высвобождения в среду по сравнению с левансахарозой может являться результатом различной аффинности к компонентам клеточной стенки.

Нарушения в секреции экзобелков в мутантах *B. subtilis* с дефектной фолдазой PrsA3 были преодолены супрессорной мутацией в *dlt*-опероне, продукты которого ответственны за D-аланилирование тейхоевых кислот. В клетках дикого типа *B. subtilis* свободные гидроксильные группы остатков фосфорной кислоты в липотейхоевых и тейхоевых кислотах могут быть замещены остатками D-аланина на 50 и 25% соответственно. *dlt*-Мутанты показали отсутствие D-аланина в составе тейхоевых кислот клеточной стенки. Это приводит к значительному усилению плотности отрицательного заряда клеточной стенки. Изменение общего заряда клеточной стенки обеспечивало активацию белков, локализованных с наружной стороны мембраны, включая PrsA-липопроtein, и приводило к увеличению выхода полипептидов, в фолдинге которых участвует PrsA. Кроме того, увеличенный общий отрицательный заряд клеточной стенки усиливает аффинность в отношении Ca^{2+} , что способствует посттрансляционному фолдингу Ca^{2+} -зависимых белков. Уменьшение уровня PrsA ниже 200 молекул на 1 клетку уничтожает рост, видимо, путем нарушения синтеза полимеров клеточной стенки. *dlt*-Мутация

способна не только супрессировать *prsA3*-мутацию, но также сохранять рост клеток, истощенных по PrsA-белку. Таким образом, белки, существенные для синтеза компонентов клеточной стенки, стабилизируются в отсутствие D-аланилирования.

Чтобы охарактеризовать динамику взаимодействия между секретлируемым экзобелком и компонентами клеточной стенки, кинетику рефолдинга левансахаразы и α -амилазы *B. subtilis* исследовали *in vitro* в присутствии полифосфатов различной длины цепи ($2 < n < 65$) при pH 7 и 37°. Растворимые анионные полимеры имитировали роль тейхоевых кислот. В отличие от α -амилазы левансахараза быстро образует нативную структуру в присутствии полиР ($n > 16$) даже в отсутствие ионов Ca^{2+} . Этот эффект объясняет различную скорость транслокации белков через клеточную стенку.

При изучении экспрессии гена α -амилазы под контролем *sacR*-сигнальной последовательности в штамме *B. subtilis* degU32(Hy) с помощью импульсного мечения белка показано, что скорость освобождения в среду фермента после отщепления сигнального пептида замедлялась в период стационарной фазы – $t_{1/2}=2$ мин против $t_{1/2}=3,2$ мин в экспоненциальной фазе роста. При этом эффекторы, которые контролируют стадию освобождения (уровень PrsA или Ca^{2+} -связывающие свойства клеточной стенки), сохраняются неизменными. Разница в эффективности секреции вызвана изменениями в составе структурных компонентов клеточной стенки, которые наблюдаются на разных фазах роста микроорганизмов. С другой стороны, это может быть связано с состоянием мРНК α -амилазы на разных фазах роста, стабильность которой, как предполагают авторы, может варьировать. Итак, у бацилл реализован механизм секреции, в котором существенную роль играют фолдинговые свойства молекул. Кинетика фолдинга развивается в сочетании с составом и количеством специфических эффекторов микроокружающей среды, а также химическим составом и общим зарядом клеточной поверхности, которые определяются структурными компонентами клеточной стенки. Механизм высвобождения в среду определяется структурой белка.

