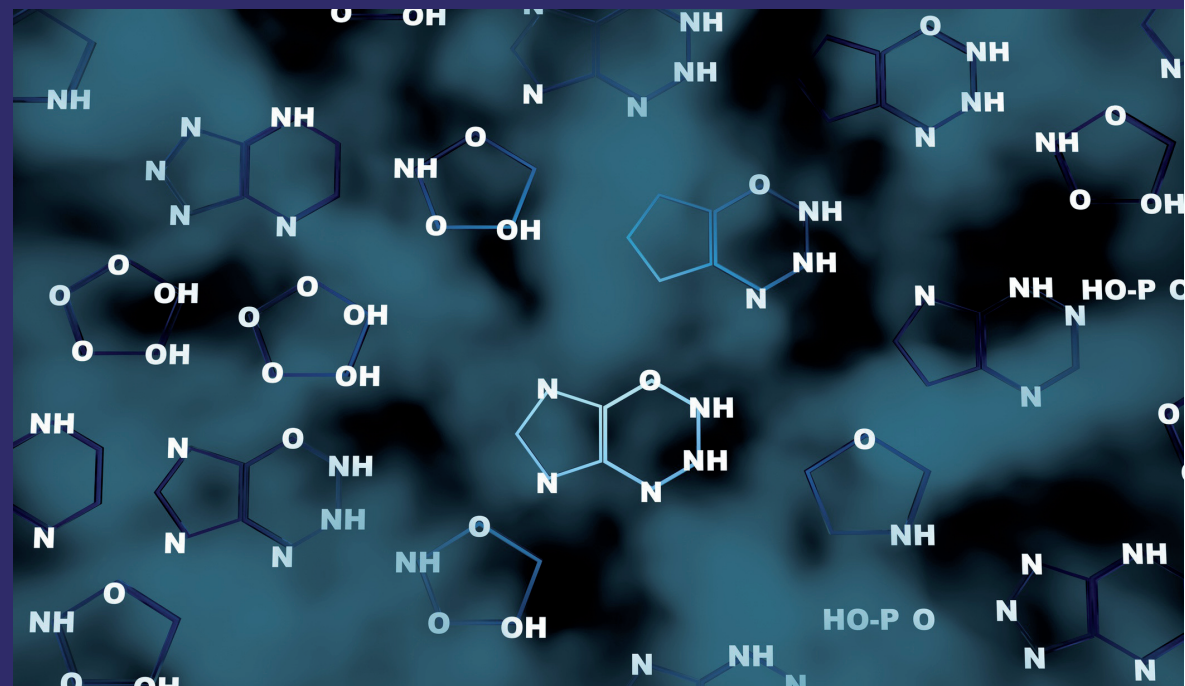


Работа посвящена исследованию уникального бациллярного фермента - секретируемой щелочной цинкзависимой металлопротеиназы MprVi. Разработан простой и эффективный способ выделения и очистки фермента из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Определена аминокислотная последовательность фермента, его субстратная специфичность, кинетические характеристики и энзиматические свойства. Получены приоритетные данные о том, что новая эндопептидаза бацилл является гомологом эукариотических адамализиноподобных эндопептидаз клана метцинкинов. Фермент является первым и единственным представителем семейства адамализиноподобных эндопептидаз у бацилл.

Новая металлопротеиназа *B. intermedius*

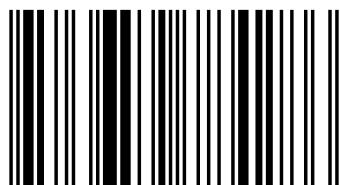


Наталья Рудакова
Нэлли Балабан
Маргарита Шарипова

Новая секретируемая металлоэндопептидаза *Bacillus intermedius*

Рудакова Наталья Леонидовна, к.б.н., научный сотрудник НИЛ
Биоинженерии и Биосинтеза ферментов Казанского
(Приволжского) федерального университета.

Рудакова, Балабан, Шарипова



978-3-659-78428-6

 **LAMBERT**
Academic Publishing

Наталья Рудакова
Нэлли Балабан
Маргарита Шарипова

Новая секретируемая металлоэндопептидаза *Bacillus*
intermedius

Наталья Рудакова
Нэлли Балабан
Маргарита Шарипова

**Новая секретируемая
металлоэндопептидаза *Bacillus
intermedius***

LAP LAMBERT Academic Publishing

Impressum / Выходные данные

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: www.ingimage.com

Verlag / Издатель:

LAP LAMBERT Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: info@lap-publishing.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

ISBN: 978-3-659-78428-6

Zugl. / Утверд.: Казань, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2010

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2015 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1. Современные аспекты классификации протеолитических ферментов	8
2. Характеристика ферментов клана метцинкинов	12
2.1 Астациноподобные эндопептидазы	12
2.2 Серрализины	17
2.3 Матриксные металлоэндопептидазы	19
2.4 Адамализины/репрализины	22
3. Структурные особенности метцинкиновых эндопептидаз	27
4. Функциональная роль и перспективы применения метцинкинов в медицинской практике	34
5. Заключение	39
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	41
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
1. Штаммы и плазмиды	41
2. Условия культивирования рекомбинантного штамма	41
3. Определение локализации фермента	42
4. Определение белка	43
5. Определение протеолитической активности	43
6. Выделение и очистка протеиназы рекомбинантного штамма	45
7. Электрофорез в ПААГ	46
8. Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы MprBi	47
9. Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF)	47
10. Определение N-концевой последовательности белка	48

11.Определение субстратной специфичности фермента	48
12. Каталитические и энзиматические свойства металлопротеиназы MprBi	49
13.Математическая обработка результатов	50
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
1. Среды для культивирования рекомбинантного штамма <i>B. subtilis</i>	51
2. Динамика роста и накопления металлопротеиназы MprBi в культуральной жидкости рекомбинантного штамма <i>B. subtilis</i>	52
3. Локализация металлопротеиназы MprBi в клетках рекомбинантного штамма <i>B. subtilis</i>	53
4. Подбор компонентов питательной среды для максимальной продукции металлоэндопептидазы MprBi рекомбинантного штамма <i>B. subtilis</i>	54
5. Разработка способов очистки металлопротеиназы MprBi, электрофорез и молекулярная масса белка	61
6. Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы MprBi	65
7. Определение последовательности аминокислот и N- концевой аминокислоты металлоэндопептидазы	66
8. Сравнительный анализ первичной структуры металлопротеиназы MprBi с ферментами клана метцинкинов	68
9. Субстратная специфичность MprBi	70
10. Кинетические параметры	71
11. pH-Оптимум и pH-стабильность MprBi	71
12. Температурный оптимум и термостабильность	72
13. Влияние ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы MprBi	73

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	75
ВЫВОДЫ	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	92

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

PMSF - фенилметилсульфонилфторид
 ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
 пХМБ – пара-хлормеркурибензоат
 ТХУ – трихлоруксусная кислота
 ДЭАЭ-целлюлоза - диэтиламиноэтилцеллюлоза
 ПААГ – полиакриламидный гель
 SDS (sodium dodecyl sulfate) – додецил сульфат натрия
 SP-сефадекс – сульфопропил-сефадекс
 TIMP_s – тканевые ингибиторы металлопротеиназ
 K_m – константа Михаэлиса
 k_{cat} – каталитическая константа
 pI – изоэлектрическая точка
 кДа – килодальтон

Аминокислоты

Cys – цистеин (C)	Val – валин (V)
His – гистидин (H)	Asn – аспарагин (N)
Asp – аспарагиновая кислота (D)	Ala – аланин (A)
Ser – серин (S)	Pro – пролин (P)
Lys – лизин (K)	Thr – треонин (T)
Glu – глутаминовая кислота (E)	Tyr – тирозин (Y)
Gly – глицин (G)	Leu – лейцин (L)
Met – метионин (M)	Arg – аргинин (R)
Phe – фенилаланин (F)	Gln – глутамин (Q)
Ile – изолейцин (I)	Trp – триптофан (W)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы: Протеолитические ферменты представлены в геномах всех живых организмов: от прокариот и вирусов до высших эукариот. Они важны для жизни и здоровья человека, о чем свидетельствует тот факт, что в геноме человека обнаружены более 640 генов, кодирующих пептидазы или их гомологи [Sterchi et al., 2008]. Интересно, что по результатам сиквенса генома человека не отмечено существенного возрастания количества генов, кодирующих сериновые протеиназы, но заметно увеличено количество генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы семейства метцинкинов по сравнению с геномами низших эукариот [Хофманн, 2001]. В свою очередь, уровень экспрессии этих ферментов в бактериальных геномах составляет менее 1% от общей протеолитической активности клеток [Шарипова с соавт., 2000, 2002].

Метцинкины – один из кланов цинкзависимых эндопептидаз, отличающийся от других представителей металлопротеиназ наличием продленного мотива активного центра фермента HEXXHXXGXXH и консервативной структурой Met-поворота в молекуле белка. Метцинкины обнаружены у многих организмов от прокариот до млекопитающих. Выяснение роли и функций этих белков в биологических процессах способствовало развитию исследований их структуры, физико-химических свойств и функциональных особенностей. Выделение и изучение бактериальных метцинкинов стало возможным с развитием постгеномных технологий и методов геномной инженерии, позволяющих клонирование генов на основе знания геномных последовательностей бактерий и создания эффективных векторов экспрессии. До сих пор одной из главных научных задач остается выяснение роли этих белков в физиологии про- и эукариот. Установлено, что метцинкины в эукариотических клетках принимают участие как в различных деструктивных процессах, так и высоко специфичном и ограниченном протеолизе, осуществляя регуляторные функции на посттрансляционном уровне. Повреждение регуляторных механизмов может привести к

возникновению и развитию патологических процессов [Gomis-Rüth, 2003]. Эукариотические и бактериальные метцинкины ответственны за возникновение таких патологий как воспалительные процессы, тканевая деструкция, неврологические болезни, кардиозаболевания, обширное метастазирование при онкологических заболеваниях [Gomis-Rüth, 2003, 2009]. Важная роль, которую метцинкины играют в жизни и здоровье человека, ведет к необходимости исследования структурных и функциональных особенностей этих ферментов и механизма их действия *in vitro* и *in vivo*.

Ранее показано, что бактерии *Bacillus intermedius* 3-19 секретируют в среду протеиназы, среди которых доминируют сериновые: субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза [Шарипова с соавт., 2000]. Гены ферментов клонированы и секвенированы, последовательности зарегистрированы в Международной базе данных (AN AY 754946 и AN Y15136). Изучена экспрессия обоих генов в рекомбинантных штаммах *B. subtilis* [Sharipova et al., 2007, 2008]. Соответствующие белки выделены в гомогенном состоянии и подробно охарактеризованы [Михайлова с соавт., 2007, Шамсутдинов с соавт., 2008]. Наряду с сериновыми протеиназами бактерии *B. intermedius* выделяют в среду металлоэндопептидазу, последовательность гена которой установлена и занесена в Международную базу данных (AN 75740.2)

Целью работы явилась разработка эффективного способа очистки и получения гомогенного препарата металлоэндопептидазы *B. intermedius* 3-19, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, определение первичной структуры фермента, его классификация и исследование физико-химических свойств.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Оптимизация среды культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis* для максимальной продукции металлоэндопептидазы MprVi

2. Разработка условий выделения и очистки гомогенного препарата металлоэндопептидазы из культуральной жидкости рекомбинантного штамма
3. Определение и анализ первичной структуры эндопептидазы MprBi и установление классификационной принадлежности фермента
4. Определение субстратной специфичности металлоэндопептидазы
5. Исследование энзиматических свойств рекомбинантного белка

Научная новизна: впервые выделена и очищена до гомогенного состояния секретрируемая щелочная цинкзависимая металлопротеиназа MprBi. Разработан простой и эффективный способ выделения и очистки фермента из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Определена аминокислотная последовательность фермента, его субстратная специфичность, кинетические характеристики и энзиматические свойства. Получены приоритетные данные о том, что новая эндопептидаза бацилл является гомологом эукариотических адамализиноподобных эндопептидаз клана метцинкинов. Фермент является первым и единственным представителем семейства адамализиноподобных эндопептидаз у бацилл.

Практическая значимость результатов.

Оптимизированы условия биосинтеза металлопротеиназы MprBi рекомбинантным штаммом *B. subtilis*. Разработан эффективный способ очистки фермента, позволяющий получить 4-5 мг гомогенного белка из 1 л культуральной жидкости. Новая бациллярная металлопротеиназа является гомологом эукариотических адамализиноподобных эндопептидаз клана метцинкинов, многие представители которого являются ферментами, ответственными за возникновение и развитие заболеваний.

Обзор литературы

1. Современные аспекты классификации протеолитических ферментов

Все известные в настоящее время ферменты, включая протеолитические, систематизированы в Международной Классификации ферментов [Enzyme Nomenclature, 1992]. Большая группа протеолитических ферментов, осуществляющих гидролиз пептидных связей в белках и пептидах носит название пептидгидролаз или протеаз (КФ 3.4). Протеазы, отщепляющие одну-две аминокислоты с N- или C-конца субстрата, называются пептидазами или экзопептидазами. Протеазы, гидролизующие внутримолекулярные связи в субстрате, называются протеиназами или эндопептидазами. По химической природе и структуре активного центра протеиназы подразделяются на несколько больших классов, среди которых ферменты класса металлопротеиназ представляют собой наиболее многочисленную и разнообразную группу (КФ 3.4.24) [Enzyme Nomenclature, 1992]. В 1993 г Rawlings и Barrett усовершенствовали существующую классификацию, используя принцип эволюционного родства с учетом общепринятых критериев распределения ферментов по структуре активного центра [Rawlings, Barrett, 1993]. С помощью компьютерных программ на основе гомологии известных аминокислотных последовательностей ферменты были распределены по эволюционным семействам. Группы семейств с не высоким процентом идентичности, но имеющие похожие третичные структуры были объединены в кланы по признаку дальнего эволюционного родства, при этом учитывались как различия ферментов в каталитической активности (дивергенция), так и близость свойств ферментов различных эволюционных ветвей (конвергенция) [Rawlings, Barrett, 1993, Lopez-Otin et al., 2008]. По этой классификации все цинкзависимые металлопротеиназы с мотивами активного центра HEXXH и HEXHXXGXXH распределялись по семействам от M1 до M13 (клан MA) в зависимости от структурных особенностей молекулы белка, каталитических и энзиматических свойств ферментов. В 1995 г Stöcker с соавторами предложил называть цинкзависимые металлоэндопептидазы с такими мотивами активного центра

цинкинами [Stöcker et al., 1995]. Ферменты, имеющие другой мотив активного центра (НХХЕ, НХН, НХХЕН) или два атома цинка в активном центре, не являются цинкинами и были распределены по другим семействам [Rawlings, Barrett, 1993]. Многие цинкзависимые металлоэндопептидазы содержат ионы кальция, играющие важную роль в стабилизации пространственной структуры фермента. Эти ферменты обнаружены у человека и животных, они продуцируются бактериями, актиномицетами и микроскопическими грибами. Они инактивируются хелатирующими реагентами (ЭДТА, 1,4-фенантролин), которые блокируют атом цинка активного центра, а также различными белковыми ингибиторами.

На основе этой классификации была составлена база данных пептидаз MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), в которой каждый клан и семейство имеют свое обозначение, каждый фермент - свой индивидуальный номер, указаны мотив активного центра с важными для катализа аминокислотными остатками, ингибиторы ферментов и характерные особенности третичной структуры [Rawlings et al., 2004].

Эта классификация считается общепризнанной, так как кроме указанных свойств и структурных особенностей в ней имеются необходимые сведения о механизмах синтеза, секреции, активации предшественников и биологических свойствах ферментов.

В 2003 г. эта классификация была скорректирована, что позволило разделить металлоэндопептидазы на группы ферментов в зависимости от положения и контекста цинковых лигандов и других важных для субстратного связывания и катализа аминокислотных остатков активного центра (рис. 1) [Gomis-Rüth, 2003]. Предложенная схема, согласующаяся с общепринятой классификацией, быстро нашла признание у исследователей протеолитических ферментов и широко используется в научной литературе, при этом часто указывается клан, семейство и индивидуальный номер фермента по базе данных пептидаз MEROPS.

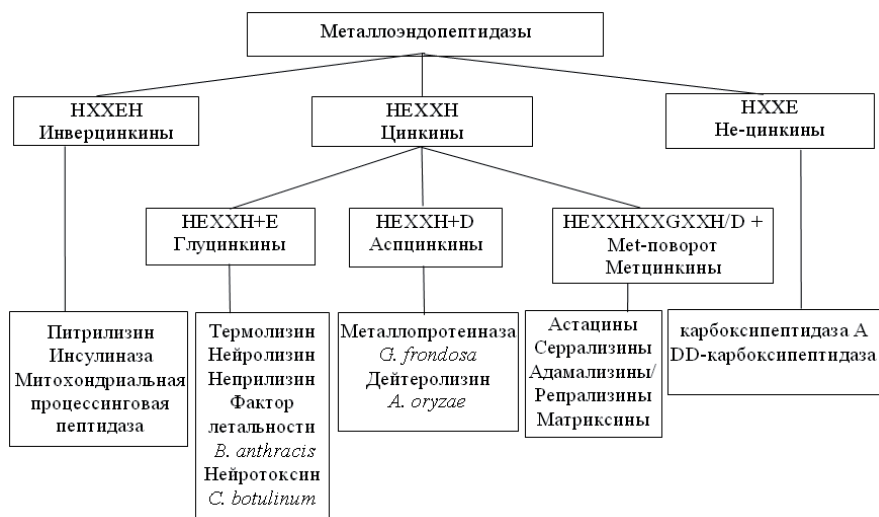


Рис. 1. Схема классификации металлоэндопептидаз на основе структуры активного центра [Gomis-Rüth, 2003, Sterchi et al., 2008]

Согласно этой схеме металлоэндопептидазы подразделяются на три группы ферментов: 1 - цинкины, обладающие консервативной последовательностью активного центра **НЕХХН** с двумя (или тремя) гистидинами в качестве цинковых лигандов и глутаматом в качестве каталитического основания; 2 – протеиназы-инверцинкины, имеющие обратную последовательность аминокислотных остатков активного центра **НХХЕН**; 3 – протеиназы-не-цинкины, имеющие альтернативный цинковый мотив активного центра (рис.1) [Gomis-Rüth, 2003, Sterchi et al., 2008]. К последним относятся ферменты карбоксипептидаза А и DD-карбоксипептидаза.

К инверцинкинам относятся протеиназа III *E.coli*, инсулиндеградирующая протеиназа человека (инсулиназа), гомологичная ей протеиназа из *Drosophila melanogaster* и некоторые другие ферменты (MEROPS клан ME). Чтобы установить, является ли последовательность НХХЕН активным центром, была проведена замена в ней двух гистидинов для протеиназы III по отдельности на аргинин, и глутамата – на глутамин. У всех трех мутантов отсутствовала

протеолитическая активность по гидролизу инсулина в отличие от эндопептидазы дикого типа. Эти данные показали, что регион НХХЕН является активным центром, два гистидиновых остатка которого координируют атом цинка, а остаток глутамата вовлечен в катализ [Becker et al., 1992].

Цинкины являются большой группой ферментов и, в зависимости от природы и положения третьего цинкового лиганда, разделяются на три структурно характерных клана: **HEXXH+E** (глущинкины), **HEXXH+D** (аспцинкины), **HEXXHXXGXXH/D+Met-поворот** (метцинкины) (рис.1) [Gomis-Rüth, 2003]. Типичным представителем глущинкинов является термолизин, обладающий вторым консенсусным мотивом **NEXXSD**, который расположен близко к активному центру (на расстоянии 20 аминокислотных остатков от С-конца мотива **HEXXH**) и содержит остаток глутамата, являющийся третьим цинковым лигандом. Все термолизиноподобные эндопептидазы, входящие в глущинкиновый клан, обозначаются в базе данных MEROPS как MA(E)-клан. Структура активного центра ферментов клана аспцинкинов похожа на активный центр ферментов глущинкинового клана, в котором остаток глутамата второго мотива заменен на аспартат, в связи с чем высказывается предположение, что аспцинкины могут быть субкланом глущинкинов [Gomis-Rüth, 2003]. Такие эндопептидазы обнаружены у *Aspegillus oryzae* и *Grifola frondosa*. Среди цинкинов самым представительным является клан метцинкинов, содержащий продленный мотив активного центра **HEXXHXXGXXH/D** с двумя гистидиновыми лигандами цинка аналогично ферментам термолизинового семейства и остаток гистидина или аспартата в качестве третьего цинкового лиганда [Gomis-Rüth, 2003, Sterchi et al., 2008]. Характерным признаком этого клана ферментов является последовательность Met-поворота с консервативным метионином, локализованным в 1,4-β-петле. Эти ферменты получили свое название благодаря присутствию этого консервативного остатка. Таким образом, Met-поворот является уникальным признаком этого клана и служит для более корректной классификации ферментов.

