



## ПЕРВАЯ АДАМАЛИЗИНОПОДОБНАЯ МИКРОБНАЯ МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗА

© 2012 г. Н. П. Балабан<sup>#</sup>, Н. Л. Рудакова, А. Р. Сабирова, Л. Р. Валеева, М. Р. Шарипова

Кафедра микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

Поступила в редакцию 06.08.2011 г. Принята к печати 06.03.2012 г.

Впервые выделена и исследована адамализиноподобная металлоэндопептидаза (AN EU678894) – внеклеточный белок *Bacillus pumilus* 3-19. Доля фермента в пуле секретируемых белков *B. pumilus* 3-19, обладающих протеолитической активностью, составляет менее 8%. Фермент выделен из культуральной жидкости рекомбинантного штамма, очищен до гомогенного состояния, установлена его первичная структура и местоположение в классификационной иерархии. Изучены физико-химические свойства. Секретируемая металлоэндопептидаза *B. pumilus* 3-19 является первым прокариотическим гомологом семейства эукариотических адамализинов/репролизинов.

*Ключевые слова:* *Bacillus pumilus*, рекомбинантный штамм, металлоэндопептидаза, первичная структура, адамализины/репролизины, свойства.

### ВВЕДЕНИЕ

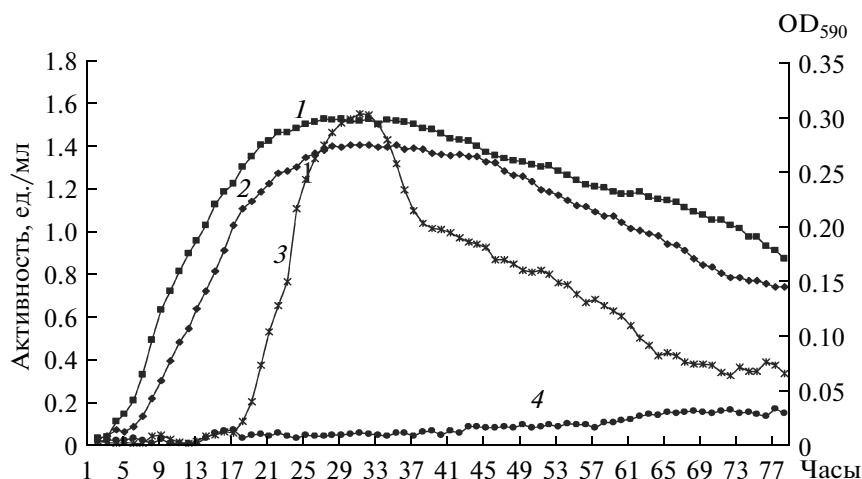
Протеолитические ферменты вовлечены во все основные физиологические процессы, включая регуляторный протеолиз, и являются стратегическими ферментами микроорганизмов. По результатам секвенирования геном *Bacillus subtilis* содержит 62 гена протеаз, среди которых 9 кодируют внеклеточные, 13 – мембраносвязанные протеазы, 6 – протеазы клеточной стенки, а остальные гены – цитоплазматические протеазы [1]. Многие из белков, соответствующих этим генам, до сих пор не выделены, не установлены их физиологические функции в бактериальных клетках. В международных базах данных содержится обширная информация о последовательностях ДНК, в том числе *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* и других, которая позволяет проводить сравнительный анализ по идентификации генов и сопоставлению фрагментов геномов. Научно-практический интерес представляют ранее не идентифицированные белки протеолитического спектра, что обусловлено необходимостью расширения общих представлений об эволюции микробных протеаз, а также выявления новых практически значимых ферментов с полезными свойствами.

Среди хорошо изученных внеклеточных протеиназ бацилл доминируют сериновые протеиназы и металлоэндопептидазы. Мы показали, что бактерии *B. pumilus* 3-19 наряду с сериновыми протеиназами (субтилизиноподобной протеина-

зой и глутамилэндопептидазой), выделяют в окружающую среду минорный белок – металлоэндопептидазу [2]. Выделить этот фермент из культуральной жидкости исходного штамма и охарактеризовать его невозможно в связи с крайне низким его содержанием [3]. Проблема решается при получении рекомбинантного штамма, несущего плазмиду с геном этой минорной протеазы. Последовательность гена внеклеточной металлоэндопептидазы *B. pumilus* 3-19 установлена нами ранее (AN EU678894) [2]. Анализ структуры гена (*mprVp*) позволил отнести этот белок к клану метцинкинов [3].

Метцинкины объединяют ферменты нескольких семейств, среди которых основными являются астазины, серрализины, адамализины/репролизины и матриксины, отличающиеся между собой по структуре и свойствам. Практически все они, кроме серрализинов, эукариотические белки. Общей характеристикой метцинкинов является продленный мотив активного центра с тремя консервативными остатками гистидина НЕХХ-НХХGXXН, координируемый каталитически важным ионом цинка. Другой отличительной особенностью молекулярной структуры метцинкинов является следуемый за активным центром поворот основной цепи белка, образуемый остатком метионина – Met-поворот ХХМХХ. Этот поворот играет важную роль в каталитическом акте метцинкинов [4]. Идентичность аминокислотных последовательностей протеолитического домена у представителей каждого из семейств метцинкинов не превышает 20%, однако перечисленные выше структуры консервативны, благодаря чему

<sup>#</sup> Автор для связи: эл. почта: Nellybalaban@yandex.ru.



**Рис. 1.** Динамика роста клеток и накопления протеолитической активности в культуральной жидкости *B. subtilis*: рост беспротеазного штамма *B. subtilis* BG2036 (1) и рекомбинантного штамма *B. subtilis* (2), протеолитическая активность рекомбинантного штамма (3) и беспротеазного штамма (4).