Секреция и споруляция. Особый интерес представляют исследования секреции белков на стадиях споруляции. Образование спороспецифических белков характеризуется разнообразием посттрансляционных модификаций, включая протеолитический процессинг, белокзависимый перенос, направленный на корректное взаимодействие индивидуальных компонентов и доставку в споровые компартменты. Эндоспоры покрыты многослойной белковой оболочкой, которая обеспечивает устойчивость спор, их способность к мониторингу окружающей среды и прорастанию уже через несколько минут пребывания в благоприятных условиях. Оболочка споры состоит из гетерогенной группы белков, включающей более 20 полипептидов с молекулярной массой от 6 до 69 кДа, которые образуют три структурных слоя. Сборка белков оболочки происходит в течение длительного периода, в процессе которого происходят существенные морфологические изменения клетки. Из спор *gerE*-мутанта *B. subtilis* был экстрагирован белок с молекулярной массой 30 кДа, который требуется для сборки споровой оболочки. N-Концевая последовательность этого белка гомологична продукту *tasA*-гена. Установлено, что экспрессия *tasA*-гена находится под σ^H контролем и формирование зрелой конформации белка TasA зависит от сигнальной пептидазы I типа SipW. Зрелый полипептид обнаружен в супернатанте спорулирующей культуры, а также внутри клеток сразу после начала споруляции. Авторы заключили, что TasA-белок секретируется в компартмент преспоры на стадии образования септы. Позднее, после поглощения преспоры материнской клеткой, TasA-белок активируется в септопроксимальном поле, расположенном между двух споровых мембран для того, чтобы центрировать организацию внутренних слоев формирующейся споровой оболочки. TasA-Белок является первым примером полипептида, вовлеченного в сборку белков споровой оболочки, и его продукция не является специфической для материнской клетки. Эти данные впервые позволяют рассматривать белковую секрецию как специфический механизм, необходимый для сборки споровой оболочки и позволяют предположить, что сборка оболочки инициируется в

процессе формирования септы путем синтеза определенных белков, которые секретируются направленно в компартмент проспоры. В подтверждение этих данных другие исследователи показали, что синтез компонентов аппарата секреции (Sec-белков) необходим на промежуточных стадиях клеточной дифференцировки. Обнаружено, что спонтанные супрессорные мутации, полученные на основе мутанта *B. subtilis* secA12, дефектного по белку SecA, локализованы в *транс*-мембранном SecY- белке. Оказалось, что в супрессорных мутантах сохранена экспрессия ранних споруляционных генов *kinA* и *spo0A*, кодирующих гистидинкиназу и фактор транскрипции для индукции генов споруляции. Было сделано заключение, что функция транслоказы, сопряженная с Sec-белками, необходима для развития процесса споруляции в клетках *B. subtilis*.

Роль FtsH-белка в секреции у бацилл. При обсуждении вопроса о поздних стадиях секреции белков у бацилл необходимо отметить роль FtsH-белка, принадлежащего к прокариотическому AAA-белковому семейству (АТРазы, ассоциированные с множественной клеточной активностью). AAA-Белки вовлечены в секрецию полипептидов, сборку интегральных мембранных белков, протеолиз, контроль клеточного цикла и др. FtsH является интегральным мембранным белком (70,7 кДа) и содержит на N-конце последовательности гидрофобные сегменты, которые заякорены на фосфолипидах мембраны двумя трансмембранными петлями. Регион, включающий от 25 до 95 аминокислот, фланкирует с наружной стороны мембраны. С-Концевой консервативный домен экспозирован в цитоплазму и содержит АТР-связывающий сайт, а также последовательность, схожую с активным сайтом Zn-зависимых металлопротеиназ. Среднее количество молекул FtsH-белка – ~400 молекул на 1 клетку. Анализ мутаций показал, что белок FtsH участвует в протеолитической деградации SecY-молекул, не связавшихся с SecE, и может влиять на процесс белковой секреции.

Характеристика FtsH-белка показала, что он является мембраносвязанной АТР-зависимой металлопротеиназой с активностью в отношении фактора

транскрипции σ^{32} у *E. coli*. Это открытие позволило выдвинуть предположение о новом механизме генной регуляции. Важным этапом быстрого контроля генной активности является гидролиз ключевых регуляторных белков клеточными регуляторными протеиназами.

Ген, кодирующий FstH-белок, идентифицирован в клетках *B. subtilis*. Мутации в *ftsH*-гене *B. subtilis* показали нарушения в клеточном росте и сборке мембранных пенициллинсвязывающих белков – РВР2А, РВР2В, РВР4. Среди них РВР2А-белок вовлечен в синтез клеточной стенки *B. subtilis*. Присутствие белка в мембране быстро снижается по мере перехода к споруляции, когда нет необходимости для элонгации клеточной стенки. РВР2В-Белок необходим для клеточного роста и споруляции, поскольку он используется при построении асимметрической септы. Функция РВР4 неясна. У *B. subtilis* FstH-белок участвует в регуляции сборки РВР-белков.