2. Характеристика ферментов клана метцинкинов

Клан метцинкинов (клан MA(M) по MEROPS) включает большие семейства эндопептидаз: астадины, серрализины, матриксные металлопротеиназы, адамализины/репролизины, снапализины, лейшманолизины и другие, которые обладают общими характерными особенностями структуры, указанными выше (рис. 1) [Gomis-Rüth, 2003]. Хорошо изучены физико-химические свойства перечисленных семейств ферментов, их субстратная специфичность, структурные особенности каталитического домена и мультидоменная структура белков. Следует отметить, что, кроме указанных семейств, обнаружен широкий спектр эндопептидаз с неизвестной пока пространственной структурой. Это фрагилизины (MEROPS M10C), паппализины (MEROPS M46), гаметолизины (MEROPS M11), тюрингилизины (MEROPS M6), архаметцинкины, коелизин, хеликолизины и другие [Sterchi et al., 2008]. Все они имеют продленный цинксвязанный мотив активного центра с консервативными аминокислотными остатками, характерными для метцинкинов, и Met-поворот с инвариантным метионином. Биохимические свойства, субстратная специфичность, субстраты и ингибиторы этих ферментов также хорошо изучены. На этом основании протеиназы данных семейств, включенные в базу данных MEROPS, отнесены к клану метцинкинов.

2.1 Астациноподобные эндопептидазы

Астацин, выделенный в 1967 г. из пищеварительного тракта Европейского речного рака *Astacus astacus* L, стал первым хорошо изученным ферментом семейства астацинов, которые встречаются в основном у представителей животного мира [Pfleiderer et al., 1967]. До сих пор эти ферменты не обнаружены у растений и грибов, тем не менее астациноподобный фермент, флавастацин, был обнаружен у граммотрицательных бактерий [Plummer et al., 1995]. К близкородственным астациноподобным эндопептидазам относятся секретируемые и мембраносвязанные меприны α и β , выделенные из почек грызунов и кишечника человека, проколлагеновая C-эндопептидаза,

выделенная из фибробластов мышей и сухожилий зародыша цыпленка, идентичный ей костный морфогенетический белок BMP-1, выделенный из ткани человека, хориолизины L и H лососевых рыб, у которых они участвуют в лизисе внутренней оболочки яйца при выходе эмбриона и некоторые другие астациновые гомологи [Jiang et al., 1992a, Gorbea et al., 1993, Yasumasu et al., 1988, Kessler et al., 1986a, Hojima et al., 1985, Kessler et al., 1986b].

Астациноподобные эндопептидазы синтезируются в виде неактивных предшественников с пропептидом и сигнальным пептидом на N-конце молекулы. Активация зимогена включает в себя протеолитическое удаление N-концевого пропептида, причем активация астацина речного рака может происходить также аутокаталитически [Yiallourous et al., 2002]. Предполагается, что при этом возникают конформационные изменения, которые приводят к процессингу проэнзима.

Астацин полностью соответствует всем характеристикам клана метцинкинов: в структуре активного центра содержатся три гистидиновых лиганда, необходимые для катализа, и консервативная структура Met-порота с инвариантным метионином. Зрелая молекула астацина (MEROPS M12.001) представляет собой протеазный домен с молекулярной массой 20,3 кДа из 200 аминокислотных остатков с N-концевым аланином, pI 3,5 [Titani et al., 1987]. Астацин стабилен в физиологических условиях, устойчив против самопереваривания, но при pH ниже 4,0, быстро и необратимо инактивируется. Оптимум pH действия фермента находится в интервале pH 7,5-9,5 и частично зависит от субстрата. Активность астацина определяется по гидролизу казеина, азоказеина, желатина, коллагена, В-цепи окисленного инсулина при нейтральном значении pH. При расщеплении пептидных связей в белковых субстратах астацин проявляет предпочтение к аминокислотным остаткам с короткими боковыми цепями (Ala, Thr, Ser, Gly) в положении P1', к пролину в положении P2 и P3 и к гидрофобным остаткам в положении P3' и P4'. Субстратами для астациноподобных эндопептидаз служат также синтетические нитроамидоподобные пептиды Suc-Ala-Ala-Ala-NHPhNO₂ и другие пептидные

амиды, а также чувствительные флуоресцентные субстраты. Анализ продуктов гидролиза синтетических олигопептидов различной длины и состава показал, что астацин обладает протяженным субстрат-связывающим сайтом. Эффективный гидролиз наблюдается на пептидах длиной не менее пяти аминокислотных остатков, оптимальная длина синтетических субстратов – семь или более аминокислотных остатков. Астацин и астациноподобные эндопептидазы не ингибируются ингибиторами сериновых, цистеиновых и аспартатных протеиназ, фосфорамидоном (ингибитором термолизиноподобных протеиназ) и тканевыми ингибиторами металлопротеаз (TIMP_s). К ингибиторам этих эндопептидаз относятся α_2 -макрोगлобулин, дипиколиновая кислота, пептидные гидроксаматы и др. Металхелатирующие ингибиторы (1,10-фенантролин и ЭДТА) ингибируют астацин, но ингибирующее действие 1-10 мМ ЭДТА проявляется при больших сроках инкубации [Stöcker et al., 1995, Bond et al., 1995].

К хорошо изученным астациноподобным эндопептидазам относятся меприны, костный морфогенетический белок 1 (BMP1), толлоидная эндопептидаза из *Drosophila melanogaster* (TLD) и другие ферменты. Эти ферменты, как и другие астациноподобные эндопептидазы, в отличие от простой структуры астацина речного рака имеют мультидоменную структуру, но протеазный домен с продленным мотивом активного центра и Met-поворотом схож с астацином. Дополнительные не протеазные домены (CUB-домен, EGF-домен и др.) этих ферментов могут участвовать в мультимеризации, но не являются необходимыми для катализа и секреции. Они способствуют клеточной адгезии, обеспечивают белок-белковое взаимодействие и/или связывание с ионами кальция, формируя жесткие структуры на периферии BMP1/TLD-подобных протеиназ, что влияет на структурные и функциональные особенности этих ферментов [Bond et al., 1995].

Из хорошо изученных представителей астациноподобных эндопептидаз со сложной олигомерной организацией известны ферменты меприны,

обнаруженные у позвоночных и локализованные в почках, кишечнике, коже, лейкоцитах и раковых клетках [Beynon et al., 1981]. Молекулы меприна представляют собой олигомеры, которые состоят из эволюционно родственных α - и β -субъединиц. Меприн α (MEROPS M12.002) состоит из двух α -субъединиц (гомоолигомеры) или из α - и β -субъединиц (гетероолигомеры), меприн β (MEROPS M12.004) содержит гомоолигомеры из двух β -субъединиц [Gorbea et al., 1991]. Мембраносвязанная форма меприна α , состоящая из α - и β -субъединиц, называется эктоэнзимом.

Известна секретируемая форма меприна α , содержащая только α -субъединицы, меприн β является интегральным мембраносвязанным белком и обнаруживается исключительно на внешней поверхности клетки [Gorbea et al., 1991, Sterchi et al., 2008]. Каталитический домен меприна содержит около 200 аминокислотных остатков и на 34% идентичен со структурой астацина речного рака. Пространственная структура протеазного домена похожа на таковую у астацина и содержит в активном центре важные для катализа три гистидиновых остатка, а также характерную для метцинкинов структуру Met-поворота. Каталитический домен стабилизирован двумя дисульфидными связями и несколькими консервативными солевыми мостиками. Меприны – мультидоменные белки, у которых к С-концу протеазного домена присоединены несколько не протеазных доменов [Sterchi et al., 2008]. Меприны α и β имеют похожую доменную структуру (гомология 42%), однако они различаются по субстратной специфичности, тканевой экспрессии и могут вызывать разные заболевания.

Меприны гидролизуют азоказеин, В-цепь окисленного инсулина, брадикинин (по связи Phe-Ser), ангиотензин (по связи Tyr-Ile), цитокины, экстрацеллюлярные матриксные белки, белки клеточной поверхности [Sterchi et al., 2008, Dumermuth et al., 1991]. Наименьшая длина субстрата - 4 аминокислотных остатка. Меприны α и β по-разному связываются и расщепляют пептидные связи в субстратах. Меприн β предпочитает отрицательно заряженные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот, в то

время как меприн α гидролизует связи по остаткам алифатических и ароматических аминокислот. Кроме того, меприн α проявляет предпочтение к пролину, отстоящему на несколько аминокислот от разрезаемой связи.

Меприны α и β экспрессируются в эпителиальных клетках почек, кишечника и кожи человека, но в клетках карциномы ободочной кишки экспрессируется только меприн α .

Меприны не способны к аутоактивации и активируются трипсиноподобными протеиназами при протеолитическом удалении N-концевого продомена. Но существуют и другие протеиназы, активирующие меприны. Так, плазмин может быть ответственен за активацию человеческого промеприна α в опухолях кишечника, но не промеприна β [Becker et al., 2003].

В 1995 г. в культуральной жидкости грамотрицательных бактерий *Flavobacterium meningosepticum* была обнаружена астациноподобная эндопептидаза микроорганизмов – флавастацин (MEROPS M12.066) [Plummer et al., 1995]. Ген флавастацина клонирован, секвенирован и изучена его экспрессия [Tarentino et al., 1995]. Молекула фермента имеет молекулярную массу 38843 Да и содержит 352 аминокислотных остатка, не имеет цистеиновых остатков, синтезируется с N-концевой пропептидной последовательностью и сигнальным пептидом на N-конце протеазного домена. Аминокислотная последовательность протеазного домена на 20% идентична с астацином и на 24-29% - с меприном. Протеазный домен флавастацина имеет высококонсервативный мотив активного центра **HEIMHSMGIMHE** и характеризуется наличием метионинового поворота **SVMMY**. Наличие глутамата, расположенного после третьего цинкового лиганда и остатка тирозина в Met-повороте позволили отнести его к семейству астациноподобных эндопептидаз [Bond et al., 1995]. Обнаружение микробной астациноподобной эндопептидазы позволило предположить наличие общего предкового гена этого белка, существовавшего до начала дивергенции этого семейства ферментов.

Флавастацин получен в гомогенном состоянии с помощью гидрофобной хроматографии и изучены некоторые свойства фермента. Это - нейтральная

эндопептидаза, осуществляющая ограниченный протеолиз пептидов по остаткам аспарагиновой кислоты в P1' положении. Для определения специфичности фермента была синтезирована серия пентапептидов типа FA-Leu-Ala-Asp-Ala-Ser-NH₂. Этот субстрат был расщеплен на два коротких пептида: FA-Leu-Ala и Asp-Ala-Ser-NH₂. В этих же условиях субстрат с Glu-остатком вместо Asp не гидролизует, однако высокие концентрации фермента при длительном времени инкубации расщепляют пептидные связи в субстратах по остатку глутаминовой кислоты.

2.2 Сепрализины

Семейство сепрализинов (MEROPS M10B) включает сепрализин *Serratia* (MEROPS M10.051), аеругинолизин *Pseudomonas* (MEROPS M10.056), мирабилизин *Proteus* (MEROPS M10.057), пептидазы A, B, C *Erwinia* (MEROPS M10.052, M10.53, M10.054 соответственно), пептидазу PrtA *Photobacterium* (MEROPS M10.063) и другие пептидазы. Название ферментов во многих случаях складывается из двух слов: названия вида и названия фермента, например, *Serratia* и *lysin*. Члены этого семейства имеют похожие физико-химические свойства, структурную организацию, механизмы секреции белков и активации протеазного домена.

Ферменты проявляют протеолитическую активность в широком диапазоне pH от 6,0 до 10,0 с оптимумом pH 8,0, поэтому их часто называют щелочными металлопротеиназами. Синтетические п-нитроанилиды длиной 6-8 остатков являются хорошими субстратами для этих ферментов. Сепрализин и аеругинолизин проявляют широкую специфичность с предпочтением к небольшим остаткам Gly и Ala, а также к гидрофобным остаткам в P1' положении, причем наличие гидрофобных остатков в P2 и P2' положении предпочтительнее других аминокислотных остатков [Morichara et al., 1973]. Эти ферменты гидролизуют также в п-нитроанилидах и метилкумариламидах связи после Arg. Эндопептидаза PrtA из патогенного насекомого *Photobacterium luminescens* гидролизует как синтетические гексапептиды, так и природные субстраты по связям Val, Ala и Leu. Природными субстратами для этой

протеиназы являются А и В-цепи окисленного инсулина, IgA и IgG, защитные и цитоскелетные белки, компоненты системы комплемента, экстрацеллюлярные матричные белки. Скорость гидролиза этих субстратов эндопептидазой PrtA выше, чем другими серрализинами, однако, авторы считают, что полученные результаты должны быть подтверждены экспериментами *in vivo* [Marokhazi et al., 2007].

Активность ферментов серрализинового семейства подавляется ЭДТА, 1,10-фенантролином, пептидил-меркаптоанилидами, такими как Br-Phe-Arg-SH, но не ингибируется классическим ингибитором сериновых протеиназ DFP и фосфорамидоном – ингибитором термолизина. После обработки ЭДТА активность может быть восстановлена при добавлении ионов Co^{2+} , Zn^{2+} и в меньшей степени Cu^{2+} , Fe^{2+} и Mn^{2+} . Серрализины ингибируются маленькими белками-ингибиторами (10-11 кДа), выделенными из тех же штаммов *Serratia*, *Pseudomonas* и *Erwinia*, физиологическая функция которых состоит в защите периплазматического пространства бактерий от протеолитической активности серрализинов [Letoffe et al., 1989, Gomis-Rüth, 2003].

Серрализины – это одноцепочечные белки. Молекулярная масса серрализина *Serratia sp. E-15* около 55 кДа, pI между 4,5 и 5,5, аеругинолизина – 49,5 кДа, pI 4,1, мирабилизина 55 кДа, pI 4,3, аминокислотные последовательности протеазного домена этих ферментов на 50-55% идентичны между собой. Определены третичные структуры серрализинов *Serratia sp. SM6* и *E-15*, аеругинолизина *Pseudomonas aeruginosa*, мирабилизина *Proteus mirabilis* и протеиназы *Erwinia chrysanthemi* [Baumann, 1994, Hamada, et al., 1996, Miyatake et al, 1995, Hege et al., 2001]. Каталитический ион цинка связан с тремя гистидиновыми остатками в мотиве активного центра **HEXXH₁XUGUXH₂**, где Х – любая аминокислота, U – объемный гидрофобный остаток. Кроме того, белки могут содержать до 7-8 ионов кальция. В структуре всех серрализинов имеется консервативный мотив – метиониновый поворот **SXMSY**, содержащий остаток тирозина. Серрализины секретируются как аутоактивирующиеся зимогены с пропептидом в 9-20 аминокислотных остатков на N-конце протеазного домена,

при удалении которого активация ферментов происходит по механизму «тирозинового переключателя», когда тирозин, локализованный в Мет-повороте, становится пятым цинковым лигандом и включается в субстратное связывание и/или в стабилизацию переходного состояния во время катализа [Yiallourous, et al., 2000, Stöcker, et al., 1995, Gomis-Rüth et al., 1994].

Молекула серрализина состоит из отдельных структурных доменов (N- и C- домены), каждый из которых содержит около 220 аминокислотных остатков [Gomis-Rüth, 2003]. N-домен схож с протеазным доменом астацина и нуждается в корректном фолдинге. C-домен – это домен со структурными функциями, который необходим для секреции фермента, так как серрализины синтезируются без сигнального пептида [Gomis-Rüth, 2003]. На C-конце этого домена содержится от 20 до 50 аминокислотных остатков, действующих как сигнал для транслокации, в котором консервативный C-концевой мотив DXXX (X – любая гидрофобная аминокислота), необходим для инициации секреции. Для серрализинов и мирабилизинов эта последовательность - DFIV [Hamada, et al., 1996]. Этот C-домен не удаляется протеолитически при секреции серрализинов в среду.

2.3 Матриксные металлоэндопептидазы

Матриксные металлопротеиназы (матриксины) (MEROPS M10A) – это секретируемые или мембраносвязанные эндопептидазы, обнаруженные, в основном, у высших млекопитающих: внутритканевые коллагеназы 1, 2, 3 и 4, желатиназы А и В, матрилизин, стромелизин 1 и 2 и другие. Родственные ферменты найдены у рыб, амфибий, насекомых, растений, прокариот и вирусов [Gomis-Rüth, 2009]. Впервые эти белки обнаружены 40 лет назад как ферменты, принимающие участие в метаморфозе лягушки. Эти ферменты подразделяются на три группы: 1. Истинные коллагеназы, способные вести ограниченный протеолиз тройной цепи коллагена. 2. Желатиназы, гидролизующие коллаген и желатин. 3. Стромелизины с выраженной протеолитической активностью и деградирующие протеогликаны. Выделенные из тканей разных животных эндопептидазы описаны в литературе под разными названиями, поэтому было

введено общее обозначение – MMP_s (матриксные металлопротеиназы). Внутритканевая коллагеназа 1 (MMP-1, MEROPS M10.001), нейтрофильная коллагеназа 2 (MMP-8, MEROPS M10.002), коллагеназы 3 (MMP-13, MEROPS M10.015) и 4 (MMP-18, MEROPS M10.018), желатиназа А (MEROPS M10.033) и В (MEROPS M10.034), стромелизин 1, 2 и 3 участвуют в деградации экстрацеллюлярных матриксных белков [Gomis-Rüth, 2003].

В протеазном домене матриксинов каталитический ион цинка связан с тремя гистидиновыми остатками продленного мотива активного центра **HEXXHXXGXXH**. В структуре матриксинов имеется Met-поворот с высококонсервативной последовательностью AL(V)MYP, в которой остаток метионина инвариантен у всех ферментов этого семейства.

Матриксины произошли от простых, не мозаичных белков, но в ходе эволюции к С-концу пептидазного домена присоединились дополнительные домены. Самым маленьким не мозаичным белком является матрилизин; коллагеназы и желатиназы представляют собой многодоменную структуру. Все матриксины синтезируются как препробелки и активируются при отщеплении N-концевого пропептида.

Коллагеназа 1 (MMP-1) синтезируется как препроэнзим с 469 аминокислотными остатками [Bode et al., 1996]. Сигнальный пептид состоит из 19 аминокислот, пропептидный домен – из 80 аминокислот, каталитический домен – из 162 аминокислот, С-концевой домен – из 192 аминокислот. Между N- и С-концевыми доменами находится связывающий пептид в виде петли из 16 аминокислотных остатков. Похожая аминокислотная последовательность характерна также для нейтрофильной коллагеназы 2 (MMP-8), коллагеназы 3 (MMP-13) и других матриксинов. Молекулярная масса зрелой формы MMP-1 – 42570 Да. Сравнение аминокислотных последовательностей протеазных доменов разных матриксинов показало существенную гомологию, свидетельствующую о том, что эти ферменты эволюционировали от общего предка [Bode et al., 1996].

Изучение кристаллической структуры протеазного домена коллагеназы MMP-1 показало, что каталитический цинк связан с тремя гистидиновыми остатками в консервативном мотиве активного центра **HELGHSLGLSH** и молекулой воды. В структуре имеется Met-поворот с инвариантным Met215. Общеизвестным считается, что MMP-1, MMP-8 и MMP-13 активируются по механизму цистеинового переключателя при протеолитическом отщеплении пропептида трипсином, химотрипсином, плазмином, катепсином G, стромелизином 1 или 2 [Gomis-Rüth, 2003].

Кроме каталитического иона цинка протеазный домен коллагеназ MMP-1 и MMP-8 имеет ещё дополнительный ион цинка, а также несколько ионов кальция, необходимых для стабилизации домена, в котором отсутствуют дисульфидные связи [Gomis-Rüth, 2003]. Исследования показали, что дополнительный ион цинка не является строго необходимым для стабилизации структуры этого домена и может быть заменен на другие ионы металлов. Коллагеназа MMP-1 имеет три иона кальция, два из которых находятся в протеазном домене. Для MMP-8 также показано наличие двух ионов кальция, которые важны для поддержания стабильной структуры домена [Gomis-Rüth, 2009].

Коллагеназы осуществляют ограниченный протеолиз, расщепляя трехспиральные α -цепи коллагена типов I, II, III по связи Gly775-Leu776 или Gly775-Ile776 [Nasty et al., 1987]. Субстратами коллагеназ кроме коллагенов являются желатины, протеогликаны, α_1 -антихимотрипсин и другие. Среди синтетических субстратов лучшим для матриксинов оказался октапептид Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln. Кроме того, в синтетических субстратах ферменты могут гидролизовать также пептидные связи, если в положении P1 находится Ala, а в положении P1' – Tyr или Phe. Матриксины проявляют высокую протеолитическую активность, если в реакционной среде (pH 7,0) присутствуют ионы цинка (0,5 мМ), кальция (5 мМ), а также NaCl (100 мМ). Активность ферментов ингибируется неселективным α_2 -макроглобулином, некоторыми антибиотиками, хелатирующими агентами 1,10-фенантролином и

ЭДТА и тканевыми ингибиторами, однако селективность их низка [Gomis-Rüth, 2003].

2.4 Адамализины/репролизины

К семейству адамализинов/репролизинов (MEROPS M12B) относятся две большие группы ферментов: адамализины и репролизины. Адамализины выделены из репродуктивных тканей животных, в основном мышей, крыс, кроликов и человека, и обозначаются как металлопротеиназы ADAM_s (a disintegrin and metalloprotease). Репролизины выделены из яда различных змей и обозначаются SVMP_s (snake yenom metalloproteinases). В настоящее время обнаружены более 200 видов змеиного яда, содержащих 50-60 белков и пептидов с различными структурами и функциями. Компоненты яда включают нейротоксины, кардиотоксины, различные факторы роста, дезинтегрины, брадикинин–потенциальные белки, ферменты (протеазы, фосфолипазы, фосфодиэстеразы, холинэстеразы, аминотрасферразы, каталаза, АТФаза, гиалуронидаза и др.) и белковые ингибиторы. В семейство репролизинов входят адамализин II, атролизины А, В, С, Е, F, атраксазы, акутолизины, тримерелизины и другие ферменты, многие из которых представляют собой мультидоменные белки [Matsui et al., 2000]. Обнаружено более 100 репролизинов из 36 видов змей, однако установлено, что многие из них являются изоэнзимами, выделенными из одного вида змей. Так, из яда *Crotalus atrox* было выделено 13 репролизинов, половина из которых является изоэнзимами, как это показано для атролизинов В, С и атраксаз, у которых аминокислотные последовательности практически идентичны (98%).