все эти белки имеют схожую третичную структуру каталитического домена.

Физиологическая роль метцинкинов связана с регуляторными механизмами, нарушение которых приводит к развитию патологических процессов. Бактериальные метцинкины ответственны за инфекционные осложнения в послеоперационных ранах, инфицирование новорожденных; они разрушают защитные белки и белковые ингибиторы. Эукариотические метцинкины принимают участие в деструктивных тканевых процессах, вовлечены в иммунные реакции, играют важную роль в воспалительных процессах, при делении и метастазировании раковых клеток [5]. Важная роль метцинкинов в жизненных процессах человека обосновывает необходимость исследования структурных и функциональных особенностей этих ферментов, их энзиматических и каталитических свойств, для разработки диагностических тестов и новых лекарственных препаратов [5].

В таком контексте особый интерес представляют бактериальные протеиназы — аналоги эукариотических метцинкинов. Принципиально более удобные и дешевые в получении, протеазы микроорганизмов являются не только идеальной моделью для фундаментальных исследований, но обладают высоким потенциалом практического применения.

Целью исследования явилось выделение и очистка внеклеточной минорной металлоэндопептидазы бактерии *B. pumilus* 3-19, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, определение первичной структуры белка и изучение его ферментативных свойств.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования одного из белков протеолитического спектра *B. pumilus* и предотвращения его контаминации в процессе очистки другими бактериальными протеазами ген *mprVp* металлоэндопептидазы *B. pumilus* субклонировали на плазмиде pSA1 [3]. Полученную плазмиду трансформировали в лабораторный протеадефицитный штамм *B. subtilis* BG2036. В реципиентном бесплазмидном штамме *B. subtilis* BG2036 протеолитическая активность обнаруживалась в следовых количествах. Исследование гетерологичной экспрессии гена металлоэндопептидазы в беспротеазном штамме показало, что максимальная активность по гидролизу азоказеина в культуральной жидкости в процессе роста бактерий соответствовала стационарной фазе роста бактерий — 30 ч (рис. 1). Отметим, что ферментативная активность по расщеплению специфических субстратов для сериновых протеиназ (*Z*-Glu-pNA и *Z*-Ala-Ala-Leu-pNA) в клеточной жидкости рекомбинантного штамма нами не обнаружена.

В присутствии ингибитора металлопротеаз 1,10-фенантролина в концентрации 5 мМ активность фермента по гидролизу азоказеина в культуральной жидкости рекомбинантного штамма полностью подавлялась, в то время как ингибитор сериновых протеиназ фенолметилсульфонилфторид (PMSF) в концентрации 5 мМ не оказывал влияния на ферментативное расщепление азоказеина. Полученные результаты подтвердили, что фрагмент ДНК *B. pumilus*, кодирующий металлоэндопептидазу, экспрессируется клетками рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG2036 в культуральную среду.

При оценке содержания этого фермента в общем пуле протеаз культуральной жидкости ис-

ходного штамма нами установлено, что на его долю приходится не более 8% от уровня общей протеолитической активности.

При разработке способов выделения металлоэндопептидазы MrgVp из культуральной жидкости рекомбинантного штамма использовали дробное осаждение  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . В результате подбора условий фракционирования показано, что оптимальным для выделения фермента из культуральной жидкости является интервал насыщения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20–70%.

Для следующей стадии очистки использовали хроматографию на трех носителях – бацитрацин-силохроме, бутил- и октил-сефарозе (схема). Необходимо отметить, что на предварительном этапе очистки мы использовали хроматографию на карбоксиметил-целлюлозе. Этот вид хроматографии был использован нами, поскольку ранее применялся как эффективный метод очистки щелочных внеклеточных сериновых протеиназ *V. pumilus*. MrgVp – новый фермент, обнаружен у бацилл впервые, поэтому мы решили начать очистку с известного подхода. Однако ионообменная хроматография белка на CM-целлюлозе не дала положительных результатов (данные не представлены). Бацитрацин-силохром относится к аффинным сорбентам, эффективность которых

объясняется специфическими взаимодействиями лиганда сорбента с субстратсвязывающими участками фермента. Преимуществом аффинных сорбентов является возможность выделить фермент из сложной белковой смеси, в которой он находится в ничтожно малых количествах. Хроматография на бацитрацин-силохроме не позволила получить гомогенный препарат белка (схема, рис. 2). Гидрофобные носители бутил- и октил-сефароза связываются с белками за счет гидрофобных взаимодействий белка и сорбента. Повышению прочности таких взаимодействий способствует сорбция белков из буферов, содержащих соли, в частности  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , в высокой концентрации. Предварительно нами показано, что такой концентрацией для исследуемой металлоэндопептидазы является 35%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в 0.05 М Трис-HCl-буфере: белок полностью сорбируется на носителе. Плавное понижение концентрации соли в буферном растворе при элюции приводит к десорбции белка. После сорбции белковой смеси на бутил-(октил-)сефарозе ступенчатая элюция белка с сорбента тем же буфером при понижении концентрации  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  от 35 до 10% (каждая последующая ступень элюирующего буфера содержала на 5% меньше  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) позволила получить гомогенный белок.