У бацилл *fstH*-мутация нарушает клеточный ответ, направленный на восстановление после действия на клетки высоких концентраций солей и формирование споры. Показано, что транскрипция *ftsH*-гена повышается в 2 раза, пока клетка переходит к существованию в нормальной среде и возобновляется клеточный рост. Увеличение экспрессии *fstH*-гена во время стресса у бацилл напоминает ответ на тепловой шок у *E. coli*. Поскольку FstH-белок заякорен на мембране двумя трансмембранными доменами, этот участок может быть востребован как часть сенсорного домена для ответа на условия стресса. Предполагается, что структурные особенности FstH-белка сходны с таковыми для интегральных мембранных компонентов систем сигнальной трансдукции, хотя поиск гомологии генов, кодирующих соответствующие белки, оказался безрезультатным.

Установлено, что экспрессия *fstH*-гена снижается по мере клеточной дифференцировки, *spoIIIE*-ген не экспрессировался в *fstH*-мутанте. Идентифицирован SpoVM-полипептид из 26 аминокислот (3 кДа), который во время споруляции ингибирует активность FtsH-протеиназы. Продукция σ -факторов, (σ^E и σ^K) и спороспецифичных генов была нарушена в мутантах по

spoVM- и *ftsH*-генам. Анализ двойных мутаций *spoVM* – *ftsH* показал, что взаимодействие между SpoVM и FtsH необходимо для завершения поглощения преспоры материнской клеткой. Контроль транскрипции на новом уровне сложности посредством пептидных ингибиторов, которые циркулируют между внутренней и внешней поверхностями клетки в качестве информационных мессенжеров, играет ключевую роль для обоснования нового механизма регуляции в микробных системах.

Накопленная информация указывает, что FstH имеет множественную функцию в клетках прокариот. Мутации гена *fstH* являются высокоплейотропными и распространяются на клеточный рост, жизнестойкость и события, ассоциированные с белок-мембранным взаимодействием, на секрецию и сборку полипептидов в мембране, формирование споры. Итак, FstH-белок может функционировать как шаперон, способствуя белковой секреции и протеолизу, в том числе и факторов контроля транскрипции.

Таким образом, секретлируемые белки бацилл после трансмембранной транслокации проходят через клеточную стенку и претерпевают посттрансляционные модификации на заключительном этапе секреции. В результате образуются стабильные трехмерные структуры белковых молекул, которые сохраняются в течение всего функционального времени их жизни в окружающей среде. Скорость и эффективность фолдинга полипептидов являются критическими факторами в продукции соответствующих секретлируемых белков и ферментов. Сохранение посттрансляционного контроля над структурой и функцией белка зависит от присутствия разнообразных фолдинговых эффекторов, молекулярных шаперонов, а также АТР-зависимых протеиназ, которые способны узнавать специфические домены, экспонированные на несвернутых участках экспортируемых полипептидов. Молекулярные шапероны и фолдинговые эффекторы, локализованные в поверхностном клеточном слое бацилл, участвуют в процессах свертывания белка и предотвращают его агрегацию, а энергозависимые протеазы необратимо элиминируют поврежденные белки. В результате разграничения

функций эффекторов, шаперонов и протеаз определяется, будет ли секретлируемый белок расщеплен до завершения формирования его зрелой конформации. Исследования по выяснению роли клеточной стенки в секреции у бацилл, указывают, что она является активным участником процесса и представляет собой среду, в которой происходят поздние стадии секреции белков, а не только механическим барьером проницаемости, как предполагалось ранее.

Литература

1. Chambert R. Anionic polymers of *Bacillus subtilis* cell wall modulate the folding rate of secreted proteins / Chambert R., Petit-Glatron M.F. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1999. – 179. – N. 1 – P. 43-7.
2. Harwood C.R. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story / Harwood C.R. Cranenburgh R. // *Trends Microbiol.* –2008. - V. 16. N.2. – P. 73-9.
3. Hyyrylainen H. L. D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis* / Hyyrylainen H.L., Vitikainen M., Thwaite J., Wu H., Sarvas M., Harwood C.R., Kontinen V.P., Stephenson K. // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 26696-26703.
4. Sarvas M. Protein secretion in bacilli / Sarvas M. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1999. - V. 179. – N. 1. – P. 43-7.
5. Simonen M. Protein secretion in *Bacillus* species / Simonen M., Palva I. // *Microbiol. Rev.* – 1993. – V. 57 – P.109-137