Все репролизины в протеазном домене имеют цинксвязанный мотив активного центра **HEXXHXXGXXH** и Met-поворот, характерный для всех ферментов клана метцинкинов. Протеазный домен имеет длинный С-конец, состоящий из набора не пептидазных доменов, аналогичных для высокомолекулярных астациноподобных эндопептидаз. Все репролизины разделяются на 4 класса по количеству включенных доменов и молекулярной массе [Gong et al., 1998, Grams et al., 1993].

Класс 1. Маленькие репролизины с молекулярной массой 20-30 кДа, зрелая форма которых содержит только протеазный домен. Представители класса – адамализин II, атролизины В, С, акутолизин А, В, С.

Класс 2. Энзимы средних размеров с молекулярной массой 30-50 кДа, имеющие кроме протеазного домена дезинтегриновый домен (атролизин Е, билитоксин, акутолизин D).

Класс 3. Репролизины и большинство геморрагических токсинов с молекулярной массой 50-80 кДа, содержащие протеазный домен, дезинтегриновый домен и цистеин-богатый домен (атролизин А).

Класс 4. Энзимы с молекулярной массой 80-100 кДа, содержащие четвертый лектиноподобный домен (металлопротеиназа из яда *Vipera russelli*).

Некоторые ферменты класса I можно назвать геморрагическими токсинами. Они разделяются на два подкласса: подкласс 1-А с сильной геморрагической активностью и подкласс 1-В со слабой или без геморрагической активности. Так, адамализин II *Crotalus adamanteus* не обладает геморрагической активностью, атролизин С имеет слабую геморрагическую активность и они относятся к подклассу 1-В, в то время как акутолизин А обладает сильной геморрагической активностью и называется геморрагической протеиназой. Оптимальная протеолитическая активность этих ферментов проявляется в слабощелочных условиях (рН 7,5) и в 100 раз выше, чем при рН 5,0. Хелатирующие агенты ингибируют как протеолитическую, так и геморрагическую активность [Matsui et al., 2000]. Кроме каталитически важного цинка у этих ферментов имеется ион кальция на поверхности молекулы, который связывается с 7 или 6 атомами кислорода в слабокислых и щелочных условиях соответственно, способствуя структурной стабильности каталитического домена [Gong et al., 1998]. Репролизины синтезируются и хранятся в ядовитой железе змеи как неактивные зимогены. Ферменты имеют 3 остатка цистеина, один из которых участвует в механизме активации этих эндопептидаз [Grams et al., 1993]. Установлено, что каталитическая и геморрагическая активности акутолизина А не связаны между собой. Вероятно,

они обладают различной способностью связываться с белками мембраны клеток капилляров. Субстратная специфичность репролизинов определяется по гидролизу казеина, В-цепи инсулина, фибриногена. Эти ферменты осуществляют ограниченный протеолиз природного субстрата по одной-двум пептидным связям. Так, тримерелизины 1 и 2 предпочтительно расщепляют α -цепь фибриногена по связи Pro516-Met517, металлопротеиназа из яда кобры *Naja* при длительной инкубации осуществляет ограниченный протеолиз α -цепи человеческого фибриногена по двум связям Lys413-Leu413 и Phe501-Asp502 [Matsui et al., 2000].

В группу ферментов ADAM_s входит большое количество эндопептидаз млекопитающих. Их третичная структура, как и репролизинов представляет собой сплюсненную эллипсоидную форму, они характеризуются наличием протеолитической активности и большого набора дополнительных доменов, находящихся на С-конце протеазного домена. Доменная структура ферментов ADAM_s состоит из продомена, металлопротеазного домена, уникального дезинтегринового домена, отвечающего за связывание с интегрином или другими рецепторами клеточной поверхности, цистеин-богатого домена, EGF-подобного домена, трансмембранного домена и цитоплазматического якоря.

Эти ферменты обнаружены у позвоночных, а также у *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* и *Xenopus*, но отсутствуют у микроорганизмов *E. coli*, *Sacchramyces cerevisiae* и растений. Почти все ферменты имеют изоформы, которые не содержат функциональных различий, но могут иметь разную локализацию. Так, у эндопептидазы ADAM 12 обнаружено 2 изоформы, одна из которых – мембраносвязанный белок, другая – секретируемый. Эндопептидаза ADAM 28 человека тоже имеет две изоформы, одна секретируется в селезенке, вторая, мембраносвязанная форма, специфична для лимфатических узлов [Seals et al., 2003].

Эндопептидазы ADAM_s содержат на N-конце сигнальную последовательность, необходимую для секреции белка, и пропоследовательность (продомен), функционирующую при созревании

фермента, основная функция которой *in vivo* состоит в поддержании фермента в неактивном состоянии. При протеолитическом отщеплении пропептида протеазный домен приобретает протеолитическую активность. Однако, для некоторых ферментов ADAM_s показано, что они могут подвергаться аутокаталитической активации. Второй функцией продомена является участие в качестве шаперона для корректного фолдинга металлопротеазного домена и структурирования активного центра [Seals et al., 2003].

Свойства ферментов ADAM_s хорошо изучены. pH-Оптимум активности находится в интервале pH 7-9 и незначительно изменяется при добавлении миллимолярных количеств ионов Ca²⁺. Протеолитическая активность подавляется цинковыми хелаторами (1,10-фенантролин, ЭДТА), неселективными пептидными гидроксаматами, конкурентно связывающимися с активным центром эндопептидаз, и дитиотреитолом, но не фосфорамидоном – ингибитором термолизиноподобных эндопептидаз. Тканевые ингибиторы металлопротеаз (TIMP_s), проявляющие высокую эффективность при ингибировании матриксинов (MMP_s), ингибируют также активность многих эндопептидаз ADAM_s. Изучение мутаций в продоменах показало, что механизм активации этих ферментов связан не только с механизмом цистеинового переключения, но может быть связан также с конформационными изменениями в продоме [Seals et al., 2003].

Итак, все представители клана метцинкинов, несмотря на структурное разнообразие, включают две строго консервативные последовательности – продленный мотив активного центра HEXHXXGXXH, координирующий каталитически значимый атом цинка, и структуру Met-поворота, которая также может содержать один из лигандов (семейства астацинов и сerratилизинов) (рис. 2). Особенности семейства астацинов являются Glu в положении 12-й аминокислоты в мотиве активного центра, являющийся ключевым остатком в процессе активации фермента, N-концевое расположение пропептида, а также консервативный Tug в структуре Met-поворота. Сerratилизины также содержат «тирозиновый переключатель», но последовательность, выполняющая роль

сигнального пептида, расположена у них на С-конце фермента. Все серрализины – прокариотические белки. Матриксные металлопротеиназы (матриксины) обнаруживаются у представителей всех царств живой природы, однако преимущественно это мультидоменные ферменты высших млекопитающих. Для матриксинов характерно N-концевое расположение сигнального пептида. В семейство адамализинов/репролизинов входят исключительно ферменты высших эукариот. Характерной особенностью этого семейства является Asp в положении 12-й аминокислоты в продленном мотиве активного центра (рис. 2). В отличие от Glu астацинов, функция Asp не ясна, но его присутствие является классификационным признаком семейства адамализинов/репролизинов. Сигнальная последовательность у представителей этого семейства также расположена на N-конце молекулы белка.

Метцинкиновые металлопротеиназы	мотив активного центра												Met- поворот				
	порядковый номер аминокислоты в мотиве																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5
АСТАЦИНЫ	H	E	X	X	H	X	X	G	X	X	H	E	S	X	M	X	Y
СЕРРАЛИЗИНЫ	H	E	X	X	H	X	X	G	X	X	H	P	S	X	M	X	Y
МАТРИКСИНЫ	H	E	X	X	H	X	X	G	X	X	H	S	A	X	M	X	P
АДАМАЛИЗИНЫ/ РЕПРОЛИЗИНЫ	H	E	X	X	H	X	X	G	X	X	H	D	C	X	M	X	P
ТЕРМОЛИЗИН	H	E	X	X	H												нет

Рис. 2. Мотив активного центра и Met-поворот метцинкиновых металлоэндопептидаз. Жирным шрифтом выделены консервативные аминокислоты, курсивом выделены аминокислоты в 12-м положении мотива активного центра [Jiang et al., 1992b].

3. Структурные особенности метцинкиновых эндопептидаз

Третичные структуры некоторых представителей клана метцинкинов хорошо изучены. На рисунке 3 представлена третичная структура протеазного домена астацина *Astacus astacus*, полученная с разрешением в 1,8 Å, которая является базовой моделью при сравнительном изучении метцинкиновых эндопептидаз [Bode et al., 1992]. Молекула астацина имеет форму глобулы, разделяющуюся на два субдомена (N- и С-домены) глубокой, узкой и длинной щелью, на дне которой находится каталитически активный цинк. N-домен астацина представляет собой N-концевую часть полипептидной цепи, имеет упорядоченную структуру, состоящую из четырех изогнутых широких параллельных и одной антипараллельной β-полосок и двух длинных α-спиралей (рис. 3).

С-домен варьирует по величине и форме у разных астациноподобных энзимов. Он начинается после консервативного глицинового остатка Gly99, при этом формируется менее упорядоченная структура, содержащая только одну α-спираль.

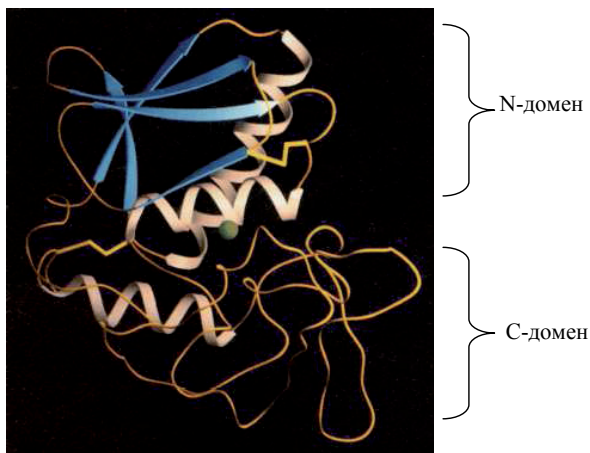


Рис. 3. Пространственная структура астацина. Каталитический ион цинка изображен в виде сферы [Bode et al., 1992]

Оба домена ковалентно связаны дисульфидным мостиком Cys42-Cys198, другой консервативный дисульфидный мостик Cys64-Cys84 располагается рядом с активным центром белковой глобулы. Консервативность цистеиновых остатков, формирующих внутримолекулярные связи в протеазном домене астацина и астациноподобных эндопептидаз, подтверждает предположение о том, что эти связи необходимы для поддержания третичной структуры белка. Интересно отметить характерные особенности термолизиноподобных ферментов и метцинкинов. При сравнении структур ферментов этих семейств установлены некоторые отличия. Аминокислотная последовательность термолизина на 1/3 длиннее, чем каталитический домен метцинкинов. В отличие от метцинкинов, вторичная структура термолизина состоит, в основном, из α -спиралей, лишь одна из которых отдаленно напоминает спираль hC в метцинкинах [Stöcker et al., 1995]. Однако, несмотря на эти различия, имеется много общего между этими ферментами.

Цинк-связанные регионы астацина, астациноподобных эндопептидаз, серрализинов, протеиназ семейства адамализинов/репролизинов, матричных протеиназ, а также термолизина и термолизиноподобных эндопротеиназ схожи между собой, что позволяет предположить общую модель связывания цинка в этих белках. В мотиве активного центра астацина **HELMHAIGFYH** расположение первых двух цинковых лигандов His92 и His96 и активированной молекулы воды, находящейся между ионом цинка и остатком глутаминовой кислоты Glu93, аналогично расположению гистидиновых остатков в активном центре термолизина **HELTN**, что указывает на сходство в каталитическом центре астацина и термолизина и подтверждает предположение о том, что ферменты этих семейств произошли от общего предка.

Консервативный остаток глицина Gly99 в астацине, осуществляющий резкий поворот полипептидной цепи к иону цинка, играет важную роль в правильной конформации активного центра. В результате этого поворота имидазольное кольцо His102 располагается напротив иона цинка и формирует третий цинковый лиганд (рис. 4) [Bode et al., 1992, 1993, Yiallourous et al., 2002].

Рядом с цинковым лигандом His92 в активном центре астацина находится остаток глутаминовой кислоты Glu93, играющей важную роль в катализе. Ранее для термолизина было показано, что остаток глутаминовой кислоты Glu143, (нумерация по термолизину), входящий в активный центр **HEXXH**, переносит протон от активированной молекулы воды к расщепляемой пептидной связи, участвуя в акте катализа. Поэтому предположили, что в молекуле астацина роль каталитического основания может выполнять остаток Glu93 (нумерация по астацину), находящийся в продленном мотиве активного центра.

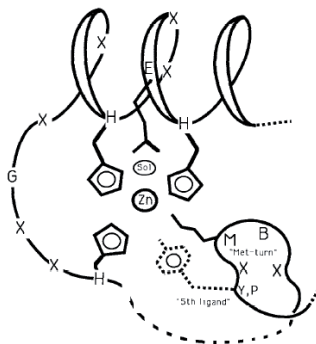


Рис. 4. Цинксвязанный мотив активного центра и Met-поворот в структуре молекулы астацина [Bode et al., 1993]. Имидазольные группы His92, His96 и His 102, активированная молекула воды и Tyr149 являются цинковыми лигандами

Для выяснения роли остатка Glu93 сайт-направленным мутагенезом был получен астациновый мутант Glu93Ala, где остаток глутаминовой кислоты был заменен на нефункциональный остаток аланина. Мутантный белок в концентрации, в 350 раз превышающей концентрацию исходного фермента, не гидролизует желатин и высоко чувствительный флуоресцентный субстрат Dns-Pro-Lys-Arg-Ala-Pro-Trp-Val. Этот эксперимент подтвердил предположение о важной роли Glu93 как каталитического основания в молекуле астацина. Glu93, являясь акцептором протона, поляризует молекулу

воды, которая становится четвертым цинковым лигандом и участвует в каталитическом акте [Yiallourous et al., 2000].

Следует отметить, что в мотиве активного центра метцинкинов после третьего гистидинового лиганда цинка расположен аминокислотный остаток, который типичен только для каждого из четырех семейств этого клана. В астаине этот остаток – глутамат, в матриксинах – в большинстве случаев серин (или треонин в стромелизине [Rawlings et al., 1990]), в серпализинах – инвариантный остаток пролин [Baumann et al., 1993, 1994]. В семействе адамализинов/репролизинов этот строго консервативный остаток – аспаргат [Gomis-Rüth et al., 1994], играющий важную структурную роль. Учитывая особое значение этого остатка у разных семейств ферментов метцинкинов, многие исследователи считают, что его можно также отнести к мотиву активного центра [Bode et al., 1995, Jiang et al., 1992b, Gomis-Rüth et al., 1993, Stocker et al., 1995]. Так, было установлено, что в зрелом астаине Glu103, расположенный после третьего гистидинового лиганда, ориентирован с помощью молекулы воды таким образом, что образуется солевой мостик с N-концевым остатком Ala1. Замена Glu103 на Gln или Ala оказывает незначительное влияние на катализ, но делает фермент экстремально нестабильным. Таким образом, связь между Glu103 и Ala1 является важной в стабилизации молекулы зрелого астаина [Yiallourous et al., 2002, Bode et al., 1992, 1993]. Кроме того, было показано, что Glu103 играет важную роль в процессе активации фермента. Активация астаина происходит в несколько этапов, в процессе которых осуществляется последовательное отщепление пептидов с N-конца молекулы фермента. Последним этапом является гидролиз связи $\text{Glu}^{-1}\text{-Ala}^1$, высвобождающей Ala в качестве N-концевой аминокислоты зрелого белка. Glu103 осуществляет поддержание сети водородных связей с тремя молекулами воды, которая координирует N-концевую область фермента таким образом, что связь $\text{Glu}^{-1}\text{-Ala}^1$ становится доступной для гидролиза другими протеиназами или же для аутокаталитического расщепления. В случае аутокаталитической активации астаина именно Glu103, расположенный в

непосредственной близости к третьему лиганду (His102) обеспечивает доступ гидролизуемой связи к активному центру фермента [Guevara et al., 2010].

Металлоэндопептидазы метцинкинового клана формируют метиониновый изгиб, содержащий консервативный остаток Met147 (нумерация по астацину) (рис. 3). Метионин – это достаточно редко встречающаяся аминокислота (третья после триптофана и цистеина), поэтому её обязательное присутствие в структуре Met-поворота у всех метцинкинов является удивительным фактом [Walasek et al., 2005]. Как показали эксперименты, эта аминокислота не играет ключевой роли для проявления каталитической активности. Так, в эндопептидазе MMP2 (желатиназа А) при замене метионина в Met-повороте на лейцин или серин были отмечены лишь минимальные изменения каталитической активности [Butler et al., 2004]. В протеазе С из *Erwinia chrysanthemi* (PrtC) замена метионина на лейцин, аланин и изолейцин не привела к изменению стабильности, но было обнаружено небольшое уменьшение активности мутантных белков. Кристаллографическое исследование мутантных белков показало изменение в геометрии имидазольного кольца боковой цепи, что, по-видимому, повлияло на связывание цинка с гистидинами активного центра [Oberholzer et al., 2009]. Метионин Met-поворота эндопептидазы AprA *P. aeruginosa* был заменен на L-дифторметионин, оказывающий, в отличие от лейцина и изолейцина, минимальное стерическое воздействие за счет двух атомов фтора. Эта замена привела к небольшому изменению каталитической активности мутантного белка по сравнению с диким типом, термостабильность белков при этом не изменилась. Таким образом, установлено, что замена метионина в Met-повороте не оказывает особого влияния на каталитическую активность метцинкиновых эндопептидаз. Наличие Met-поворота считается структурным маркером всех метцинкинов; его аминокислотная последовательность SI(L,V)MHY у астациноподобных ферментов высококонсервативна, однако остаток тирозина Tyr149 обнаруживается в этом повороте только у этого семейства и семейства серрализинов. Tyr149, отдавая протон, образует водородную связь с цинком и

становится пятым цинковым лигандом [Stöcker et al., 1995b]. Было предположено, что этот уникальный «тирозиновый переключатель» играет специфическую роль в процессе катализа. С помощью сайт-направленного мутагенеза был получен мутантный астацин Tyr149Phe, который сохранял некоторую протеолитическую активность. Это свидетельствует о том, что Tyr149 не является критическим для катализа, но он, вероятно, ответственен за связывание фермента с субстратом и/или стабилизацию переходного состояния во время каталитического акта [Yiallourous et al., 2000]. Участие Tyr149 в субстратном связывании подтверждено при изучении абсорбционных спектров Cu-астацинового мутанта [Gomis-Rüth et al., 1994a].

Пятый цинковый лиганд, являющийся донором протона в реакции катализа, не известен для семейств матриксинов и адамализинов/репролизинов, у которых остаток Tyr149 заменен, в основном, на нефункциональный остаток пролина, не принимающий участия в каталитическом акте (рис. 4). Эти эндопептидазы содержат цистеин в N-концевом пропептиде, который отщепляется при протеолитическом процессинге. Так, в пропептиде эндопептидаз змеиного яда (адамализин II) идентифицирована консервативная последовательность PKMCGVT, в которой тиоловая группа цистеина связана с цинком активного центра зимогена, предотвращая тем самым активацию фермента. При удалении пропептида снимается ингибирующее действие цистеина и возникает связь цинка с активированной молекулой воды (четвертый цинковый лиганд), необходимой для осуществления катализа [Grams et al., 1993, Hite et al., 1992, Stöcker et al., 1995a]. Подобный механизм цистеинового переключателя был обнаружен в продоменах стромелизина-1 (про MMP-3) и желатиназы А (про MMP-2 и других ферментах семейства матриксинов), в которых цистеин консервативной последовательности PRCGVPD связывался с цинком активного центра протеазного домена, поддерживая молекулу фермента в неактивном состоянии. Протеолитический процессинг активировал молекулу фермента. Установлено, что Asp232 консервативен почти для всех матриксинов, который, по видимому,

способствует фиксации N-конца активированного энзима. Замена Asp232 на Туг приводит к альтернативному способу проэнзимной активации [Sato et al., 1994]. Механизм блокирования активного центра (цистеиновый переключатель) предполагают у лейшманолизина, продомен которого содержит консервативную последовательность HRCIND [Gomis-Rüth et al., 2003].