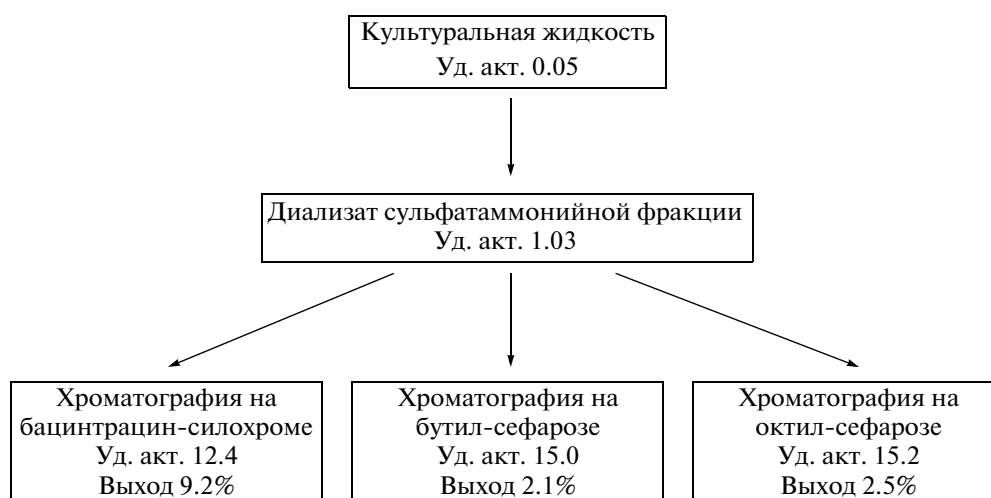


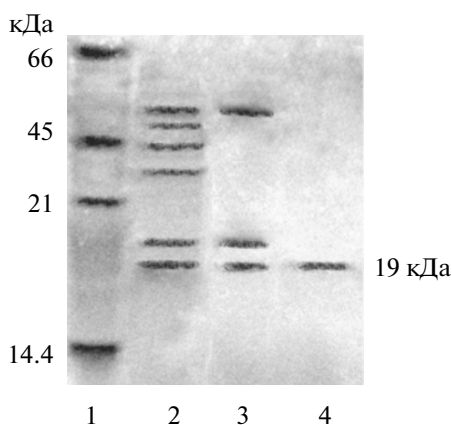
Схема очистки металлоэндопептидазы *V. pumilus*.

Результаты хроматографии этого препарата белка на обоих сорбентах были одинаковыми (схема, рис. 2). Очищенная таким образом металлоэндопептидаза по результатам электрофореза соответствовала белку с молекулярной массой 19 кДа (рис. 2).

Далее мы исследовали влияние ингибиторов на активность гомогенного белка. Активность фермента не ингибировалась PMSF, но полно-

стью подавлялась 1,10-фенантролином и высокими концентрациями EDTA. Таким образом, ингибиторный анализ очищенного белка-фермента подтверждает результаты, полученные для культуральной жидкости рекомбинантного штамма (см. выше).

Первичную структуру металлоэндопептидазы *V. pumilus*, очищенной из культуральной жидкости рекомбинантного штамма, мы изучали мето-



**Рис. 2.** ПААГ-SDS-электрофорез металлоэндопептидазы на разных стадиях очистки белка: белковые маркеры молекулярных масс (1), фракции белка после осаждения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2), после очистки на бацитрацин-силохроме (3), после очистки на октил-сефарозе (4).

дом MALDI-TOF-спектрометрии (рис. 3). По результатам этого анализа последовательность аминокислот зрелого белка полностью совпала с последовательностью аминокислот, конвертированной из нуклеотидной последовательности секвенированного гена *mprBp* (AN EU678894). Согласно этим данным, последовательность зрелого белка включает 174 а.о., что соответствует молекулярной массе белка 19050 Да и подтверждает результаты, полученные при электрофорезе (рис. 2). Эти данные позволили определить изоэлектрическую точку белка-фермента *pI*, которая равна 5.4.

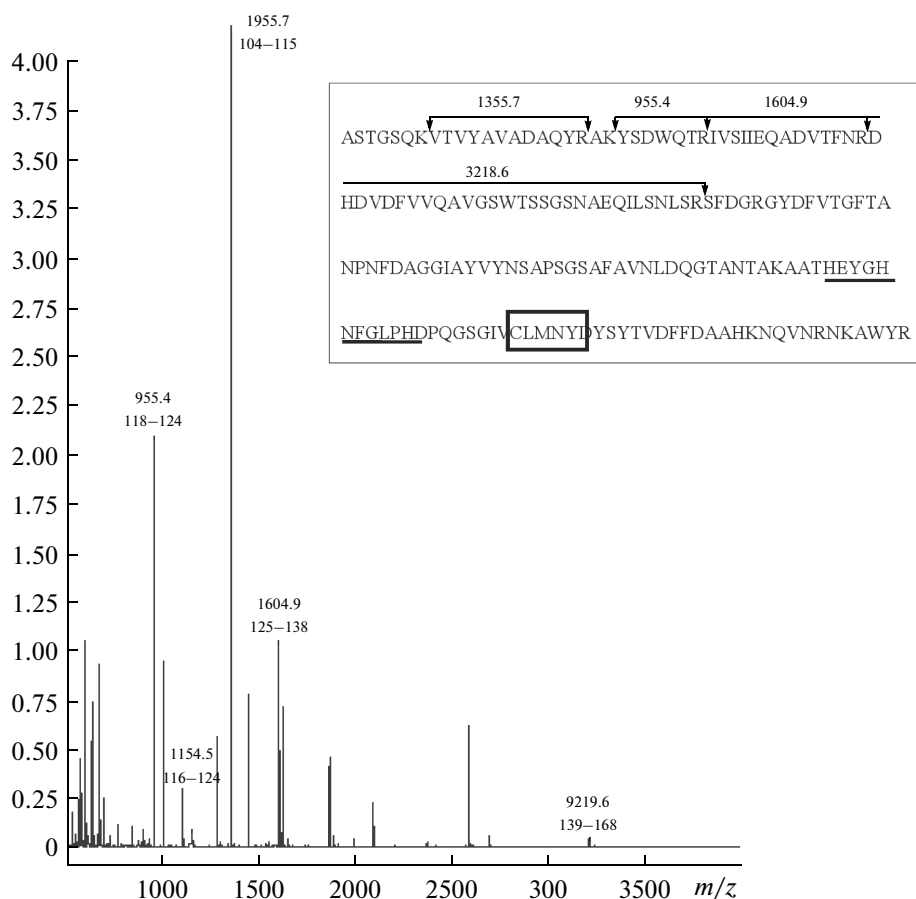
Анализ первичной структуры зрелого белка показал наличие двух консервативных последовательностей: продленного мотива активного центра  $\text{H}_{126}\text{E}_{127}\text{YGH}_{130}\text{NFG}_{133}\text{LPH}_{136}$  и структуры Met-поворота  $\text{C}_{145}\text{LM}_{147}\text{NY}_{149}$ , являющихся маркерными для клана метцинкинов [5] (рис. 3). На-

личие конкретных консервативных последовательностей в структуре белка позволило предположить принадлежность идентифицированного нами белка к семейству адамализиноподобных металлоэндопептидаз. В табл. 1 приведены данные сравнительного анализа мотивов активного центра адамализиновых эндопептидаз, а также термолизина *B. thermoproteolyticus*. В последовательностях выделены консервативные аминокислотные остатки активного центра и остаток метионина в структуре Met-поворота [6, 7]. Результаты этого сравнения показали, что 12-й аминокислотный остаток в последовательности мотива активного центра металлоэндопептидазы *B. pumilus* (в табл. 1 выделен и подчеркнут) представлен остатком аспарагиновой кислоты (**D**), совпадающий с таковым для всех перечисленных адамализинов, в то время как этот остаток у представителей других семейств метцинкинов обычно представлен другими остатками: у астацинов – это остаток глутамата, у сerratилизинов – это остаток пролина, у матриксинов – это остаток серина [4, 5]. Следует отметить, что наличие высоко консервативного остатка цистеина (**C**) в структуре Met-поворота характерно только для представителей семейства адамализинов/репролизинных клана метцинкинов. В других семействах этого клана остаток цистеина заменен на другие аминокислотные остатки, только в семействах астацинов и сerratилизинов – это остаток серина (S), в семействах матриксинов – остаток аланина (A).

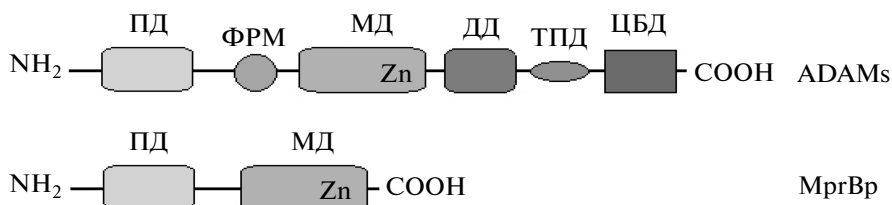
Таким образом, выделенный нами секретируемый фермент *B. pumilus* является аналогом эукариотических адамализинов/репролизинных. До сих пор эти белки описаны только для эукариотических организмов. Кроме того, идентифицированный нами фермент среди внеклеточных протеолитических белков *B. pumilus* 3-19 является первым бактериальным гомологом эукариотических адамализинов (ADAM<sub>S</sub>).

**Таблица 1.** Гомология консервативных мотивов металлоэндопротеаз разных кланов

Металлопротеиназы	Последовательность активного центра	Гомология, %	Последовательность Met-изгиба	Гомология, %
Металлоэндопептидаза <i>B. pumilus</i> [3]	<b>HEYGHNFGLPHD</b>	100	<b>C</b> LMNY	100
Гипотетический репролизин <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 [3]	<b>HEYGHNFGLPHD</b>	100	<b>C</b> LMNY	100
Адамализин II <i>C. adamanteus</i> [18]	<b>HELGHNLGMEHD</b>	66	<b>C</b> IMRP	40
Адамализин ADAM21 <i>M. mulatta</i> [14]	<b>HELGHILGMQHD</b>	58	<b>C</b> IMNT	60
Термолизин <i>B. thermoproteolyticus</i> [6]	<b>HELTH</b>	20	Нет данных	Нет данных



**Рис. 3.** Результаты MALDI-TOF-спектрометрии пептидов, полученных в результате обработки металлоэндопептидазы трипсином. Показана реконструированная аминокислотная последовательность металлоэндопептидазы. Выделены консервативные участки: мотив активного центра (подчеркнут) и Met-поворот (в рамке). Стрелками отмечены связи, гидролизуемые трипсином. Над стрелками указаны массы полученных пептидов (Да).



**Рис. 4.** Схема расположения доменов в структуре ADAMs-белков и адамализиноподобной металлоэндопептидазы *B. pumilus*. ПД – продомен, ФРМ – фурираспознающий мотив, МД – металлопротеазный домен, ДД – дезинтегриновый домен, ЦБД – цистеинбогатый домен, ТПД – тромбоспондинподобный домен.

Эукариотические адамализины – это мульти-доменные белки, в структуру которых входят про-домен, протеиназный домен, фурираспознающий домен (RXXR), дезинтегриновый домен, тромбоспондин-подобный и цистеин-богатый домены. Физиологические функции адамализинов варьируют в зависимости от числа доменов [8]. Анализ аминокислотной последовательности металлоэндопептидазы *B. pumilus* позволил установить наличие в прокариотической молекуле

двух доменов, характерных для представителей семейства адамализинов – продомена и металло-протеиназного домена (рис. 5). Отсутствие дезинтегринового, тромбоспондинподобного и цистеин-богатого доменов в структуре бактериального фермента может определять меньший спектр действия адамализиноподобной микробной эндопептидазы в отличие от секретируемых адамализинов эукариот. Установлено, что С-конец эукариотических адамализинов, состоящий