Однако, существуют другие способы активации матричных металлопротеиназ и адамализинов/репролизиннов. Ферменты этих семейств могут быть активированы при связывании цистеинового остатка консервативной последовательности, расположенной на N-конце протеазного домена, с различными реагентами, взаимодействующими с сульфгидрильной группой [Grams et al., 1993, Springman et al., 1990], при этом разрушается связь между цинком и цистеиновым остатком. К таким реагентам относятся следующие вещества:

1. Соли ртути Hg(II) и pCMB, которые связываются с сульфгидрильной группой, образуя соединение Cys-S-Hg(II).
2. Дисульфидные соединения, такие как DTNB (5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота), могут осуществлять дисульфидный обмен с Cys-SH с образованием дисульфида Cys-S-S-R
3. N-этилмалеимид (NEM) может алкилировать сульфгидрильную группу, образуя соединения Cys-S-R
4. NaOCl может окислять сульфгидрильную группу до цистеиновой кислоты Cys-SO₃H

Было показано, что взаимодействие таких реагентов с сульфгидрильной группой Cys73 в продоме матричной протеиназы MMP1 приводило к расщеплению связи между Cys73 и ионом цинка активного центра. Этот разрыв связи «переключает» цинк из неактивного состояния в активное, создавая четвертый цинковый лиганд с молекулой воды, в результате чего образуется функционально активная молекула фермента. Авторы считают, что формирование каталитически компетентного активного центра и появление коллагеназной активности может предшествовать аутолитическому или

протеолитическому отщеплению пропептида. Такой механизм регуляции «цистеиновым переключателем» возможен также для ферментов семейства адамализинов/репролизинов [Springman et al., 1990].

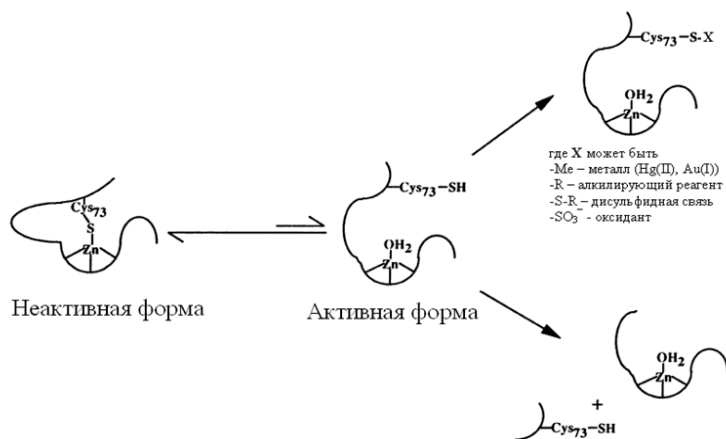


Рис. 5. Модель альтернативных биохимических способов активации зимогенов матричных эндопептидаз [Springman et al., 1990]

4. Функциональная роль и перспективы применения метцинкинов

Эндопептидазы метцинкинового клана являются одними из ключевых ферментов в биологических системах. Они играют важнейшую роль в жизни и здоровье человека, поэтому изучение их функциональной роли является приоритетным направлением в биологии, медицине и биотехнологии.

Расщепление пептидных связей – жизненно важный процесс. Метцинкины функционируют не только как неспецифические ферменты деградации белков потребления, но они вовлечены в эволюционную регуляцию и высокоспецифичный процессинг предшественников белков с образованием зрелых функциональных ферментов и структурных белков. Эти ферменты являются основными в регуляции активности других белков в развивающихся и зрелых системах: цитокинов, факторов роста, других протеиназ. В зрелых системах они вовлечены в деградацию экстрацеллюлярных матриксов через

нормальную тканевую дифференцировку. Повреждение регуляторных механизмов приводит к возникновению и развитию патологических процессов: ревматоидных артритов, онкологических заболеваний и метастазирования, а также к обострению хронических заболеваний.

Астациноподобные эндопептидазы принимают участие в процессах развития, включая развитие зародыша и морфогенез, ремоделирования и дифференцировки тканей, содействуя образованию хрящей и костей и биосинтезу коллагена [Gomis-Rüth et al., 2003]. Большая группа астациноподобных протеиназ, таких как протеиназа BMP1 (костный морфогенетический белок 1) и толлоидные эндопептидазы *Drosophila melanogaster* выполняют ключевую роль в формировании и регуляции экстрацеллюлярного матрикса. Они активируют проколлаген, про-протеогликан и другие предшественники матриксных белков, способствуя правильной сборке экстрацеллюлярного матрикса [Ge et al., 2006]. Среди астациноподобных эндопептидаз есть весьма гетерогенная группа ферментов (так называемые *hatching* энзимы), которая ответственна за деградацию эмбриональной пленки при вылуплении эмбриона из яйца ракообразных, рыб, лягушек, птиц и животных. И, наконец, функция третьей большой группы астациноподобных протеиназ, мепринов, как было установлено, связана с развитием. Уровень кишечного меприна α у мыши во время вскармливания выше, чем меприна β . Окончание вскармливания и переход на твердую пищу характеризуется понижением уровня меприна α и повышением уровня меприна β . Уровень меприна катастрофически падает при возникновении и развитии таких болезней человека, как гидронефрит, нефропатия, нефрит, при почечной трансплантации, что ведет к гибели клеток ткани [Sterchi et al., 2008].

Полагают, что одна из функций серрализинов связана с вирулентным фактором, вызывающим различные инфекции у новорожденных и после хирургических операций. Эти ферменты участвуют в возникновении таких заболеваний, как эндокардит, пиелонефрит, дерматит, сепсис, пневмония, ведут к деградации мягких тканей и мембран кишечных эпителиальных клеток и

вызывают диарею у крупного рогатого скота, а также вызывают заболевания, похожие на заболевания при бактериальной инфекции: воспалительные процессы, столбняк, ботулизм, газовая гангрена, бактериальный менингит, сибирская язва. Кроме человека, эти эндопептидазы могут инфицировать другие организмы, при этом развитие инфекции коррелирует с увеличением протеолитической активности. Показано, что серрализины *S. marcescens* и *P. aeruginosa* способны убивать нематоды с помощью токсина, инфицировать растения и быть причиной сапа у лошадей. Серрализины, обладая вирулентным потенциалом грамм-отрицательных бактерий, с одной стороны могут действовать, подобно плазмин(оген)у, как противосвертывающий фактор крови и, следовательно, могли бы, вероятно, использоваться для лечения тромбозов. С другой стороны установлено, что эти ферменты могут инактивировать защитные белки (иммуноглобулины, гамма-интерферон), белковые ингибиторы, лизоцим, трансферрин, белки комплемента, что ведет к истощению защитных сил хозяина [Walasek et al., 2005].

Эти свойства серрализинов сильно затрудняют разработку лекарственных препаратов. Различия в физиологических и патологических особенностях серрализинов делают необходимым глубокое изучение их структуры и функциональной роли с целью создания новых терапевтических препаратов [Gomis-Rüth et al., 2003].

Матриксные металлопротеиназы (матриксины) способны разрушать структурные компоненты экстрацеллюлярного матрикса и осуществлять внутриклеточную регуляцию различных патологических процессов. Они способствуют метастазированию раковых клеток путем уничтожения матриксных барьеров, обостряют хронические заболевания, разрушают коллаген при ревматоидном артрите, вызывают язвенные заболевания роговицы глаза, различные воспалительные процессы, в том числе кишечные, атеросклероз, менингит, болезнь Альцгеймера, активируют различные факторы роста и моделируют сигналы хемотаксиса [Walasek et al., 2005].

Хорошо изучены структурные и энзиматические свойства некоторых представителей семейства матриксинов, их различная функциональная роль в физиологических и патологических процессах. Тем не менее до сих пор задача получения лекарственных препаратов для лечения заболеваний, вызванных матриксинами, остается невыполнимой. Первоначально предполагали, что наиболее перспективным способом для лечения артритов и онкологических заболеваний может оказаться использование белковых ингибиторов небольшого молекулярного веса [Gomis-Rüth et al., 2003]. Предклинические испытания на животных дали обнадеживающие результаты, но клинические испытания показали, что используемые препараты имеют ряд серьезных недостатков. Во-первых, они дают сильные побочные эффекты. Во-вторых, поскольку белковые ингибиторы не обладают селективностью, то они ингибируют матриксные металлопротеиназы как с защитным эффектом, так и те, которые способствуют развитию патологии. Кроме того, они ингибируют также другие родственные ферменты, в частности, адамализины. Результаты проведенных экспериментов привели к разработке стратегических основ, являющихся основополагающими при создании новых лекарственных препаратов. Во-первых, это - необходимость исследования роли индивидуальных матриксных эндопептидаз в конкретном патологическом процессе и, во-вторых, это - создание высокоселективных синтетических ингибиторов [Tallant et al., 2010].

Репролизины семейства адамализинов/репролизинов ответственны, главным образом, за геморрагические эффекты и тканевые некрозы при типичных змеиных укусах. Некоторые репролизины с высокой геморрагической активностью, так называемые геморрагические токсины, способны разрушать мембраны клеток капилляров, вызывая локальное кровоизлияние, приводят к деструкции компонентов экстрацеллюлярного матрикса у жертв и ответственны за клеточную адгезию [Matsui et al., 2000]. Эндопептидазы ADAM_s, как и другие представители клана метцинкинов, вовлечены в разнообразные биологические процессы. Они расщепляют

компоненты экстрацеллюлярного матрикса, различные белки клеточной поверхности, включающие факторы роста, цитокины, клеточные компоненты адгезионных молекул и рецепторов и являются важными модуляторами клеточных сигналов и взаимодействия клетка-клетка и клетка-матрикс. Они вовлечены в клеточную миграцию, в процессы развития мышечной ткани и процессы оплодотворения. Велика их роль в возникновении и развитии таких тяжелых заболеваний как воспалительные процессы, ревматоидные артриты, онкологические болезни, старение, аллергия и астма.

Типичным представителем небольшого и мало изученного семейства паппализинов является эндопептидаза RAPP-A, выделенная из плазмы беременных. Показана её ключевая роль в развитии фолликул яичников, миогенезе, имплантации эмбриона и заживлении ран, а также возможность её применения как диагностического маркера синдрома Дауна [Gomis-Rüth et al., 2003, Tallant et al., 2006]. Известно, что отрыв атеросклеротических бляшек от стенок коронарных сосудов с последующим образованием тромба является главной причиной синдрома острой коронарной недостаточности. Недавно было установлено, что уровень экспрессии метцинкиновой эндопептидазы RAPP-A в нестабильных и оторвавшихся от стенок сосудов атеросклеротических бляшках очень высок, тогда как в стабильных бляшках он минимален [Li et al., 2008]. Причина этого явления пока не установлена; высказываются некоторые предположения. Возможно, высокий уровень экспрессии RAPP-A связан с морфологией бляшек, чувствительных к эрозии, отрыву от стенок сосудов и последующему тромбозу. При деградации экстрацеллюлярного матрикса эти эндопептидазы могут способствовать ломкости липид-богатых атеросклеротических бляшек. RAPP-A может быть специфическим активатором инсулин-подобного фактора роста, который является потенциальным посредником атеросклероза. Отмечается также, что металлоэндопептидазы могут быть потенциальными индикаторами артериального воспаления, ведущего к отрыву и разрушению бляшек. Если экспериментально будет подтверждено, что высокий уровень экспрессии RAPP-

А ассоциирован с развитием инфаркта миокарда, то лечение острой коронарной недостаточности станет возможным с помощью моноклональных антител [Li et al., 2008].

Итак, участие ферментов метцинкинового клана в возникновении и развитии патологических процессов создает необходимость глубокого изучения их структуры, энзиматических свойств и функциональной роли для разработки новых лекарственных препаратов. Поэтому метцинкины рассматриваются как фармакологические мишени при создании новых медицинских препаратов, что является одной из главных задач фундаментальных исследований в биологии, медицине и фармакологии [Sterchi et al., 2008].

5. Заключение

Классификация цинкзависимых металлоэндопептидаз (цинкинов) построена на основе структуры активного центра с учетом сходства пространственной структуры их каталитических доменов и энзиматических свойств. Анализ большого количества работ позволяет сделать несколько обобщающих выводов: модификация существующей классификации цинкинов позволяет четко распределить эти ферменты по кланам в зависимости от аминокислотных остатков в мотиве активного центра; клан метцинкинов включает несколько семейств эндопептидаз, имеющих общие характерные структурные признаки (продленный мотив активного центра протеазного домена, Met-поворот в структуре белка, пространственную структуру протеазного домена), но отличающихся по происхождению, некоторым энзиматическим свойствам (оптимум pH, субстратная специфичность), механизмам секреции и активации предшественников ферментов; физиологическая роль ферментов метцинкинового клана связана не только с важной пищеварительной функцией, но и с регуляторными механизмами, нарушение которых может привести к возникновению и развитию патологических процессов; разработка новых лекарственных препаратов связана с необходимостью глубокого изучения структурных особенностей, физико-химических свойств и функциональной роли фермента в конкретном

патологическом процессе и с созданием высокоселективных синтетических ингибиторов для индивидуальных метцинкиновых эндопептидаз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Штаммы и плазмиды

В работе использовался рекомбинантный эритромициноустойчивый штамм *B. subtilis*, который получен путем трансформации плазмиды pSA1 с геном металлоэндопептидазы в протеазо-дефицитный штамм *B. subtilis* BG2036 (предоставлен проф. Eugenio Ferrarri, Genencor Int. Inc., USA). Мультикопийная плаزمида pSA1, сконструированная на основе экспрессионного вектора pCB22 [Sorokin et al., 1990], несет полный ген металлопротеиназы *B. intermedius mprBi* под собственным промотором. Ген субклонирован с 6 кб фрагмента геномной ДНК *B. intermedius*, локализованного на плазмиде pCM4 (вектор pCM4 получен в ИМГ РАН и предоставлен для работы проф. С.В. Костровым). Нуклеотидная последовательность гена *mprBi* хранится в Международном банке генов «GeneBank» с кодом доступа ACE75740.2. Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили по методу [Anagnostopoulous, Spizizen et al., 1961].

2. Условия культивирования рекомбинантного штамма

Для культивирования клеток рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG2036 (pSA1) использованы среды следующего состава (г/л): бактериологический пептон (Sigma, США) – 17, дрожжевой экстракт (Sigma, США) – 10, NaCl – 3, CaCl₂ – 0,1, MgSO₄ – 0,1, MnSO₄ – 0,1, NH₄Cl – 0,1, pH 7,7 (пептон-содержащая среда) [Шакиров с соавт., 2000]; L-бульон (среда LB, Лурия-Бертани) (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5; pH 7,7 [Sambrook et al., 1989].

Перед посевом в среды добавляли стерильный раствор Na₂HPO₄ из расчета 0,35 г/л. Для увеличения активности металлопротеиназы и продуктивности культуры проводили оптимизацию питательной среды, варьируя содержание пептона от 10 до 30 г/л и неорганического фосфата от 0,8 до 1,6 г/л. С этой же целью исследовали влияние казеина, растворенного в дистиллированной воде, и казеиновых кислот, которые стерилизовали отдельно, в конечных концентрациях от 0,1 до 2 г/л, и вносили их в питательную среду перед засевом культуры. Соли двухвалентных металлов в конечных концентрациях: Zn²⁺ 0,5 –

3,0 мМ, Mg^{2+} 3,0 – 9,0 мМ, Ca^{2+} 4,0 – 18,0 мМ, Mn^{2+} 2,0 – 6,0 мМ и Fe^{2+} 0,5 – 2,0 мМ вносили в питательную среду перед посевом в виде стерильных растворов. Антибиотик вносили стерильно перед посевом в концентрации 1 мкг/мл. Среда стерилизовали при 1 атм.

Культивирование рекомбинантного штамма проводили на вибростенде (В. Braun, Германия) с интенсивностью качания 200 об/мин при 37°C в течение 30 ч. Соотношение объема среды к объему колбы составляло 1:5. Посевным материалом служил 16-часовой инокулят (1% v/v). Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием в течение 20 мин при 8 тыс. об/мин.

Рост бактерий контролировали по изменению оптической плотности культуры, которую измеряли нефелометрически на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при 590 нм. Количество биомассы выражали в единицах оптической плотности.

Образование спор *Bacillus subtilis* определяли с помощью подсчета клеток и спор на окрашенных по Пешкову препаратах в режиме микроскопии (микроскоп Carl Zeiss Jena, Германия) при увеличении 1600 раз в 4 полях зрения. Количество свободных спор выражали в процентах от общего числа вегетативных и спорулирующих клеток.

3. Определение локализации фермента

Локализацию металлопротеиназы определяли измерением уровня протеолитической активности по гидролизу азоказеина в клеточных фракциях. Клетки после 24, 30 и 36 часов культивирования отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (5 мин при 10 тыс. об/мин) и отмывали 0,85% раствором NaCl. Клеточную суспензию инкубировали с лизоцимом (1 мг/мл) (Sigma, США) в 10 мМ трис-HCl буфере (Sigma, США) pH 8,5 в присутствии 20% сахарозы (Реахим, Россия) в течение 25 мин при комнатной температуре. Образование протопластов контролировали микроскопированием. Протопласты отделяли центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант содержал белки клеточной стенки. Солюбилизацию

мембраносвязанных ферментов проводили обработкой протопластов раствором детергента 0,1% Тритон X-100 (Ferak Berlin, Германия) в 0,1 М трис-HCl буфере pH 8,0 с 50 mM NaCl, а также 1M NaCl с добавлением 20 % сахарозы. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре смесь центрифугировали (13 тыс. об/мин, 20 мин). Супернатант содержал белки мембраны. Для получения фракции внутриклеточных белков протопласты разрушали осмотическим шоком при добавлении 5 mM трис-HCl буфера pH 7,8 при 4°C. К смеси добавляли ДНКазу (1 мг/мл) (Koch-Light Limited, Великобритания), инкубировали 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали 30 мин при 15 тыс. об/мин. Супернатант содержал фракцию внутриклеточных белков. Чтобы исключить влияние сериновых протеиназ, активность металлопротеиназы во всех фракциях определяли в присутствии 5 mM PMSF (Serva, Германия). При определении протеолитической активности металлопротеиназы в клеточных фракциях активность выражали в ед/мг биомассы.

4. Определение белка

Белок определяли спектрофотометрически (Экспериментальные методы исследования белка и нуклеиновых кислот, 1985), считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ оптической единице (опт. ед.) в кювете толщиной 1 см, а также по методу Брэдфорд [Bradford, 1976].

5. Определение протеолитической активности

Определение протеолитической активности по гидролизу азоказеина

Протеолитическую активность металлопротеазы определяли по расщеплению азоказеина (Sigma, США) [Charney et al., 1947, Demidyuk et al., 2004]. К 100 мкл субстрата (раствор азоказеина в концентрации 10 мг/мл в 0,05 М трис-HCl буфере pH 7,3 с 5 mM Ca^{2+}) добавляли 50 мкл белка и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч, затем реакцию смесь осаждали 10% трихлоруксусной кислотой и выдерживали 10 мин на ледяной бане. Далее пробы центрифугировали 7 мин при 13 тыс. об/мин, отбирали 250 мкл супернатанта и добавляли 50 мкл 4 н NaOH. В качестве контроля использовали

субстрат, к которому сначала добавляли ТХУ, выдерживали вместе с опытными пробами в течение 1 ч при 37 °С, а затем добавляли 50 мкл фермента. Против данного контроля проводили измерение на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин.

Продуктивность культуры в отношении синтеза металлопротеиназы определяли как отношение величины протеолитической активности к величине биомассы и выражали в % или в усл. ед. Удельную активность определяли как отношение протеолитической активности к единице белка и выражали в ед/мг белка.

Определение казеинолитической активности

Протеолитическую активность определяли по методу Каверзневой, используя в качестве субстрата казеин (Serva, Германия) [Каверзнева, 1971]. Казеин в концентрации 2% растворяли в 0,1 М Трис-НСl буфере, pH 9,0. Смесь из 1 мл казеина и 1мл культуральной жидкости инкубировали 15 мин при 37°С, осаждали 2 мл 5%-ной ТХУ и инкубировали при той же температуре еще 20 мин, затем фильтровали через бумажный фильтр. К 1 мл фильтрата добавляли 5 мл 6%-ной Na₂CO₃ и 1 мл реактива Фолина. Смесь ставили на 20 мин в темноту для полного проявления окраски, а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 670 нм на ФЭКе. Параллельно ставили контроль на свободный тирозин следующим образом: смешивали 1 мл культуральной жидкости и 2 мл 5%-ной ТХУ и инкубировали 20 мин при 37°С, после чего добавляли 1 мл 2%-ного казеина и выдерживали еще 15 мин при той же температуре. С фильтратом поступали, как описано выше. Протеолитическую активность рассчитывали по формуле:

$$ПА = \frac{(D_0 - D_k) \cdot 28 \cdot P}{15}, \text{ где}$$

D_0 - D_k – разность поглощения опытной и контрольной пробы при 670 нм;

28 – коэффициент, учитывающий разведения в процессе определения активности,

P – предварительное разведение ферментного раствора,

15 – время инкубации, мин.

По калибровочной кривой, предварительно построенной для тирозина, определяли количество тирозина (мкг) для величины $D_o - D_k$, затем по формуле рассчитывали казеинолитическую активность. Для перевода в мкМ расщепленного субстрата полученную величину делили на 181 (1 мкМ тирозина = 181 мкг).

За единицу казеинолитической активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкМ тирозина за 1 мин на 1 мл ферментного раствора.

6. Выделение и очистка протеиназы рекомбинантного штамма

Для выделения фермента использовали бацитрацин-силохром, синтезированный на химическом факультете МГУ г. Москва [Stepanov et al., 1983], ДЭАЭ-целлюлозу (Sigma, США), бутил-сефарозу HiTrap (Pharmacia, США).