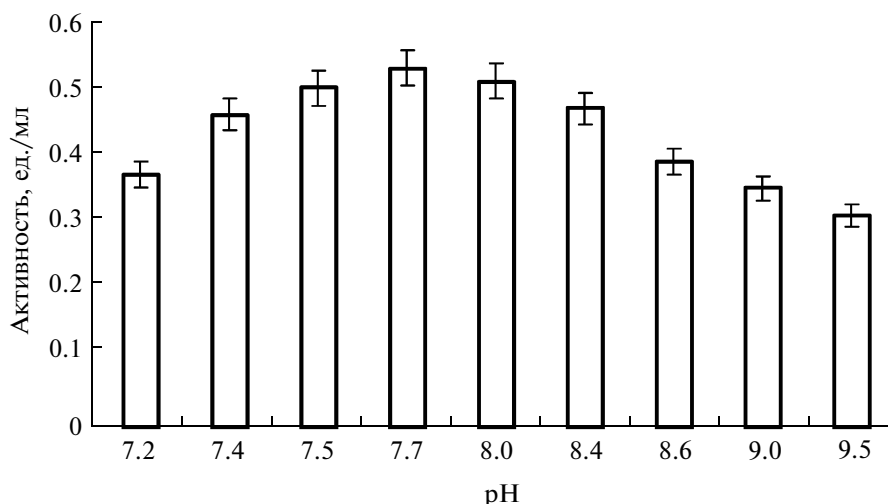


Рис. 5. pH-Оптимум металлоэндопептидазы *B. pumilus*.

из тромбоспондин-подобного и цистеин-богатого доменов, отвечает за подавление образования и разрастания опухолевых клеток [9]. Вероятно, в ходе эволюции от прокариот к эукариотам адамализины приобрели выраженную специфичность и дополнительные функциональные домены (рис. 4). Итак, особенности в структуре новой бактериальной металлоэндопептидазы *B. pumilus* свидетельствуют о принадлежности выделенного нами белка к семейству адамализинов/репролизинов.

Мы провели поиск генов-гомологов металлоэндопептидазы *B. pumilus* в геномах других бактерий в базе данных NCBI. Выравнивание последовательностей гена *mprBp* с генами, кодирующими гипотетический белок WPUM\_3392 *B. pumilus* SAFR-032 (AN YP\_001488604.1), репролизин семейства цинкзависимых металлопротеиназ *B. pumilus* ATCC 7061 (AN ZP\_03055196.1), гипо-

тетический белок BL03917 *B. licheniformis* ATCC 14580 (AN YP\_081058.1) и астацин речного рака *A. astacus*, позволило выявить гомологию структурной области гена в 99, 98, 69 и 42%, соответственно (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Выравнивание последовательностей этих генов показало, что цинк-связывающие сайты в активном центре перечисленных продуктов генов идентичны. Гомология гена *mprBp* с геном астацина составляет до 40% и свидетельствует, что изучаемый нами фермент не относится к семейству астацинов клана метцинкинов. Гомология гена *mprBp* с геном всесторонне изученного бактериального фермента термолизина *B. thermoproteolyticus* (AN X76986.1, — другого клана цинк-зависимых металлоэндопептидаз (глущинкинов)) еще меньше — 35% (табл. 2). Анализ последовательностей активного центра соответствующих генов металлоэндопептидазы *B. pumilus* и термолизина также не выявил гомо-

Таблица 2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов металлоэндопептидаз

Ген металлопротеазы	Гомология участка, отвечающего активному центру, %	Гомология регуляторной области гена, %	Гомология структурной области гена, %	Размер открытой рамки считывания, п.о.
<i>mprBp</i> — ген внеклеточной металлоэндопептидазы <i>B. pumilus</i> [3]	100	100	100	810
Ген Zn-зависимой металлопротеазы <i>B. pumilus</i> ATCC 7061 [3]	100	98	98	827
Ген астацина <i>A. astacus</i> (crayfish) [14]	42	—	42	756
<i>npr</i> — ген термолизина <i>B. thermoproteolyticus</i> [6]	25	0	35	1647

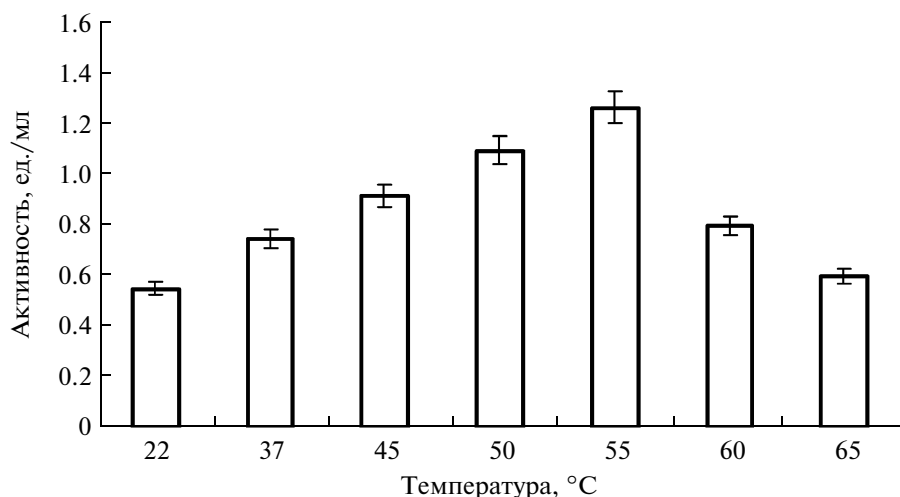


Рис. 6. Температурный оптимум действия металлоэндопептидазы *B. pumilus*.