Выделение фермента

Выделение металлопротеиназы *B. intermedius* из 1 л культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* проводили с помощью дробного фракционирования сульфатом аммония с разными интервалами насыщения: 0,3-0,8; 0,2-0,8; 0,3-0,7 и 0,2-0,7. Сульфатаммонийную фракцию диализовали против 0,05М трис-HCl буфера pH 7,3 до исчезновения следов сульфата аммония (контроль - 5%-й раствор BaCl_2). Очистку диализата сульфатаммонийной фракции проводили на колонке (1x13 см) с бацитрацин-силохромом, уравновешенным 0,05М трис-HCl буфером pH 7,3, с 5 мМ Ca^{2+} . Элюцию проводили тем же буфером, содержащим 1М NaCl и 7% изопропанола. Фракции с высокой протеолитической активностью объединяли и диализовали против 0,05 М трис-HCl буфера pH 7,3 с 5 мМ Ca^{2+} .

Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе

Полученный после очистки на бацитрацин-силохроме и диализа против 0,01М трис-HCl буфера pH 8,0 с 5 мМ Ca^{2+} ферментный раствор помещали на

колонку (1x7см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной тем же буфером. Элюцию проводили тем же буфером, содержащим 0,6 М NaCl. Активные фракции белка объединяли и диализовали против 0,05 М трис-HCl буфера pH 7,3 с 5 мМ Ca^{2+} .

Очистка фермента на гидрофобном носителе бутил-сефарозе

Для осуществления связывания металлопротеиназы с гидрофобным сорбентом в раствор фермента необходимо внести сульфат аммония до концентрации, близкой к той, при которой фермент теряет активность и выпадает в осадок. Экспериментально установлено, что такой концентрацией является концентрация сульфата аммония 35%. На колонку с бутил-сефарозой объемом 1 мл, уравновешенной 0,05 М трис-HCl буфером pH 7,3 с 5 мМ Ca^{2+} , содержащим 35% сульфата аммония, помещали фермент, отдиализованный против 0,05 М трис-HCl буфера pH 7,3 с 5 мМ Ca^{2+} , содержащим 35% сульфата аммония. Элюцию проводили тем же буфером с понижением концентрации сульфата аммония до 20-15%.

Полученные после ионообменной хроматографии на бутил-сефарозе фракции собирали и диализовали против 0,05М трис-HCl буфера pH 7,3 с 5 мМ Ca^{2+} .

7. Электрофорез в ПААГ

Степень чистоты полученных препаратов и молекулярную массу определяли методом электрофореза в 12,5%-ном ПААГ в присутствии SDS по методу Лаэммли [Laemmli, 1970]. Концентрация акриламида в геле составляла 12,5%, бис-акриламида – 0,12%. Электродный буфер содержал 20,6 мМ трис-HCl и 0,24 М глицина, pH 8,3 -8,4. В верхний буфер добавляли SDS до концентрации 0,1 %. Пробу готовили следующим образом: к раствору белка добавляли равный объем раствора, содержащего 24% глицерина, 4% SDS, 10% меркаптоэтанола и инкубировали 5 мин при 100°C. Оптимальное количество белка, наносимого на одну дорожку геля, равно 5 мкг. Электрофорез проводили в следующем режиме: первые 30 мин сила тока была равна 20 мА, затем силу тока увеличили до 40 мА. Фиксировали гель в растворе, содержащем 45 %

этанол и 10% уксусной кислоты в течение часа. Затем гель окрашивали Кумасси (Serva, Германия) ярко-голубым (0,2% Кумасси 45% метанола или этанола, 10% уксусной кислоты) в течение 15-20 мин, после чего отмывали в 7% уксусной кислоте и высушивали. В качестве маркеров использовали: BSA (66 кДа), альбумин (45 кДа), папаин (21 кДа), лизоцим (14,4 кДа) (Sigma, США).

Также проводили окраску геля раствором $ZnCl_2$ (http://www.molbiol.ru/protocol/17_03.html). Чувствительность данного метода составляет 30 нг белка. В последнем случае гель предварительно выдерживали в течение 10 мин в 0,2 М растворе имидазола, а затем переносили в 0,3 М раствор $ZnCl_2$. В результате наблюдалось негативное окрашивание белковых полос. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду.

Молекулярную массу фермента определяли электрофоретически, используя маркерные белки, а также на основании последовательности гена *mprBi* с использованием ресурса <http://www.expasy.net/tools/>.

8. Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы MprBi

Для выяснения влияния ингибиторов на активность металлопротеиназы фермент выдерживали в присутствии реагента в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего определяли остаточную активность по гидролизу азоказеина. Остаточную активность выражали в процентах относительно контроля, активность которого принимали за 100 % в отсутствие ингибиторов в реакционной смеси. В работе использовали: специфический ингибитор сериновых протеиназ PMSF, ингибиторы металлопротеиназ ЭДТА и 1,10-фенантролин, а также pCMB, $HgCl_2$ и белковый ингибитор трипсина. Ингибиторы добавляли к раствору фермента в конечных концентрациях 0,5 мМ и 5 мМ.

9. Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF)

Фракцию гомогенного препарата металлопротеиназы анализировали с помощью метода масс-спектрометрии. Метод основан на расщеплении белка трипсином с последующей идентификацией полученных при расщеплении

пептидов различной молекулярной массы. Раствор фермента обрабатывали трипсином по методике, изложенной на сайте (<http://www.bioc.uzh.ch>). Полученные пептиды различной молекулярной массы идентифицировали на масс-спектрометре Vision 2000 TOF («ThermoBioanalysis», Великобритания). Полученные данные обрабатывали с помощью программ Peptide Mass Fingerprint (<http://www.matrixscience.com>) и Peptide Mass (<http://cn.expasy.org>).

10. Определение N-концевой последовательности белка

N-концевую аминокислотную последовательность белка определяли методом Эдмана на приборе Model 816 Protein Sequences (Гиссен, Германия) с использованием анализатора 120A PTH (Applied Biosystems, США).

11. Определение субстратной специфичности фермента

Субстратную специфичность металлопротеиназы определяли по гидролизу синтетических субстратов Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-NH₂, Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg, Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg, Dnp-Gly-Gly-Lys, Dnp-Gly-Gly-Leu-Arg, Dnp-Ala-Ala-Val-Arg по методу Люблинской [Люблинская с соавт., 1987]. К 200 мкл раствора субстрата в 0,05М Трис-НСl буфере pH 7,0, содержащем 10 мМ CaCl₂, прибавляли 200 мкл этого же буфера и 50 мкл раствора фермента, инкубировали 30 мин при 37 °С, останавливали реакцию прибавлением 40 мкл 50% уксусной кислоты. Для отделения нерасщепленного субстрата от продуктов гидролиза реакционную смесь разделяли на микроколонке с SP-сефадексом C-25 (Pharmacia, Швеция), промывали 400 мкл 1 М уксусной кислоты, элюировали 1,2 мл 1 М уксусной кислоты и измеряли поглощение на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при 360 нм в кювете толщиной 1 см.

Протеолитическую активность рассчитывали по формуле:

$$\text{ПА} = \frac{A_{360} \cdot 1,2 \cdot v}{15 \cdot t \cdot a}, \text{ где}$$

1,2 – объем измеряемой пробы (мл),

15 – коэффициент молярной экстинкции Dnp-группы при 360 нм,

t – время инкубации (мин),

a – количество фермента в пробе (мл),

v – разведение раствора фермента.

За единицу активности принимали активность такого количества фермента, которое в данных условиях гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин.

Специфичность металлопротеиназы определяли также по гидролизу природных субстратов: В-цепи окисленного инсулина, казеина по Гаммерстену и яичного альбумина (Sigma, США). Анализ полученных после гидролиза В-цепи пептидов проводили с помощью метода масс-спектрометрии MALDI-TOF (<http://expasy.net/tools>). Специфичность металлопротеиназы по гидролизу казеина по Гаммерстену (Sigma, США) и яичного альбумина (Sigma, США) определяли по методу Каверзневой как описано выше.

12. Каталитические и энзиматические свойства металлопротеиназы MprBi

Кинетические константы

K_m для металлопротеиназы *B. intermedius*, секретируемой *B. subtilis*, определяли по гидролизу азоказеина. Расчеты проводили при помощи графика, построенного в координатах Лайнуивера–Берка в программной среде «Excel». Каталитическую константу $k_{кат}$ рассчитывали по формуле:

$$k_{кат} = V_{max}/[E],$$

где $[E]$ – концентрация фермента.

Изоэлектрическую точку фермента определяли на основе аминокислотной последовательности с использованием ресурса <http://www.expasy.net/tools/>.

pH-оптимум и pH-стабильность

pH-Оптимум активности фермента определяли по гидролизу азоказеина в 0,05 М трис-НСl буфере с 5 мМ Ca^{2+} в интервале значений pH от 7,2 до 9,5. Для определения pH-стабильности фермент предварительно инкубировали в 0,05 М трис-НСl буфере при значениях pH от 7,2 до 9,5 в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего определяли активность по стандартной методике.

Температурный оптимум и термостабильность

Температурный оптимум фермента определяли по гидролизу азоказеина в 0,05 М Трис-НСl буфере pH 8,0 с 5 мМ Ca^{2+} , инкубируя реакционную смесь при температурах 22, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70° С.

При изучении термостабильности растворы фермента предварительно инкубировали 40 мин при температурах от 22° до 70° С и затем определяли активность металлопротеиназы по гидролизу азоказеина по стандартной методике.

Влияние ионов металлов на активность металлопротеиназы

При изучении влияния ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы использовали хлориды кальция, магния, кобальта, меди и никеля в конечной концентрации от 1 до 20 мМ, хлорид цинка – в конечной концентрации от 0,01 до 20 мМ. К ферментному раствору добавляли растворы двухвалентных металлов и выдерживали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем определяли активность фермента по гидролизу азоказеина и выражали в процентах относительно контроля. Контролем (100 %) служил уровень активности фермента в отсутствие ионов металлов.

13. Математическая обработка результатов

Результаты двухфакторных экспериментов по оптимизации питательной среды обрабатывали с помощью программы STATGRAPHICS, позволяющей выводить на экран уравнение регрессии, степень достоверности модели и графические изображения поверхности отклика.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Среды для культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Для культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis* выбрали две среды: среда LB как оптимальная для культивирования рекомбинантных штаммов и пептон-содержащая среда, ранее разработанная для получения максимальной продукции сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* [Шакиров с соавт., 2000, Габдрахманова с соавт., 2002, Balaban et al., 2004, Частухина с соавт., 2004, 2005, Кириллова с соавт., 2006а, Маликова с соавт., 2006, 2007, Балабан с соавт., 2008]. Сравнительное культивирование рекомбинантного штамма на средах проводили по показателям роста культуры продуцента (OD_{590}), активности металлопротеиназы, а также продуктивности культуры (рис. 6).

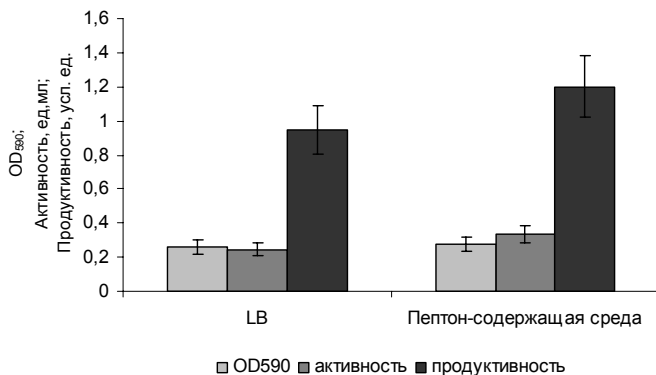


Рис. 6. Сравнение эффективности двух сред - среды LB и пептон-содержащей среды – для получения максимальной продукции металлопротеиназы MprVi рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Показано, что рост и продуктивность культуры, а также активность металлопротеиназы на пептон-содержащей среде превышали таковые на среде LB. В связи с этим для дальнейшей работы была выбрана пептон-содержащая среда.

2. Динамика роста и накопления металлопротеиназы MprBi в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*

При исследовании динамики роста и накопления протеолитической активности металлопротеазы MprBi рекомбинантного штамма *B. subtilis* на пептон-содержащей среде показано, что активность фермента появляется в культуральной жидкости на 17-й час роста, её уровень достигает максимума на 29-31 ч роста, что соответствует стационарной фазе роста культуры. Протеолитическая активность беспротеазного штамма *B. subtilis* обнаружена в культуральной жидкости в следовых количествах по сравнению с уровнем активности рекомбинантного штамма (рис. 7).

В культуральной жидкости рекомбинантного штамма протеолитическая активность фермента ингибируется 5 мМ 1,10-фенантролина, в то время как 5 мМ PMSF не оказывает влияния, что свидетельствует о принадлежности протеиназы к классу металлопротеиназ (табл. 1).

Таблица 1

Влияние ингибиторов на протеолитическую активность в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Ингибиторы, 5 мМ	Остаточная активность, %
PMSF	98
1,10-фенантролин	1,2
Контроль (без ингибитора)	100

Исследование динамики спорообразования рекомбинантного штамма *B. subtilis* показало, что появление свободных спор в среде наблюдается спустя 6 часов после максимума протеолитической активности фермента. Эти данные подтверждают, что металлопротеиназа MprBi является секретируемым ферментом, а не накапливается в результате массового лизиса клеток.

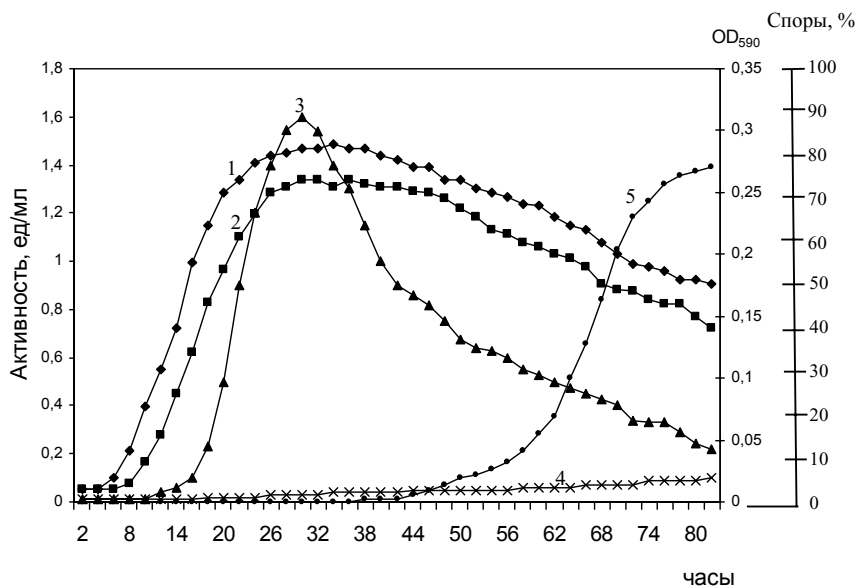


Рис. 7. Динамика роста и накопления протеолитической активности

1 – рост беспротеазного штамма

2 – рост рекомбинантного штамма

3 – протеолитическая активность рекомбинантного штамма

4 – протеолитическая активность беспротеазного штамма

5 – содержание свободных спор

3. Локализация металлопротеиназы MprBi в клетках рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Для изучения локализации металлопротеиназы MprBi исследовали уровень протеолитической активности в клеточных фракциях (клеточная стенка, мембрана, цитоплазма) рекомбинантного и бесплазмидного штаммов *B. subtilis*. Максимальную активность обнаружили во фракции культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*. В клеточных фракциях этого штамма, а также в клеточных фракциях и культуральной жидкости бесплазмидного штамма протеолитическая активность обнаружена в следовых количествах (табл. 2). Полученные данные свидетельствовали, что протеиназа MprBi

является секретируемым ферментом и конечным местом её функционирования является окружающая клетку среда.

Таблица 2

Активность металлопротеиназы в культуральной жидкости и клеточных фракциях бесплазмидного и рекомбинантного штаммов *B. subtilis*

Фракция	Активность, ед/мг биомассы $\times 10^3$					
	на 24 час роста		на 30 час роста		на 36 час роста	
	рекомбинантн. штамм	бесплазмидн. штамм	рекомбинантн. штамм	бесплазмидн. штамм	рекомбинантн. штамм	бесплазмидн. штамм
Культуральная жидкость	715	32	1324	39	910	45
Клеточная стенка	4,6	3,1	5,0	3,4	6,0	5,5
Мембрана	7,8	8,2	8,7	8,1	9,2	9,0
Цитоплазма	3,4	3,7	5,0	4,8	6,9	7,0

4. Подбор компонентов питательной среды для максимальной продукции металлоэндопептидазы MprBi рекомбинантного штамма *B.subtilis*

Исследовали влияние соотношения двух основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата на продукцию металлоэндопептидазы MprBi. Концентрации указанных факторов варьировали на трех уровнях. Схема опыта, концентрации исследуемых компонентов среды и усредненные по трем повторностям значения протеолитической активности приведены в таблице 3.

Результаты двухфакторных экспериментов представлены на рис. 8 и 9 в виде линий уровня активности металлопротеиназы MprBi и продуктивности культуры рекомбинантного штамма, где выделяется оптимальная по двум рассматриваемым факторам зона. Показано, что максимальная активность металлопротеиназы наблюдается при концентрации в среде пептона 19 г/л и неорганического фосфата 1,3 г/л и максимальная продуктивность культуры - при концентрации пептона 20 г/л и неорганического фосфата 1,45 г/л (рис. 8, 9).

Таблица 3

Оптимизация питательной среды для максимальной продукции металлопротеиназы MprVi рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Уровни факторов				Металлопротеиназа MprVi	
Пептон		Неорганический фосфат		Активность, ед/мл	Продуктивность, усл. ед.
X1	г/л	X2	г/л		
-1	10	-1	0,8	0,291	1,11
-1	10	0	1,2	0,5	1,53
-1	10	+	1,6	0,39	1,62
0	20	-1	0,8	0,464	1,65
0	20	0	1,2	0,736	2,2
0	20	+	1,6	0,696	2,4
+	30	-1	0,8	0,3	1,3
+	30	0	1,2	0,27	1,5
+	30	+	1,6	0,33	1,32
Исходная среда				0,31	1,1

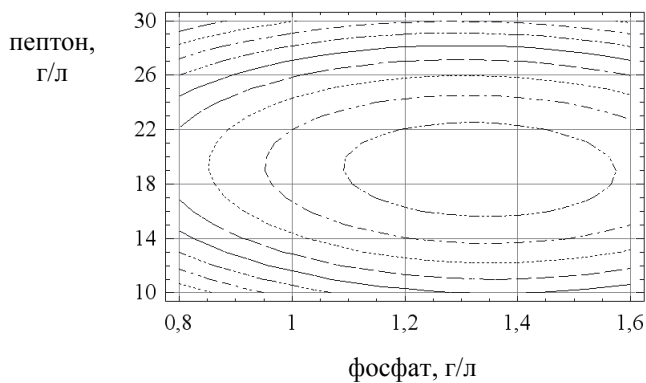


Рис. 8. Влияние концентрации пептона и неорганического фосфата на активность металлопротеиназы MprVi

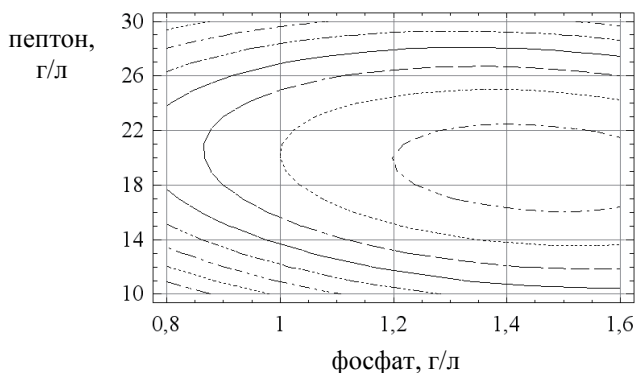


Рис. 9. Влияние концентрации пептона и неорганического фосфата на продуктивность *B. subtilis*

Таким образом, в работе использовали пептон-содержащую среду с установленными концентрациями пептона и неорганического фосфата 20 г/л и 1,4 г/л соответственно. Эти эксперименты позволили увеличить активность фермента на оптимизированной среде в 2,4 раза, продуктивность культуры в 2 раза.

Известно, что присутствие в питательной среде сложных органических субстратов оказывает стимулирующий эффект на биосинтез фермента. Мы вносили в среду культивирования с подобранными концентрациями пептона (20 г/л) и неорганического фосфата (1,4 г/л) белковые субстраты желатин, альбумин и казеин в концентрациях от 0,1 до 2 г/л. Присутствие в питательной среде желатина и альбумина не увеличивало активность фермента и продуктивность рекомбинантного штамма *B. subtilis* в отношении синтеза металлопротеиназы. Внесение в среду казеина в концентрации 1 и 2 г/л увеличивало активность фермента на 55-60% и продуктивность культуры на 30-40% (рис 10).

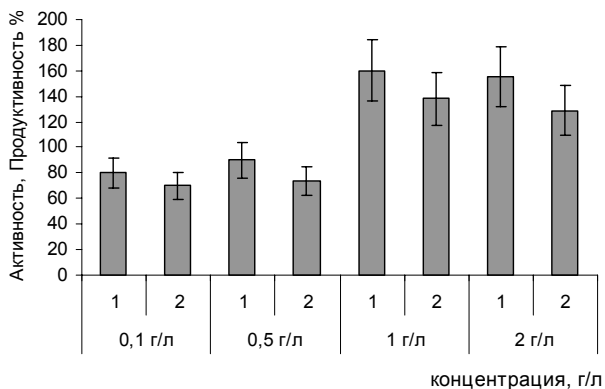


Рис. 10. Влияние различных концентраций казеина на активность металлопротеиназы MprBi и продуктивность *B.subtilis*

1 – активность металлопротеиназы

2 – продуктивность культуры

Так как внесение в среду культивирования казеина в концентрациях 1-2 г/л оказало положительное влияние на активность фермента и продуктивность культуры, мы провели двухфакторный эксперимент по определению оптимальных концентраций казеина и неорганического фосфата (рис. 11, 12) при ранее установленном оптимальном содержании пептона в среде 20 г/л. Казеин и неорганический фосфат варьировали на трех уровнях: казеин 0,5, 1,0 и 1,5 г/л и неорганический фосфат 0,8, 1,2 и 1,6 г/л. Схема опыта, концентрации исследуемых компонентов среды и усредненные по трем повторностям значения активности приведены в таблице 4.

Двухфакторный эксперимент подтвердил, что внесение в среду казеина в концентрации 1 г/л увеличивает активность фермента в 4 раза и продуктивность культуры в 4,6 раза, поэтому мы ввели казеин в среду культивирования (табл. 4).

Таблица 4

Оптимизация питательной среды для максимальной продукции металлопротеиназы MprVi рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Уровни факторов				Металлопротеиназа MprVi	
Казеин		Неорганический фосфат		Активность, ед/мл	Продуктивность, усл. ед.
X1	г/л	X2	г/л		
-1	0,5	-1	0,8	0,6	3
-1	0,5	0	1,2	0,5	2,8
-1	0,5	+	1,6	0,62	4,9
0	1	-1	0,8	1,02	5,06
0	1	0	1,2	1,25	5,16
0	1	+	1,6	0,9	4,38
+	1,5	-1	0,8	0,43	2,3
+	1,5	0	1,2	0,7	4,4
+	1,5	+	1,6	0,73	3,84
Исходная среда				0,31	1,1

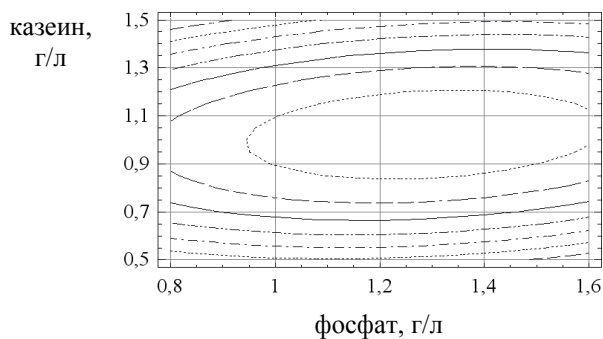


Рис. 11. Влияние концентрации казеина и неорганического фосфора на активность *B. subtilis*

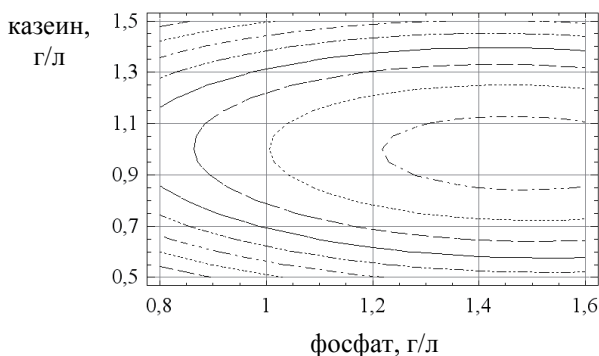


Рис. 12. Влияние концентрации казеина и неорганического фосфата на продуктивность *B. subtilis*

Таким образом, оптимизированная среда содержит 20 г/л пептона, 1,4 г/л неорганического фосфата и 1 г/л казеина.

Одним из путей регуляции биосинтеза внеклеточных ферментов является регуляция конечным продуктом, которым могут быть аминокислоты и казаминовые кислоты. Казаминовые кислоты при культивировании микроорганизмов могут служить дополнительным источником одновременно и углерода и азота. При внесении в среду казаминовых кислот в концентрации от 0,1 г/л до 0,5 г/л рост культуры был на уровне контроля, при этом присутствие в среде 0,1 г/л казаминовых кислот увеличивало активность фермента в 2 раза, продуктивность – в 5 раз. С увеличением концентрации казаминовых кислот до 1-2 г/л активность фермента и продуктивность культуры значительно снижались (рис. 13). Полученные данные позволяют сделать заключение, что синтез металлопротеиназы MprBi в присутствии больших концентраций казаминовых кислот чувствителен к азотметаболической репрессии.

Таким образом, для увеличения продукции металлопротеиназы MprBi целесообразно включать в питательную среду 0,1 г/л казаминовых кислот.

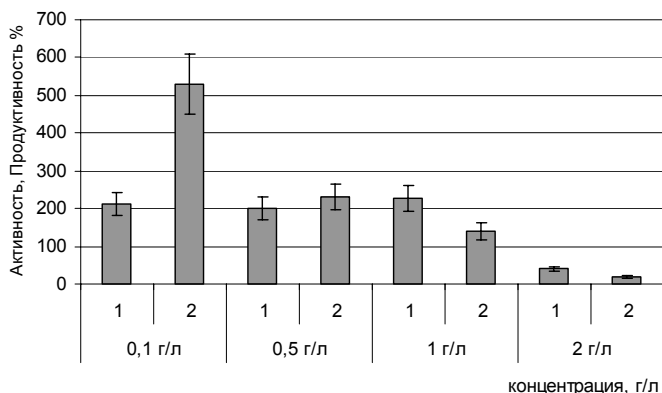


Рис. 13. Влияние различных концентраций казаминовых кислот на активность металлопротеиназы MprBi и продуктивность *B. subtilis*

1 – активность металлопротеиназы

2 – продуктивность культуры

В результате подбора концентраций компонентов питательной среды для максимальной продукции металлопротеиназы MprBi рекомбинантным штаммом *B. subtilis* удалось повысить уровень активности фермента и продуктивности культуры в 4 раза по сравнению с исходной средой (табл. 5).

Таблица 5

Продукция металлопротеиназы на исходной и оптимизированной средах

Среда культивирования	Активность, ед/мл	Продуктивность, усл.ед.
Исходная	0,31	1,1
Оптимизированная	1,37	4,4

5. Разработка способов очистки металлопротеиназы MprVi, электрофорез и молекулярная масса белка

Для изучения свойств металлопротеиназы MprVi, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, необходимо получить гомогенный препарат белка. Выделение и очистка металлопротеиназы MprVi включали несколько стадий: дробное осаждение сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и хроматографию на гидрофобных носителях бацитрацин-силохроме и бутил-сефарозе.

Первым этапом выделения фермента было проведение дробного фракционирования сульфатом аммония. Исследовали 4 интервала насыщения культуральной жидкости сульфатом аммония: 0,2 – 0,8; 0,2 – 0,7; 0,3 – 0,7 и 0,3 – 0,8. В результате установлено, что оптимальным является интервал насыщения 0,2 - 0,7. В этих условиях достигался максимальный выход белка - около 54%, степень очистки составляла 20 (табл. 6). В дальнейшей работе использовали фракцию фермента, полученную при насыщении сульфатом аммония в интервале 0,2 - 0,7.

Таблица 6

Дробное фракционирование сульфатом аммония металлопротеиназы из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Интервал насыщения сульфатом аммония	Степень очистки	Выход, %
0,3 – 0,8	9,5	10,2
0,2 – 0,8	10	40,5
0,3 – 0,7	9,1	16,8
0,2 – 0,7	20,6	54

Диализат сульфатаммонийной фракции подвергали хроматографической очистке на гидрофобном носителе бацитрацин-силохроме, с помощью которого удалось незначительно повысить степень очистки фермента (в 48 раз) по сравнению с культуральной жидкостью, выход составил 19% (табл. 7, рис. 15А).

Таблица 7

Очистка металлопротеиназы MprVi на бацитрацин-силохроме

Стадии очистки	V, мл	A ₂₈₀ , общ. мг	Активность, общ. ед. акт.	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	760	11400	595	0,05	1	100
Диализат сульфатаммонийной фракции	24	312	322	1,03	20,6	54
Хроматография на бацитрацин-силохроме	149	47,5	114,3	2,41	48,2	19,2

SDS-электрофорез фракции, полученной после хроматографии на бацитрацин-силохроме показал наличие 4-х белковых полос (рис. 14, дорожка 3).

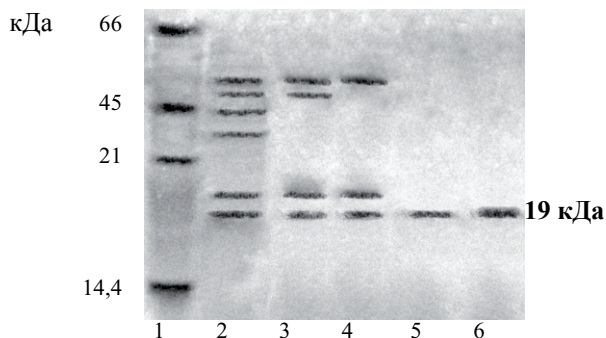


Рис. 14. SDS-электрофорез в ПААГ

1 – маркеры: BSA (66 кДа), альбумин (45 кДа), папаин (21 кДа), лизоцим (14,4 кДа)

2 – фракция белка после осаждения сульфатом аммония

3 – фракция белка после очистки на бацитрацин-силохроме

4 - фракция белка после ионообменной хроматографии (1 способ)

5 - фракция белка после очистки на бутил-сефарозе (2 способ)

6 - фракция белка после очистки на бутил-сефарозе (3 способ)

Для получения гомогенного фермента использовали три способа.

1 способ – Ионообменная хроматография белка на ДЭАЭ-целлюлозе. Полученный после бацитрацин-силохрома и диализа высокоочищенный раствор фермента подвергали хроматографической очистке на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Это позволило увеличить степень очистки в 180 раз по сравнению с культуральной жидкостью, выход по активности - 6,8% (табл.8).

SDS-электрофорез фракции, полученной после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе показал наличие 3-х белковых полос (рис. 14, дорожка 4).

Таким образом, ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе не позволила получить гомогенный фермент.

Таблица 8

Очистка металлопротеиназы MprVi на бацитрацин-силохроме и ДЭАЭ-целлюлозе

Стадии очистки	V, мл	A ₂₈₀ , общ. мг	Активность, общ., ед. акт.	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %	
						по активн.	по белку
Культуральная жидкость	760	11400	595	0,05	1	100	100
Диализат							
Сульфатаммонийной фракции	24	312	322	1,03	20,6	54	2,74
Хроматография на бацитрацин- силохроме	149	47,5	114,3	2,41	48,2	19,2	0,42
Хроматография на DEAE-целлюлозе	60,5	4,32	40,3	9,3	186	6,8	0,037

2-ой способ – хроматография MprVi на бутил-сефарозе после очистки на бацитрацин-силохроме. Фракцию фермента, полученную после бацитрацин-силохрома, помещали на колонку с бутил-сефарозой и проводили хроматографическую очистку как описано в разделе «Материалы и методы». Степень очистки составила 250 по сравнению с культуральной жидкостью, выход по активности - около 9 %. (табл. 9).

SDS-электрофорез показал наличие одной белковой полосы после хроматографии на бутил-сефарозе (рис. 14, дорожка 5).

Таблица 9

Очистка металлопротеиназы MprVi на бацитрацин-силохроме и бутил-сефарозе

Стадии очистки	V, мл	A ₂₈₀ общ., мг	Активность общ., ед. акт.	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %	
						по активн.	по белку
Культуральная жидкость	760	11400	595	0,05	1	100	100
Диализат							
сульфатаммонийной фракции	24	312	322	1,03	20,6	54	2,74
Хроматография на бацитрацин-силохроме	149	47,5	114,3	2,41	48,2	19,2	0,42
Хроматография на бутил-сефарозе	82,5	4,1	52,0	12,7	254	8,7	0,036

3-й способ – хроматография на бутил-сефарозе диализата сульфатаммонийной фракции фермента.

Поскольку в результате предыдущего способа очистки на бутил-сефарозе был получен гомогенный препарат белка, задачей третьего способа стало уменьшение количества стадий с целью сокращения потерь чистого фермента в процессе очистки. Хроматографии на бутил-сефарозе был подвергнут диализат сульфатаммонийной фракции (табл. 10).

В результате хроматографии на гидрофобном носителе бутил-сефарозе диализата сульфатаммонийной фракции белка удалось получить за 2 стадии очистки гомогенный препарат металлопротеиназы MprVi (рис. 14, дорожка 6). Степень очистки составила 300, выход по активности – 12%, что на 3% выше, чем при очистке вторым способом (табл. 10, рис.15Б).

Молекулярная масса металлопротеиназы, определенная электрофоретически, составляет 19 кДа (рис. 14).

Таблица 10

Хроматография на бутил-сефарозе диализата сульфатаммонийной фракции белка

Стадия очистки	V, мл	Белок общ., мг	Активность общ., ед. акт.	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %	
						по активн.	по белку
Культуральная жидкость	760	11400	595	0,05	1	100	100
Диализат сульфатаммонийной фракции	24	312	322	1,03	20,6	54	2,74
Хроматография на бутил-сефарозе	70	4,8	72,1	15,0	300	12,1	0,042

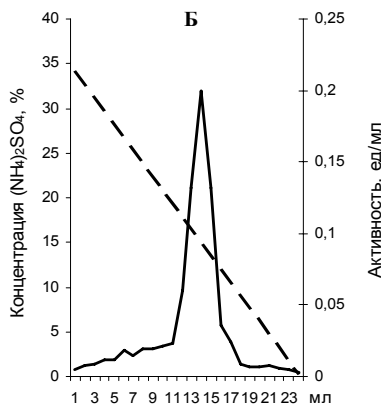
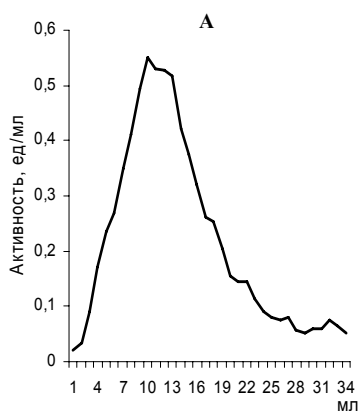


Рис. 15. Хроматографическая очистка металлопротеиназы MprBi

А – хроматографический профиль белка после бацитрацин-силохрома

Б – хроматографический профиль белка после бутил-сефарозы

6. Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы MprBi

Изучение влияния различных ингибиторов на активность гомогенной металлопротеиназы показало, что фермент не ингибируется PMSF и белковым ингибитором трипсина, но практически полностью ингибируется 1,10-фенантролином, а также высокими концентрациями ЭДТА, что подтверждает

принадлежность фермента к классу металлопротеиназ (табл. 11). Высокие концентрации рСМВ почти полностью ингибируют активность фермента, что позволило предположить наличие остатка цистеина в молекуле белка.

Таблица 11

Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы MprBi

Ингибитор	Остаточная активность, %	
	Концентрация ингибитора	
	0,5 мМ	5 мМ
PMSF	93,9	91,2
ЭДТА	96	5,7
1,10-фенантролин	5,8	0
рСМВ	94,2	1,9
HgCl ₂	51,1	39,7
Белковый ингибитор трипсина	97	100

7. Определение последовательности аминокислот и N-концевой аминокислоты металлоэндопептидазы

Аминокислотную последовательность гомогенного препарата металлопротеиназы MprBi устанавливали методом MALDI-TOF - масс-спектрометрии (рис. 16). Методом Эдмана была установлена N-концевая последовательность гомогенной MprBi, она содержит 10 аминокислотных остатков ASTGSQKVTV с N-концевым аланином (рис. 17) (см. Приложение). Полученные данные свидетельствуют, что зрелая металлопротеиназа *B. intermedius* включает 174 аминокислотных остатка (рис. 16). Рассчитанная молекулярная масса металлопротеиназы MprBi составила 19050 Да, что соответствует молекулярной массе фермента, полученной электрофоретически.

Знание N-концевой аминокислоты зрелого белка (аланин) позволило определить длину пропептидной области и установить второй сайт процессинга – между лизином (К) и аланином (А).

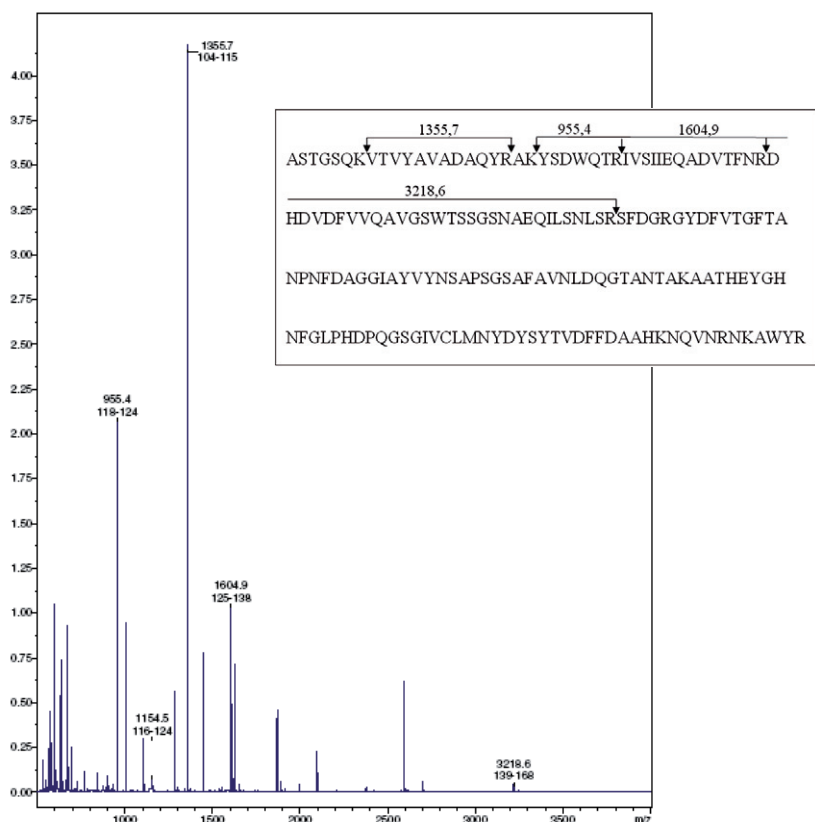


Рис. 16. MALDI-TOF масс-спектрометрия пептидов, полученных в результате обработки металлопротеиназы MprBi трипсином. Показана аминокислотная последовательность металлопротеиназы. Стрелками отмечены связи, гидролизующие трипсином. Над стрелками указаны массы полученных пептидов (Да)

Установленная нами последовательность белка полностью совпадает с последовательностью, конвертированной из нуклеотидной последовательности гена mprBi (AN 75740.2).

Таким образом, пропептидная последовательность состоит из 66 аминокислотных остатков и последовательность зрелого белка, которая включает 174 аминокислотных остатка (рис. 17).

1	ASTGSQKVTV	YAVADAQYRA	KYSDWQTRIV	SIIEQADVTF
41	NRDHDVDFVV	QAVGSWTSS	GSNAEQILSNL	SRSFDGRGYD
81	FVTGFTANPN	FDAGGIAYVY	NSAPSGSAFA	VNLDQGTANT
121	AKAATH HE YGH	NFGLPH DP QG	SGIV CL MNYD	YSYTVDFFDA
161	ANKNQVNRNK	AWYR		

Рис. 17. Аминокислотная последовательность MprBi. Отмечены первые 10 аминокислот на N-конце зрелого белка (**ASTGSQKVTV**). Рамками выделены продленный мотив активного центра (сплошная линия) и Met-поворот (пунктирная линия)

8. Сравнительный анализ первичной структуры металлопротеиназы MprBi с ферментами клана метцинкинов

В аминокислотной последовательности MprBi мы идентифицировали фрагмент с консервативными аминокислотными остатками (выделены полужирным шрифтом) **HEVGHNFGLPHD**, структура которого соответствует структуре мотива активного центра ферментов класса цинкзависимых металлопротеиназ (рис. 18).

В этом фрагменте содержатся три гистидиновых остатка His126, His130 и His136, остаток глутамата Glu127, расположенный рядом с первым гистидином, и остаток глицина Gly133 между вторым и третьим гистидиновыми остатками. Все они характерны для продленного мотива активного центра семи семейств клана метцинкинов [Gomis-Rüth et al., 2009]. Это позволяет нам отнести металлопротеиназу MprBi к клану метцинкинов.

В аминокислотной последовательности эндопептидазы MprBi обнаружен единственный остаток Met147, а также остатки Cys145 и Tyr149. Наличие этих остатков в зрелой молекуле MprBi позволяет сделать предположение о том, что содержащий их фрагмент CLMNY представляет собой структуру Met-поворота,

локализованного на расстоянии 8 аминокислотных остатков от С-конца продленного мотива активного центра. Наличие этого фрагмента в MprBi подтверждает, что полученная нами цинкзависимая металлоэндопептидаза MprBi относится к клану метцинкинов (структура Met-поворота для которого является консервативной и своего рода маркерной).