логии (20%, табл. 1). Таким образом, сравнительный анализ структуры генов, структуры активных центров соответствующих белков, размеров открытых рамок считывания показали низкую степень сходства идентифицированной металлоэндопептидазы *B. pumilus* с термолизиноподобной протеиназой *B. thermoproteolyticu*, клана глущинкинов.

Гены, кодирующие металлоэндопептидазы, обнаружены практически во всех секвенированных (или частично секвенированных) геномах бацилл. Однако кодируемые этими генами металлоэндопептидазы относятся к другому клану протеаз, а именно — к глущинкинам, ферментам, имеющим иные структурные особенности и биохимические свойства [3, 10]. Так, гены металлоэндопептидаз *nprA B. stearothermophilicus* [11], *nprB B. subtilis* и *npr Bacillus sp. BT1* [10] кодируют термостабильные нейтральные термолизиноподобные протеиназы. Эти ферменты имеют общую характерную аминокислотную последовательность — NEXXH, представляющую сайт активного центра молекулы термолизина. У термолизиноподобных металлоэндопептидаз остаток глутаминовой кислоты располагается на расстоянии 20 а.о. от второго гистидинового лиганда активного центра, формирует третий цинковый лиганд и является частью другого консервативного домена NEXXSD [12, 13]. В структуре исследуемой нами адамализиноподобной металлоэндопептидазы *B. pumilus* такой домен не идентифицирован и фермент не относится к глущинкинам. Таким образом, анализ данных свидетельствует о наличии в геномах некоторых видов бацилл генов адамализиноподобных протеиназ клана метцинкинов, функцию которых предстоит изучить.

Далее мы исследовали физико-химические свойства адамализиноподобной металлоэндо-

пептидазы *B. pumilus*. Константа Михаэлис-Ментен для очищенной металлоэндопептидазы определена по начальной скорости гидролиза азоказина и составляет 0.06 мМ. При определении оптимума pH действия фермента MrgVp, установлено, что он соответствует pH 7.7 (рис. 5). Эти данные свидетельствуют о том, что фермент относится к группе щелочных металлоэндопептидаз. Большинство метцинкинов имеют оптимум pH действия в интервале от 7.0 до 10.0. Так, для астацина pH-оптимум находится в широком интервале pH 7.5–9.5 и частично зависит от гидролизующего субстрата [14]; сerratилины проявляют протеолитическую активность тоже в широком диапазоне pH от 6.0 до 10.0 с оптимумом при pH 8.0 [15]; для матриксинов оптимальным является pH среды 7.0 [16]. Оптимальная протеолитическая активность адамализинов/репролизинов также проявляется в слабощелочных условиях (pH 7.5) [17, 18]. Таким образом, оптимум pH действия полученной нами металлоэндопептидазы близок к pH-оптимуму, характерному для семейства адамализинов. Температурный оптимум исследуемой протеиназы составил 55°C (рис. 6). Похожий температурный оптимум имеют другие цинк-зависимые металлопротеиназы: протеиназа NprM *B. megaterium* имеет оптимум активности при 58°C [19], протеиназы *B. stearothermophilus S, N* и *B* имеют температурный оптимум при 70°, 85° и 90°C, соответственно [20], а протеиназы *B. cereus KCTC 3674* — при 70°C [21].

Таким образом, нами впервые выделена и охарактеризована новая внеклеточная бактериальная металлоэндопептидаза *B. pumilus*, которая представляет уникальный для бактерий секретруемый фермент, относящийся по ключевым характеристикам к семейству адамализинов/репролизинов клана метцинкинов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Составляющие среды для культивирования: бактериологический пептон (Sigma, США) и дрожжевой экстракт (Sigma, США). Соли: NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma, США). Используемый буфер – Трис-НСl буфер (Sigma, США). Субстрат для постановки протеолитической активности – азоказеин (Sigma, США). Синтетические хромогенные субстраты Z-Ala-Ala-Leu-pNA (субстрат для субтилизиноподобных эндопептидаз) и Z-Glu-pNA (субстрат для глутамилэндопептидаз) синтезированы на химическом факультете МГУ г. Москва [22]. Ингибиторы – PMSF, EDTA и 1,10-фенантролин (Serva, Германия). Сорбенты для хроматографии: бацитрацин-силохром (синтезирован на химическом факультете МГУ г. Москва) [23], бутил-сефароза и октил-сефароза HiTrap колонки размером 1 мл (Pharmacia, США). Coomassie brilliant blue G-250 (“Serva”, Германия), белковые маркеры для электрофореза (Sigma, США), ПЭГ 40000 (Sigma, США), реактив Бредфорд (Bio-Rad, США).

Бесплазмидный штамм *B. subtilis* BG2036 предоставлен проф. Eugenio Ferrarri, Genencor Int. Inc., USA; плазмиды pSA1 (лаборатория ББФ КФУ, Россия) [3], pCB22 и pCM4 предоставлены для работы проф. С.В. Костровым, ИМГ РАН, г. Москва [24].

Вибростенд для культивирования микробов (“V. Braun”, Германия). Спектрофотометр (Bio-Rad, США).

**Получение рекомбинантного штамма *B. subtilis*** проводили по методике [25]. В работе использовали рекомбинантный штамм *B. subtilis*, устойчивый к эритромицину, который получен путем трансформации плазмидой pSA1, содержащей ген металлоэндопептидазы *B. pumilus* 3-19 под собственным промотором, реципиентного протеазодефицитного штамма *B. subtilis* BG2036. Плазмида pSA1 является производной плазмиды pCM4, сконструированной путем инсерции 6 кб фрагмента геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 в вектор экспрессии pCB22 [3].

Культивирование бесплазмидного и рекомбинантного штамма *B. subtilis*, а также исходного штамма *B. pumilus* 3-19 проводили на среде, описанной ранее, в течение 30 ч при 200 об/мин [26]. Отношение объема среды к объему колбы составляло 1 : 7. Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием в течение 20 мин при 10000 g.