Метцинкиновые металлопротеиназы	мотив активного центра												Met-поворот
АСТАЦИНЫ													
Астацин (краб)	H	E	L	M	H	A	I	G	F	Y	H	E	S I M H Y
α-MEP (мышь)	H	E	I	L	H	A	L	G	F	F	H	E	S L M H Y
β-MEP (крыса)	H	E	F	L	H	A	L	G	F	W	H	E	S V M H Y
BMP1/проколлаген C- протеиназа (человек)	H	E	L	G	H	V	V	G	F	W	H	E	S I M H Y
SPAN/BP10 (морской ёж)	H	E	I	G	H	A	I	G	F	H	H	E	S I M H Y
Толлоид-протеиназа (<i>Dr. melanogaster</i>)	H	E	L	G	H	T	I	G	F	H	H	E	S I M H Y
Флавастацин (<i>F.meningosepticum</i>)	H	E	I	M	H	S	M	G	I	M	H	E	S V M M Y
СЕРРАЛИЗИНЫ													
Протеиназа <i>Serratia</i>	H	E	I	G	H	A	L	G	L	S	H	P	S L M S Y
Протеиназа В (<i>E. chrysanthemi</i>)	H	E	I	G	H	A	L	G	L	S	H	P	S I M S Y
Протеиназа <i>P.aeruginosa</i>	H	E	I	G	H	T	L	G	L	S	H	P	S V M S Y
МАТРИКСИНЫ													
MMP-1 (коллагеназа 1 фибробластов человека)	H	E	L	G	H	S	L	G	L	S	H	S	A L M Y P
MMP-3 (человеческий стромелизин-1)	H	E	I	G	H	S	L	G	L	F	H	S	A L M Y P
MMP8 (нетрофильная коллагеназа 2)	H	E	F	G	H	S	L	G	L	A	H	S	A L M Y P
РЕПРОЛИЗИНЫ													
Адамализин II (<i>C.adamanteus</i>)	H	E	L	G	H	N	L	G	M	E	H	D	C I M R P
Атролизин С	H	E	L	G	H	N	L	G	M	E	H	D	C I M R P
Тримерелизин	H	E	L	G	H	N	L	G	M	E	H	D	C I M S D
Акутолизин А]	H	E	M	A	H	N	L	G	V	S	H	D	C I M S P
ТЕРМОЛИЗИН													
Термолизин (<i>B. thermoproteolyticus</i>)	H	E	L	T	H	A	V	T	D	Y	T	A	нет
	126	127	12	12	130	13	132	13	13	135	13	13	14 14 14 14
		8	9		1		3	4		6	7		5 6 7 8 9
MprBi (<i>B. intermedius</i>)	H	E	Y	G	H	N	F	G	L	P	H	D	C L M N Y

Рис. 18. Мотив активного центра и Met-поворот метцинкиновых металлоэндопептидаз. Выделены консервативные аминокислоты активного центра и метионин в Met-повороте [Jiang et al., 1992b, Gong et al., 1998, Bode et al., 1992, 1993]

9. Субстратная специфичность MprBi

Исследовали специфичность металлопротеиназы MprBi по гидролизу синтетических хромогенных субстратов (табл. 12). Металлопротеиназа MprBi гидролизует синтетические тетрапептиды интенсивнее, чем трипептиды. Металлопротеиназа не проявляет строгой субстратной специфичности, так как спектр аминокислотных остатков, образующих гидролизуюмую пептидную связь, достаточно широк.

Таблица 12

Специфичность металлопротеиназы по гидролизу синтетических субстратов

Субстрат	Активность, ед/мг $\times 10^{-4}$
Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg	51,48
Dnp-Gly-Gly-Leu-Arg	36,52
Dnp-Ala-Ala-Leu-Arg-NH ₂	28,16
Dnp-Gly-Gly-Ile-Arg	26,4
Dnp-Ala-Ala-Val-Arg	14,52
Dnp-Gly-Gly-Lys	5,72

Исследовали специфичность металлопротеиназы по гидролизу В-цепи окисленного инсулина. Данные масс-спектрометрии при изучении продуктов расщепления подтвердили, что фермент не проявляет предпочтения к определенным аминокислотам расщепляемой пептидной связи (рис. 19), что свидетельствует о широкой субстратной специфичности протеиназы MprBi.



Рис. 19. Гидролиз В-цепи инсулина металлопротеиназой MprVi и
эндопептидазой PrtA

В то же время эндопептидаза PrtA из патогенного насекомого *Photorhabdus luminescens*, относящаяся к семейству серрализин, гидролизует В-цепь окисленного инсулина только по связям Val, Ala и Leu [Marokhazi et al., 2007].

При гидролизе белковых субстратов эндопептидазой MprVi показано, что фермент с предпочтением расщепляет казеин (уд. акт. 32,9 ед/мг) по сравнению с альбумином (уд. акт. 5,5 ед/мг).

10. Кинетические параметры

Константу Михаэлиса K_m для протеиназы MprVi определяли по гидролизу азоказеина, она составила 0,06 мМ. Каталитическая константа k_{cat} равна 1213 с⁻¹. Изoeлектрическая точка металлопротеиназы pI составляет 5,4 (табл. 13).

11. pH-оптимум и pH-стабильность MprVi

Установлено, что рН-оптимум металлопротеиназы в 0,05 М трис-НСl буфере с 5 мМ Ca^{2+} соответствует 8,0. Это указывает на то, что исследуемый фермент относится к группе щелочных металлопротеаз (рис. 20А). Белок стабилен в интервале рН от 7,2 до 9,0 (рис. 20Б).

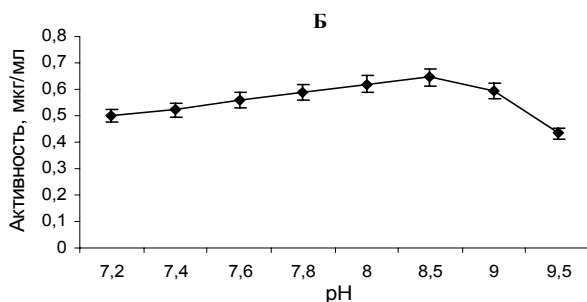
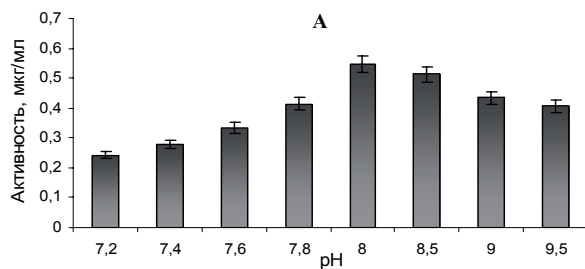


Рис. 20. pH-Оптимум и pH-стабильность металлопротеиназы в трис-HCl буфере

А – pH-оптимум металлопротеиназы

Б – pH-стабильность металлопротеиназы

12. Температурный оптимум и термостабильность

При исследовании влияния температуры на активность металлопротеиназы установлено, что температурный оптимум фермента соответствует 50-55°C (рис. 21А). Белок проявляет стабильность в интервале температур от 22 до 55°C (рис. 21Б).

А

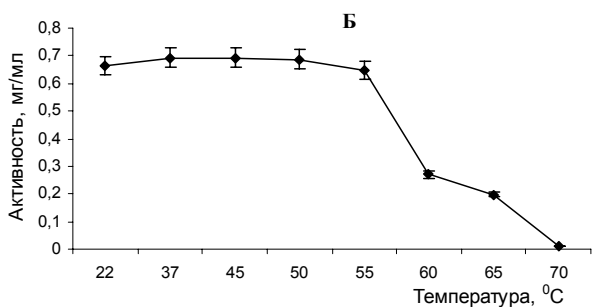
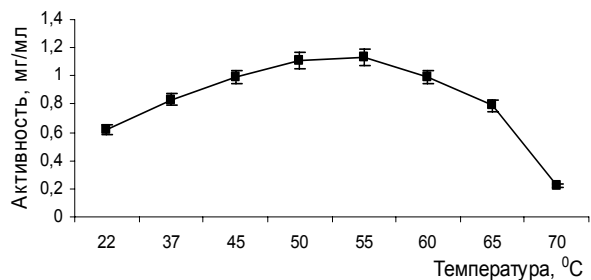


Рис. 21. Влияние температуры на активность металлопротеиназы

А – температурный оптимум фермента

Б – термостабильность металлопротеиназы

Таблица 13

Физико-химические свойства металлоэндопептидазы MprBi

Физико-химические свойства металлоэндопептидазы MprBi	
K_m , mM	0,06
k_{cat} , s^{-1}	1213
pI	5,4
pH-Оптимум	8,0
pH-Стабильность	7,2 – 9,0
Температурный оптимум, °C	55
Термостабильность, °C	22 - 55

13. Влияние ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы MprBi

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на активность фермента показало, что ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} в концентрации 10 mM повышают активность

белка на 30 и 20% соответственно. Ионы Co^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} в концентрациях от 1 до 20 мМ снижают активность металлопротеиназы, причем, с увеличением концентрации металлов снижение становилось более значительным. Низкие концентрации ионов Zn^{2+} (0,01 мМ) не влияют на активность фермента, увеличение его концентрации приводило к резкому снижению активности (рис. 22). Таким образом, ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} оказывают положительное влияние на стабильность фермента.

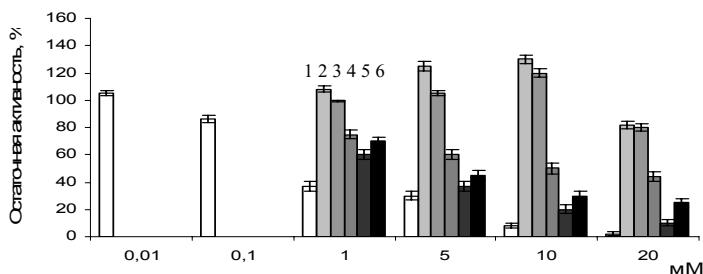


Рис. 22. Влияние ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы MprBi

1 – Zn^{2+} ; 2- Ca^{2+} ; 3 – Mg^{2+} ; 4 – Co^{2+} ; 5 – Cu^{2+} ; 6 – Ni^{2+}

В результате проведенной работы получен гомогенный препарат металлоэндопептидазы MprBi, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, и установлена структура его аминокислотной последовательности. На основании анализа первичной структуры MprBi показано, что металлоэндопептидаза относится к семейству адамализинов/репролизинов клана метцинкинов класса цинкзависимых протеиназ и является первым представителем данного семейства у прокариот и у бацилл в частности. Однако, структурные особенности этого фермента (Tyr149 в Met-повороте и N-концевой Ala1) сближают его с эндопептидазами астацинового семейства. Возможно, смешение признаков является ключевой особенностью бациллярных адамализиноподобных эндопептидаз.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования проведены на рекомбинантном штамме *B. subtilis* BG2036, несущем на плазмиде pSA1 ген металлопротеиназы *B. intermedius* (*mprBi*) под собственным промотором. Выбор штамма-реципиента обусловлен отсутствием у него собственных внеклеточных протеиназ, что позволяет проводить измерение протеолитической активности на неспецифическом субстрате - азоказеине. Установлено, что максимальная активность металлопротеиназы *B. subtilis* обнаружена в стационарной фазе на 30-й ч роста, тогда как уровень активности беспротеазного штамма (штамма-продуцента) оставался крайне низким (следовые количества) на протяжении всего времени культивирования (рис.7).

Для определения природы появления фермента в культуральной жидкости продуцента была исследована динамика спорообразования рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Установлено, что единичные споры появляются в среде на 36 ч роста. Максимальное количество свободных спор обнаруживается на 72-80 ч роста, когда протеолитическая активность в культуральной жидкости находится на минимальном уровне. Эти данные свидетельствуют о целостности клеток в момент максимального накопления фермента и подтверждают, что внеклеточная металлопротеиназа *B. intermedius* MprBi рекомбинантного штамма *B. subtilis* является секретируемым ферментом, а не накапливается в среде в результате массового лизиса бактерий.

Для подтверждения секретируемой природы MprBi исследовали локализацию металлопротеиназы (табл. 2). Чтобы проследить динамику накопления протеолитической активности в клеточных фракциях обоих штаммов измерения проводились на 26, 30 и 34 часы роста культуры, в качестве контроля был использован беспротеазный штамм. Для бесплазмидного штамма показано, что во всех клеточных фракциях, также как и в культуральной жидкости активность металлопротеиназы обнаруживалась в следовых количествах. Низкий уровень протеолитической активности отмечен в клеточных фракциях рекомбинантного штамма. При этом уровень

протеолитической активности в культуральной жидкости рекомбинантного штамма был на 2 порядка выше (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о внеклеточной локализации активного фермента. В цитоплазме, мембране и клеточной стенке активный белок определялся в следовых количествах. Таким образом, место его функционирования – межклеточное пространство.

Специфический ингибитор сериновых протеиназ PMSF в концентрации 10 мМ не влиял на активность металлопротеиназы в культуральной жидкости, в то время как ингибитор металлопротеиназ 1,10-фенантролин в концентрации 5 мМ полностью ингибировал каталитическую активность фермента. Это явилось подтверждением того, что фермент относится к классу металлопротеиназ.

Бациллы продуцируют протеолитические ферменты во время пост-экспоненциальной и стационарной фаз роста, уровень активности которых сильно зависит от компонентов питательной среды: изменения соотношения источников азота и углерода, присутствия легко метаболизируемых сахаров (например, глюкозы), ионов металлов и т.д. [Beg et al., 2002; Varela et al., 1996]. Важно осуществлять подбор компонентов среды для максимального накопления продукта, сводя к минимуму количество неиспользованных компонентов в конце ферментации [Adinarayana et al., 2002]. Высокое содержание в питательных средах сложных органических соединений типа пептона, казеина, гидролизата казеина, дрожжевого экстракта приводит к более интенсивному росту и продукции внеклеточных протеиназ бактерий [Сафонова с соавт., 1999]. Для рекомбинантных штаммов содержание в среде культивирования дополнительных питательных веществ является крайне важным, так как им необходимо осуществлять репликацию чужеродных плазмид, зачастую являющихся мультикопийными [Lenski et al., 1988, Georgion, 1988, Габдрахманова с соавт., 2000]. По-видимому, сложные органические вещества питательных сред лучше усваиваются, чем простые соединения, так как в них всегда имеются физиологически активные соединения, микроэлементы и другие факторы, благоприятно влияющие на рост и биосинтетическую активность микроорганизмов. При изучении биосинтеза сериновых протеиназ бактериями *B. intermedius* 3-19 было определено оптимальное соотношение в среде концентрации пептона и неорганического

фосфата, показано активирующее влияние неорганического фосфата на синтез протеиназ [Шакиров с соавт., 2000].

Для выбора оптимальной среды культивирования мы провели сравнительный анализ активности фермента и продуктивности культуры на 30 ч роста, который показал, что на пептон-содержащей среде эти показатели выше в 1,3 раза, чем на среде LB, поэтому для дальнейшей оптимизации нами была выбрана пептон-содержащая среда.

В литературе имеются сведения об активации синтеза бациллярных сериновых протеиназ при культивировании продуцента на средах, содержащих пептон и экзогенный неорганический фосфат [Ицкович с соавт., 1995, Шакиров с соавт., 2000, Шарипова с соавт., 2000, 2002].

Мы исследовали влияние основных компонентов питательной среды на продукцию металлопротеиназы MprBi. Ранее показано, что для высокой продукции бациллярных сериновых протеиназ концентрация неорганического фосфата не превышает 0,2-0,3 г/л [Частухина с соавт., 2004, 2005, Кириллова с соавт., 2006].

Мы провели двухфакторный эксперимент по определению концентраций двух основных компонентов питательной среды - пептона и неорганического фосфата – для максимальной продукции эндопептидазы MprBi. Результаты показывают, что оптимальные концентрации пептона и неорганического фосфата, необходимые для максимальной активности металлопротеиназы MprBi, составляют 20 и 1,4 г/л соответственно (рис. 8, 9, табл. 3).

Таким образом, для роста и эффективной продукции металлопротеиназы рекомбинантного штамма *B. subtilis* требуются высокие концентрации неорганического фосфата (1,4 г/л). Присутствие сложных белковых субстратов в питательной среде увеличивает уровень синтеза специфического фермента. Так, сывороточный альбумин, гемоглобин, овальбумин, гистон, добавленные в среду культивирования *Candida albicans*, увеличивают уровень протеолитической активности [Benerjee et al., 1991]. На среде, содержащей глюкозу и казеин, наблюдалось увеличение продуктивности *Lactobacillus plantarum* [Сафонова с соавт., 1999]. Было установлено, что внесение в среду

культивирования 1–10 г/л казеина приводит к увеличению роста, но при этом снижается удельная активность глутамилэндопептидазы *B. intermedius* 3-19 [Шакиров с соавт., 2000]. Однако, эти добавки в концентрации 5-20 г/л оказывают существенный стимулирующий эффект на биосинтез глутамилэндопептидазы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, что связано, по-видимому, с увеличением потребности в питательных веществах клеток рекомбинантного штамма. Нами показано, что для металлопротеиназы *B. intermedius* внесение в среду культивирования казеина в концентрации 1 г/л приводит к увеличению активности фермента на 60% (рис. 10). Эти результаты согласуются с данными литературы, где отмечается аналогичное увеличение уровня активности сериновых протеиназ.

В результате двухфакторного эксперимента определено оптимальное соотношение в среде культивирования казеина и неорганического фосфата для максимальной активности металлопротеиназы, которое составило 1,0 и 1,4 г/л соответственно. Концентрация пептона при этом осталась прежней - 20 г/л.

Добавление в среду культивирования рекомбинантного штамма казаминовых кислот в концентрации 0,1 г/л увеличивало активность фермента вдвое, продуктивность при этом возрастала в 5 раз (рис. 13). Положительный эффект, по-видимому, объясняется тем, что казаминовые кислоты в качестве дополнительного источника азота и фосфора являются более доступными для металлопротеиназы MprBi.

В результате проведенных исследований нами подобраны следующие концентрации основных компонентов питательной среды, позволяющие получить максимальную продукцию металлопротеиназы MprBi рекомбинантным штаммом *B. subtilis* (г/л): пептон – 20, неорганический фосфат – 1,4, казеин – 1, казаминовые кислоты – 0,1. Оптимизация среды культивирования позволила повысить уровень активности фермента и продуктивности культуры в 4 раза по сравнению с исходной пептон-содержащей средой (табл. 5).

В литературе имеются сведения о методах выделения и очистки металлопротеаз. В основном авторы используют методы выделения белков непосредственно из культуральной жидкости с помощью аффинного сорбента.

Для выделения термолизина применяли метод аффинной хроматографии с использованием лигандов (D-Pro-Gly) и цианоген-бромидактивированной сефарозы; кроме того, использовали бацитрацин и кремнезем [Barrett et al., 1998]. Цинк-зависимую металлопротеазу *B. stearothermophilus* выделяли из культуральной жидкости с помощью лизин-аффинной хроматографии [Sookkheo et al., 2000]. Металлопротеаза *B. megaterium* выделена методом аффинной хроматографии на бацитрацин-сефарозе 4В [Морозова с соавт., 1993].

Распространенным является способ осаждения фермента из культуральной жидкости с помощью сульфата аммония или органических растворителей. Преимуществом такого способа является возможность получения концентрированной фракции белка из большого объема культуральной жидкости. Этот метод широко применяется для многих гидролитических ферментов, в том числе и для металлопротеаз: при очистке нейтральной протеазы *B. amyloliquefaciens* NPR 68 [Cho et al., 2003], металлопротеазы *B. cereus* TCEC 945 [Feder et al., 1971], *B. subtilis* [Хазиев с соавт., 2002, 2003] и др. В нашей работе при выделении металлоэндопептидазы из культуральной жидкости рекомбинантного штамма мы использовали прием фракционирования белка сульфатом аммония. Были подобраны условия дробного осаждения металлопротеазы сульфатом аммония, при котором максимальный выход фермента (54%) достигался в интервале насыщения 0,2 – 0,7 (табл. 6).

На следующем этапе использовали хроматографию на гидрофобном носителе - бацитрацин-силохроме. В отношении металлопротеиназы MprVi сорбент не проявил аффинных свойств, потери по активности были значительны (более 60%), степень очистки составила 48 (рис. 15А). Электрофорез показал наличие четырех четких белковых фракций. Для получения гомогенного препарата металлопротеиназы в дальнейшем мы использовали три различных способа очистки.

1 способ. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе увеличила степень очистки фермента по

сравнению с культуральной жидкостью в 180 раз, но при этом наблюдалась большая потеря активности (выход 6,8%) (табл. 8). Данный способ очистки не позволил получить гомогенный препарат фермента, SDS-электрофорез белка на данной стадии очистки показал наличие трех полос (рис. 14, дорожка 4). Похожие результаты с использованием хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе были получены Хазиевым с соавторами при очистке металлопротеиназы *B. subtilis*. Препарат удалось получить только в высокоочищенном состоянии [Хазиев с соавт., 2002, 2003].

2 способ. Используемый для хроматографии гидрофобный носитель бутил-сефароза показал высокое сродство к ферменту и позволил получить гомогенный препарат металлопротеиназы со степенью очистки в 250 раз по сравнению с культуральной жидкостью и удельной активностью 12,7 ед/мг, выход белка - 8,7% (табл. 9, рис. 14, дорожка 5).

3 способ. Известно, что большое количество стадий очистки приводит к значительным потерям фермента. В связи с этим в качестве третьего способа очистки мы использовали тот же сорбент (бутил-сефарозу), но исключили стадию хроматографии на бацитрацин-силохроме. Для хроматографии на бутил-сефарозе использовали диализат сульфатаммонийной фракции. В результате степень очистки фермента возросла в 300 раз по сравнению с культуральной жидкостью, удельная активность фермента увеличилась до 15 ед/мг. Этот способ позволил увеличить выход хроматографически гомогенного белка на 3% по сравнению со вторым способом очистки (12,1%) (табл. 10, рис. 14, дорожка 6, рис.15Б).

Гомогенность препарата была подтверждена SDS-электрофорезом и определена молекулярная масса металлопротеиназы - 19 кДа (рис. 14).