**Протеолитическую активность металлоэндопептидазы** определяли по расщеплению азоказеина [27, 28]. Измерение проводили при длине волны 450 нм. За 1 ед. акт. принимали такое количество фермента, которое гидролизует в условиях

эксперимента (при 37°C в 0.05 М Трис-НСl-буфере pH 7.7) 1 мкг субстрата азоказеина за 1 мин.

**Активность фермента** по гидролизу синтетических субстратов определяли, как описано в работе [29].

**Белок определяли** спектрофотометрически, принимая за одну оптическую единицу поглощение раствора белка 1 мг/мл в кювете толщиной 1 см при 280 нм. Также проводили определение концентрации белка по методу Бредфорд (расвор Бредфорд стандартизован калибровочной кривой по свободному тирозину) [30].

**Содержание металлоэндопептидазы в общем пуле протеиназ *B. pumilus* 3-19** определяли сравнением протеолитической активности в культуральной жидкости исходного штамма в присутствии PMSF и 1,10-фенантролина в концентрации 5 мМ и без ингибиторов.

**Действие ингибиторов на протеолитическую активность металлопротеиназы** изучали при инкубации раствора фермента (или культуральной жидкости) в присутствии эффектора в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего определяли остаточную активность реакционной смеси по гидролизу азоказеина. Остаточную активность выражали в процентах относительно контроля, активность которого принимали за 100% при отсутствии ингибиторов в реакционной смеси. В работе использовали ингибитор сериновых протеиназ PMSF, ингибиторы металлопротеиназ – EDTA и 1,10-фенантролин. Ингибиторы добавляли к раствору фермента в соотношениях фермент:ингибитор 1 : 10 и 1 : 100.

**Выделение металлоэндопептидазы *B. pumilus*** проводили из 1 л культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Белки из культуральной жидкости осаждали добавлением (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в интервале 20–70% насыщения при 4°C. Образовавшийся при этом осадок отделяли центрифугированием (13000 об/мин), растворяли его в 10 мл 0.05 М Трис-НСl-буфера, pH 7.3, и диализовали против 1000 мл этого же буфера в течение ночи при 4°C. Смену буфера для диализа проводили 2 раза в день в течение 3 сут до полного исчезновения осадка в диализате. Получили 24 мл отдиализованного белкового препарата.

Очистку 5 мл отдиализованного белкового препарата проводили на колонке размером 1 × 14 см с бацитрацин-силохромом. Сорбент в колонке предварительно уравнивали 0.05 М Трис-НСl-буфером, pH 7.3, содержащим 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. После промывки колонки уравнивающим буфером проводили элюцию сорбированного белка тем же буфером, содержащим 1М NaCl и 7% изопропанола со скоростью 20 мл/ч. Хроматографический процесс контролировали по оптическому поглощению при 280 нм. Фракции с максимальным количеством белка и активности объ-



единяли, полученный раствор (31 мл) диализовали против 0.05 М Трис-НСl-буфера, рН 7.3, с 5 мМ СаСl<sub>2</sub>.

Очистку отдиализованного белкового препарата, полученного после осаждения (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (как описано выше), по 1 мл, проводили также на колонках с бутил- и октил-сефарозой по одинаковой схеме (параллельно). Колонку с сорбентом уравнивали 0.05 М Трис-НСl-буфером, рН 7.3, содержащим 5 мМ СаСl<sub>2</sub> и 35% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Раствор фермента перед нанесением на колонку диализовали против уравнивающего буфера 0.05 М Трис-НСl, рН 7.3, с 5 мМ СаСl<sub>2</sub>, содержащего 35% сульфата аммония. Фермент элюировали с колонки при 20–15% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в буфере, объем фракции составлял 1 мл (каждая ступень элюирующего буфера состояла из 10 фракций), скорость элюции – 20 мл/ч. Хроматографический процесс контролировали по оптическому поглощению при 280 нм. Полученные фракции (с 4 по 8 – при 20% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и с 1 по 6 – при 15% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) объединяли и диализовали против того же буфера без (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Далее полученный раствор белка концентрировали при помощи ПЭГ 40000 до объема 3 мл.

Выход целевого белка рассчитывали по общей активности на всех стадиях его очистки. Удельную активность фермента в культуральной жидкости и в очищенных препаратах белка рассчитывали как отношение единиц активности на мг белка (определение белка по A<sub>280</sub> или по Брэдфорд).

**Электрофорез белков** проводили в 12.5%-ном ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли [31]. Окраску разделенных белков проводили красителем Coomassie brilliant blue G-250. В качестве маркеров мол. масс при электрофоретическом разделении использовали следующие белки (кДа): БСА (66), овальбумин (45), папаин (20.6), лизоцим (14.4).

**Очищенную металлоэндопептидазу анализировали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии.** После трипсинолиза металлоэндопептидазы полученные пептиды идентифицировали на масс-спектрометре Vision 2000 TOF (ThermoBioanalysis, Великобритания). Данные обрабатывали с помощью программ Peptide Mass Fingerprint <http://www.matrixscience.com> и Peptide Mass <http://www.expasy.net/tools/peptide-mass.html>.

**Константу Михаэлис-Ментен металлоэндопептидазы (K<sub>m</sub>)** определяли по гидролизу азоказеина. Концентрация фермента составила 0.12 мг/мл (A<sub>280</sub>), начальная концентрация субстрата составила 5, конечная – 50 мг/мл. Начальные скорости гидролиза азоказеина металлоэндопептидазой анализировали в координатах Лайнуивера–Берка с использованием программы Microsoft Excel.

**Изоэлектрическую точку белка-фермента** определяли на основе аминокислотной последовательности с использованием ресурса <http://www.expasy.net/cgi-bin/protparam>.

**рН-Оптimum активности фермента** определяли по гидролизу азоказеина в 0.05 М Трис-НСl-буфере, рН 7.3, с 5 мМ СаСl<sub>2</sub> в интервале рН от 7.2 до 9.5 с шагом 0.2 единицы рН. **Температурный оптimum действия фермента** определяли по гидролизу азоказеина в 0.05 М Трис-НСl-буфере, рН 7.7, с 5 мМ СаСl<sub>2</sub> в интервале температур от 20 до 65°C.

**Для сравнительного анализа первичной структуры** метцинкиновых металлоэндопептидаз использовали последовательности фрагментов геномов, имеющиеся в свободном доступе на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Выравнивание последовательностей проводили с использованием алгоритма BLAST пакета программ, представленных на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Нуклеотидная последовательность гена *mprBp* хранится в Международном банке генов “GeneBank” с кодом доступа ACE75740.2.

**Для статистического анализа экспериментальных данных** использовали программу Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних величин.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность чл.-корр. АН РФ, проф. С.В. Кострову и с.н.с. И.В. Демидюку (ИМГ РАН) за предоставленную для работы плазмиду pCM4, проф. E. Ferrarri (Genencor Int. Inc., USA) за протеазо-дефицитный штамм *Bacillus subtilis* BG 2036. Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J.D.H., Bron S., Dijk J.M. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. P. 515–547.
2. Sabirova A., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 4419–4425.
3. Сабирова А.П., Шарипова М.Р. // Учен. Зап. Казан. Ун-та. Естеств. науки. 2010. Т. 152. Кн. 2. С. 155–166.
4. Gomis-Rüth F.-X. // Mol. Biotechnol. 2003. V. 24. P. 157–202.
5. Sterchi E.E., Stöcker W., Bond J.S. // Mol. Aspects of Medicine. 2008. V. 29. P. 309–328.
6. Jiang W., Bond J.S. // FEBS Lett. 1992. V. 312. P. 110–114.

7. Bode W., Gomis-Rüth F.-X., Stöcker W. // FEBS Lett. 1993. V. 331. P. 134–140.
8. Brocker C.N., Vasiliou V., Nebert D. W. // Human Genomics. 2009. V. 4. P. 43–55.
9. Kuno K., Bannai K., Hakozaiki M., Matsushima K., Hirose K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 319. P. 1327–1333.
10. Večerek B., Venema G. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 4104–4107.
11. Nishiya Y, Imanaka T. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 4861–4869.
12. Matthews B.W., Jansonius J.N., Colman P.M. // Nature New Biol. 1972. V. 238. P. 37–41.
13. Matthews B.W. // Acc. Chem. Res. 1988. V. 21. P. 333–340.
14. Stöcker W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Rüth F.-X., McKay D.B., Bode W. // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 823–840.
15. Morichara K., Tsuzuki H., Oka T. // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 309. P. 414–429.
16. Gomis-Ruth F.-X. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 15353–15357.
17. Matsui T., Fujimura Y., Titani K. // BBA. 2000. V. 1477. P. 146–156.
18. Gong W., Zhu X., Liu S., Teng M., Niu L. // J. Mol. Biol. 1998. V. 283. P. 657–668.
19. Kuhn S., Fortnagel P. // J. Gen. Microbiol. 1993. V. 139. P. 39–47.
20. Sookkheo B., Phutrakul S., Chen S.S. // Protein Expr. Purif. 2000. V. 20. P. 142–151.
21. Kim S.S., Kim Y.J., Rhee I.K. // Arch. Microbiol. 2001. V. 175. P. 458–461.
22. Люблинская Л.А., Воюшина Т.Л., Степанов В.М. // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1620–1623.
23. Степанов В.М., Руденская Г.Н. // J. Appl. Biochem. 1983. V. 5. № 6. P. 420–428.
24. Sorokin A.V., Khazak V.E. // Molecular Biology. 1990. V. 24. P. 993–1000.
25. Anagnostopolous C., Spizizen J. // J. Bacteriol. 1961. V. 81. P. 741–746.
26. Balaban N.P., Gabdrakhmanova L.A., Sharipova M.R., Sokolova E.A., Malikova L.A., Mardanova A.M., Rudenskaya G.N., Leschinskaya I.B. // J. Basic Microbiol. 2004. V. 44. P. 415–423.
27. Charney J., Tomarelli R.M. // J. Biochem. 1947. V. 177. P. 501–505.
28. Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. // Prot. Eng. Des. and Selec. 2004. V. 17. P. 411–416.
29. Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 748–753.
30. Bradford M.M. // Analyt. Biochem. 1976. V. 8. P. 248–254.
31. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

## The Novel Adams-Like Microbial Metalloendopeptidase

N. P. Balaban<sup>#</sup>, N. L. Rudakova, A. R. Sabirova, L. R. Valeeva, and M. R. Sharipova

<sup>#</sup>*e-mail*: Nellybalaban@yandex.ru

*Department of Microbiology, Faculty of Biology and Soil, Kazan (Volga region) Federal University,  
ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia*

Heterologous gene expression of extracellular minor metalloendopeptidase of *Bacillus pumilus* 3-19 in protease-deficient *B. subtilis* strain has been studied. The fraction of enzyme in total pool of *B. pumilus* 3-19 secreted proteases composes less than 8%. The enzyme was isolated from culture liquid of recombinant strain, its primary structure was determined, physicochemical properties were investigated. It was concluded that secreted metalloendopeptidase of *B. pumilus* 3-19 represents the first prokaryotic homolog of eukaryotic adamalysin/reprolysin protein family.

*Keywords*: *B. pumilus*, metallo endopeptidase, adamalysins/reprolysin, primary structure, properties, the recombinant strain.