Таким образом, нами разработан двухстадийный способ очистки протеиназы MprBi, позволяющий получить 4-5 мг гомогенного препарата белка из 1 л культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

Исследования по влиянию специфических ингибиторов различных классов протеолитических ферментов показали, что очищенная MprBi относится к классу металлопротеиназ (табл. 11).

Аминокислотная последовательность металлопротеиназы *B. intermedius*, полученная на основании проведенной MALDI-TOF-спектрометрии показала, что MprBi включает 174 аминокислотных остатка (рис. 16). N-концевой аминокислотой зрелого белка, определенной методом Эдмана, является аланин. Обнаруженные в первичной структуре MprBi консервативные последовательности продленного мотива активного центра **HEVGHNFGLPHD**, а также последовательность Met-поворота **CLMNY**, расположенная на расстоянии 8 аминокислотных остатков от C-конца мотива активного центра, позволили классифицировать металлопротеиназу *B. intermedius* как относящуюся к клану метцинкинов. Известно, что для всех метцинкинов наличие продленного мотива активного центра **HEXXHXXGXXH** и Met-поворота с инвариантным метионином является характерной особенностью клана (рис. 17).

Возможность определения семейства, к которому принадлежит MprBi, дает анализ структуры мотива активного центра и структуры Met-поворота. Консервативный Asp, расположенный в мотиве активного центра после третьего His, а также Cys в структуре Met-поворота указывают на принадлежность MprBi к семейству адамализинов/репролизинов. Наличие же в структуре Met-поворота тирозина в положении, характерном для «тирозинового переключателя» в совокупности с N-концевым аланином в зрелой молекуле белка сближает исследуемый нами фермент с семейством астацинов. В семействе астацинов имеется лишь единственный представитель бактериальных белков – это флавастацин грамотрицательной бактерии *Flavobacterium meningosepticum* [Pfleiderer et al., 1967] (рис. 18). Все остальные члены семейства астациноподобных эндопептидаз являются эукариотическими белками. В семействе адамализинов/репролизинов представлены ферменты только высших эукариот (змеи и млекопитающие). Однако, мы относим

металлопротеиназу MprBi к адамализинам/репролизинам на основании того, что в последовательности мотива активного центра металлопротеиназы MprBi после третьего гистидина (His136) расположена аминокислота Asp, а не Glu (рис. 18). В зрелой молекуле астацина остаток Glu103 (нумерация по астацину), расположенный после третьего гистидинового лиганда, образуется солевой мостик с N-концевым остатком Ala1. Замены Glu103 на Gln или Ala практически не влияли на катализ, но значительно снижали стабильность фермента. Таким образом, связь между Glu103 и Ala1 является важной в стабилизации молекулы зрелого астацина [Yiallourous et al., 2002, Bode et al., 1992, 1993, Guevara, et al., 2010]. Так как остаток Glu103 характерен только для членов астацинового семейства (рис. 18), некоторые исследователи считают, что Glu103 также относится к мотиву **HELMHAI⁺GFYH⁺E** активного центра астацина [Bode et al., 1992, Jiang et al., 1992b, Gomis-Rüth et al., 1993]. Как видно из рис 18, остаток Asp, расположенный рядом с третьим цинковым лигандом гистидином, является характерным для семейства адамализинов/репролизинов. В отличие от остатка Glu у астацинов, Asp адамализинов/репролизинов не участвует в процессах активации фермента [Yiallourous et al., 2002], что дает нам основание полагать, что и для активации MprBi данный остаток не является ключевым.

Структура Met-поворота MprBi является более противоречивой: остаток Tug149, характерный для всех представителей семейства астацинов и играющий важную роль в каталитическом акте, присутствует в структуре MprBi параллельно с Cys145, характерным для всех ферментов семейства адамализинов. Следует отметить, что Tug в подобной позиции характерен также для ферментов семейства серрализинов, но серрализины синтезируются без сигнального пептида, роль которого выполняет C-домен фермента [Gomis-Rüth, 2003]. На C-конце этого домена содержится от 20 до 50 аминокислотных остатков, действующих как сигнал для транслокации, в котором консервативный C-концевой мотив DXXX (X – любая гидрофобная аминокислота) необходим для инициации секреции. Для серрализинов и

мирабилизинов эта последовательность - DFIV [Hamada et al., 1996]. Отметим, что С-домен не удаляется протеолитически при секреции серрализинов в среду. Для металлопротеиназы MprBi нами показано N-концевое расположение сигнальной последовательности, а значит её нельзя отнести к семейству серрализинов. Наличие остатка Cys145 в Met-повороте молекулы MprBi, который характерен только для эндопептидаз семейства адамализинов/репролизинов, подтверждает классификационную принадлежность исследуемого белка к этому семейству.

На основании последовательности зрелой молекулы MprBi с помощью программы BLAST был осуществлен поиск ферментов с максимальным процентом идентичности первичной структуры белка. Аминокислотные последовательности семи обнаруженных белков конвертированы из нуклеотидной последовательности соответствующих генов, так как они не выделены в гомогенном состоянии и нет никаких данных об их структуре и свойствах. Эти бациллярные металлопротеиназы имеют уровень идентичности аминокислотных последовательностей с последовательностью зрелой MprBi от 92% до 100 %. Максимальная идентичность консервативных последовательностей (мотив активного центра и Met-поворот) наблюдается с репролизином и гипотетическим белком *Bacillus pumilus* (100%). С гипотетическими белками *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus sp.* идентичность составляет 76% (табл. 14).

Таблица 14

Консервативные аминокислотные последовательности предполагаемых бациллярных адамализинов

Предполагаемые адамализины у бацилл	Регистрационный номер	Мотив активного центра	Met-поворот	% идентичности с MprBi
MprBi (<i>B. intermedius</i> 3-19)	EU678894	HEYGHNFGLPHD	CLMNY	нет
reprolysin (M12B) [<i>B. pumilus</i> ATCC 7061]	ZP_03055196.1	HEYGHNFGLPHD	CLMNY	100
Гипотетический белок BPUM_3392 [<i>B. pumilus</i> SAFR-032]	YP_001488604.1	HEYGHNFGLPHD	CLMNY	100
Гипотетический белок				

BL03917 [<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580]	YP_081058.1	HEFSHNFGLNHD	CIMNY	76
Цинкзависимая металлопротеиназа BITM02A Flags: предшественник [<i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> DSM7]	CBI44320.1	HEFSHNFGQLQHD	CVMNY	76
Гипотетический белок RBAM_030640 [<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42]	YP_001422626	HEFSHNFGQLQHD	CVMNY	76
Гипотетический белок B14911_09922 [<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911]	ZP_01171403.1	HEFSHNFGGLGHD	CIMNY	76
Гипотетический белок BSG1_12336[<i>Bacillus</i> sp. SG-1]	ZP_01859226.1	HEFSHNYGLGHD	CIMNY	76

По ключевым аминокислотным остаткам приведенные белки также представляют собой адамализины с особенностями астацинов. Все они имеют характерные для адамализинов остаток Asp рядом с третьим His в мотиве активного центра и остаток Cys в Met-повороте, а также характерный для всех астацинов «тирозиновый переключатель», необходимый для активации фермента. Возможно, подобное смешение признаков является ключевой особенностью бациллярных адамализиноподобных эндопептидаз.

Итак, на основании анализа первичной структуры MprBi установлено, что исследуемая нами рекомбинантная металлопротеиназа относится к семейству адамализинов/репролизинов клана метцинкинов цинкзависимых металлопротеиназ и является первым представителем данного семейства у прокариот в целом и у бацилл в частности.

Была исследована специфичность металлопротеиназы MprBi по гидролизу синтетических хромогенных субстратов (табл. 12). Металлопротеиназа MprBi гидролизует синтетические тетрапептиды интенсивнее, чем трипептиды, вероятно более длинные субстраты быстрее связываются с активным центром фермента [Воюшина с соавт., 1991, Stöcker et al., 1990]. Амид синтетического тетрапептида практически также хорошо гидролизруется ферментом, как и тетрапептиды с карбоксильной группой и лишь гидролиз тетрапептида Dnp-Gly-Gly-Phe-Arg идет с низкой скоростью. Металлопротеиназа MprBi не

проявляет строгой субстратной специфичности, так как спектр аминокислотных остатков, образующих гидролизуемую пептидную связь, достаточно широк. Из литературы известно, что многие ферменты клана метцинкинов, обладающие аналогичным активным центром, предпочтительно гидролизуют более длинные пептиды. Так, для астацина эффективный гидролиз наблюдается на пептидах длиной не менее пяти аминокислотных остатков, оптимальная длина синтетических субстратов – семь или более аминокислотных остатков [Yiallourous et al., 2002, Воюшина с соавт., 1991]. Наименьшая длина субстрата, гидролизуемого мепринами - 4 аминокислотных остатка [Gomis-Rüth et al., 2003, Roche et al., 1978]. Для матриксинов среди синтетических субстратов лучшим оказался октапептид [Titani et al., 1987]. Сравнивая специфичность MprBi с другими ферментами клана метцинкинов можно отметить, что структура активного центра, общая для этого клана, по-видимому, достаточно строго определяет минимальную длину гидролизуемого пептида – не менее 4 аминокислотных остатков, но не влияет на спектр аминокислот, участвующих в образовании расщепляемой связи.

Исследована специфичность металлопротеиназы по гидролизу В-цепи окисленного инсулина. Данные масс-спектрометрии при изучении продуктов расщепления подтвердили, что фермент не проявляет предпочтения к определенным аминокислотам расщепляемой пептидной связи (рис. 19), что свидетельствует о широкой субстратной специфичности протеиназы MprBi. Известно, что ферменты клана метцинкинов проявляют узкую субстратную специфичность по гидролизу природных субстратов, а многие ферменты семейства MMPs (матриксинов) и адамализинов осуществляют ограниченный протеолиз. Показано, что эндопептидаза PrtA из патогенного насекомого *Photorhabdus luminescens*, относящаяся к семейству серрализинов, гидролизует В-цепь окисленного инсулина только по связям Val, Ala и Leu [Marokhazi et al., 2007]. Активность астацина *Astacus astacus* L – одного из характерных представителей семейства - определяется по гидролизу казеина, азоказеина, желатина, коллагена, В-цепи окисленного инсулина при нейтральном значении

pH. При расщеплении пептидных связей В-цепи окисленного инсулина астацин проявляет предпочтение к аминокислотным остаткам с короткими боковыми цепями (Ala, Thr, Ser, Gly) в положении P1', к пролину в положении P2 и P3 и к гидрофобным остаткам в положении P3' и P4', что говорит о более строгой субстратной специфичности, чем у MprBi. Меприн β предпочитает отрицательно заряженные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот, в то время как меприн α гидролизует связи по остаткам алифатических и ароматических аминокислот. Кроме того, меприн α проявляет предпочтение к пролину, отстоящему на несколько аминокислот от разрезаемой связи [Beunon et al., 1981]. Флавастацин *Flavobacterium meningosepticum* - нейтральная эндопептидаза, осуществляющая ограниченный протеолиз пептидов по остаткам аспарагиновой кислоты в P1' положении [Bond et al., 1995]. Гидролиз этих же субстратов с остатками Glu вместо Asp протекает только при высоких концентрациях фермента и длительном времени инкубации. Репролизины осуществляют ограниченный протеолиз природных субстратов по одной-двум пептидным связям. Так, тримерелизины расщепляют α -цепь фибриногена по связи Pro516-Met517, металлопептидаза из яда кобры *Naja* осуществляет ограниченный протеолиз α -цепи человеческого фибриногена по двум связям Lys412-Leu413 и Phe501-Asp502 [Matsui et al., 2000].

Таким образом, металлопротеиназа MprBi, в отличие от хорошо изученных метцинкинов, обладает широкой субстратной специфичностью по гидролизу природных и синтетических субстратов.

Установлено, что pH оптимум исследуемой металлопротеазы соответствует 8,0 (рис. 20А). Это указывает на то, что металлопротеиназа MprBi относится к группе щелочных металлопротеиназ. Большинство метцинкинов имеют оптимум pH действия в интервале от 7,0 до 9,0: для астацина pH-оптимум находится в интервале pH 7,5-9,5 и частично зависит от субстрата [Stöcker et al., 1995b, Bond et al., 1995], серрализины проявляют протеолитическую активность в широком диапазоне pH от 6,0 до 10,0 с оптимумом pH 8,0 [Morichara et al., 1973], для матриксинов оптимальным является pH среды 7,0 [Gomis-Rüth,

2003], оптимальная протеолитическая активность репролизина проявляется в слабощелочных условиях (pH 7,5) [Matsui et al., 2000, Gong et al., 1998]. Таким образом, оптимум pH действия металлопротеиназы MprBi находится в тех же пределах, которые характерны для других эндопептидаз клана метцинкинов.

Температурный оптимум исследуемой протеазы лежит в пределах 50-55°C (рис. 21А). Похожий температурный оптимум имеют и другие цинкзависимые металлопротеазы: протеаза *NprM B. megaterium* имеет оптимум активности при 58°C [Kuhn et al., 1993], протеазы *B. stearothermophilus S, N* и *B* имеют температурный оптимум при 70°, 85° и 90°C соответственно. [Sookkheo et al., 2000], а протеазы *B. cereus KCTC 3674* – при 70°C. [Kim et al., 2001].

Протеиназа MprBi стабильна в интервале от 22°C до 55°C в течение 1 ч и её можно отнести к термостабильным металлопротеиназам (рис. 21Б). Похожие показатели имеет и протеаза *B. subtilis* [Tran et al., 1991]. Большинство же металлопротеиназ семейства термолизина проявляют гораздо большую термостабильность: протеазы *B. stearothermophilus S, N* и *B* сохраняют половину своей активности в течении 30 минут при 72°, 78° и 90°C соответственно [Sookkheo et al., 2000]. Сам термолизин стабилен в течении часа при 80°C и даже выдерживает кипячение в течение 1 мин [Rao et al., 1998, Kuhn et al., 2002].

По данным литературы ионы Ca^{2+} и Zn^{2+} играют важную роль в стабилизации фермента. Так, матриксины проявляют высокую протеолитическую активность, если в реакционной среде присутствуют ионы цинка и кальция в концентрации 0,5 мМ и 5 мМ соответственно [Gomis-Rüth, 2003]. Было показано, что кроме каталитически важного цинка у репролизина на поверхности молекулы имеется ион кальция, который связывается с 7 или 6 атомами кислорода, способствуя структурной стабильности каталитического домена [Gong et al., 1998]. Мы исследовали влияние ионов различных металлов на активность гомогенного препарата металлопротеазы. Концентрация ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} 10мМ является оптимальной, при которой наблюдается максимальная активность (рис. 22). В литературе есть сведения,

подтверждающие, что эти ионы имеют стабилизирующее значение для многих металлопротеиназ. Показано, что в присутствии миллимолярных концентраций Ca^{2+} повышается рН-стабильность репролизингов [Seals et al., 2003].

Влияние ионов Ca^{2+} на стабильность молекулы можно рассмотреть для хорошо изученных цинкзависимых металлопротеиназ клана глутинкинов (термолизина и термолизиноподобных ферментов). Ионы кальция в Ca -связывающих сайтах ферментов этого клана участвуют в стабилизации белковой молекулы, так как многие из них не имеют дисульфидных связей. Известно, что стабильность ферментов характеризуется балансом внутримолекулярных нековалентных взаимодействий (водородные связи, ионные пары и ван-дер-ваальсовы силы), которые могут быть разрушены при различных стрессовых ситуациях (высокая температура, высокая ионная сила буферного раствора, сильно кислые и сильно щелочные значения рН). При этом возникают локальные денатурированные области (локальный анфолдинг), что может привести к необратимой аутокаталитической деградации белка [Vieille et al., 2001, Демидюк с соавт., 2003]. Стабилизация белковой молекулы может быть увеличена различными стабилизирующими взаимодействиями. Высокая гидрофобность белковой молекулы, аминокислотные замены, ведущие к созданию дополнительных водородных и дисульфидных связей, солевых мостиков, увеличивают стабильность ферментов [Häse et al., 1993, Kumar et al., 2000]. Показано, что появление дополнительной дисульфидной связи в цистеиновом мутанте протеиназы *B. stearothermophilus* в области частичного анфолдинга способствовало повышению стабильности молекулы белка [Mansfeld et al., 1997].

При отсутствии дисульфидных связей большое значение для стабилизации молекулы белка приобретают ионы двухвалентных металлов и, в частности, ионы кальция, которые, создавая дополнительные нековалентные взаимодействия, защищают фермент от необратимого процесса инактивации, ведущей к быстрому автолизу. Важность ионов кальция для термолизина подтверждена с помощью хелатора ЭДТА, который связывает ионы кальция,

что приводит к быстрой аутокаталитической деградации белка [Dahlquist et al., 1976].

Установлено, что ион кальция в Ca3-связывающем сайте термолизиноподобной протеиназы *B. stearothermophilus*, связываясь с остатком аспарагина в критической для стабилизации области N-концевого домена, образует две водородные связи. Если эти связи нарушаются, то это приводит к частичному раскручиванию молекулы белка и, как следствие, к автолизу и потере активности. Кроме того, показано, что без иона кальция в Ca1-связывающем сайте не возможен правильный фолдинг молекулы белка. Таким образом, было установлено, что ионы кальция не играют каталитическую роль, а защищают фермент от частичного анфолдинга и, как следствие необратимой инактивации [Barrett, 1998, Veltman et al., 1997, 1998]. В подтверждение сказанного следует, что отсутствие двух кальцийсвязывающих сайтов (Ca3 и Ca4) в молекуле бациллолизина клана глюцинкинов приводит к меньшей стабильности этого фермента, чем термолизина [Raupitt et al., 1988].

Исследуемая эндопептидаза MprBi не содержит аминокислотных остатков, образующих дисульфидные связи (рис. 17), поэтому мы предположили, что ионы двухвалентных металлов могут стабилизировать структуру белка, защищая её от локального анфолдинга, который возможен в процессе выделения фермента из культуральной жидкости и очистки его до гомогенного состояния. При исследовании влияния ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на активность фермента показано увеличение каталитической активности на 30% и 20% соответственно, что позволяет высказать предположение о влиянии этих ионов на стабильность металлоэндопептидазы MprBi.

Обсуждая возможную функциональную роль MprBi в клетках бацилл, отметим, что основная трудность заключается в том, что все изученные гомологи фермента являются эукариотическими белками. Эукариотические адмализины/репролизины и астаины преимущественно мультидоменные белки, выполняющие в клетке регуляторные функции. Структура зрелого белка MprBi состоит из единственного протеазного домена, а значит спектр задач,

выполняемых ферментом, ограничивается протеолитическим расщеплением. Кроме того, нами было показано, что MprVi, в отличие от своих эукариотических гомологов, обладает широкой субстратной специфичностью, что может препятствовать осуществлению тонких механизмов регуляции. Обнаруженные у других бацилл гипотетические гомологи MprVi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) свидетельствуют о том, что исследуемая нами металлопротеиназа принадлежит к группе бактериальных ферментов, обладающих уникальным сочетанием структурных особенностей семейств астафинов и адамализинов. Учитывая, что эндопептидазы эукариот в массе своей являются регуляторными белками, мы можем предположить, что их бациллярные гомологи, возможно, выполняют в клетке аналогичные задачи. При отсутствии строгой субстратной специфичности маловероятно, что MprVi участвует в регуляторных процессах на основе избирательного взаимодействия с другими белками, как это показано для эукариотических эндопептидаз. Однако, тот факт, что протеолитическая активность MprVi появляется и достигает своего максимума за короткий промежуток времени, соответствующий началу стационарной фазы роста культуры, т. е. в момент смены механизмов регуляции синтеза ферментов в популяции клеток, может указывать на функцию временной регуляции MprVi. Вопрос о функциональной роли эндопептидазы MprVi предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю *Нэлли Павловне Балабан*, а также профессору Казанского федерального университета *Маргарите Рашидовне Шариповой* за руководство и всестороннюю поддержку при выполнении данной работы.

ВЫВОДЫ

1. Подобран состав питательной среды, обеспечивающий высокий уровень продукции металлоэндопептидазы *B. intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*
2. Выделена и очищена гомогенная металлоэндопептидаза MprBi, со степенью очистки 350 и выходом 11,3%. Молекулярная масса металлоэндопептидазы составляет 19 kDa
3. Методом MALDI-TOF спектрометрии установлена аминокислотная последовательность MprBi, определена N-концевая последовательность зрелого фермента. Фермент классифицирован как металлоэндопептидаза семейства адамализинов/репролизинов клана метцинкинов цинкзависимых металлопротеиназ
4. Установлено, что металлопротеиназа MprBi обладает широкой субстратной специфичностью по гидролизу синтетических и природных субстратов
5. Установлено, что металлоэндопептидаза MprBi является щелочным термостабильным ферментом, активность которого зависит от присутствия ионов двухвалентных металлов. pH-Оптимум действия фермента лежит к области pH 8,0, интервал стабильности MprBi 22-55°C

Список литературы

1. **Балабан, Н.П.** Биосинтез субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* H2 и биологические свойства фермента [Текст] / Н.П. Балабан, А.М. Марданова, Л.А. Маликова, О.Н. Ильинская, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – Т.150, кн.2. – С.81-90.
2. **Воюшина, Т.Л.** Ферментативный синтез ацилпептидов, содержащих *n*-нитроанилиды основных аминокислот [Текст] / Т.Л. Воюшина, Е.Ю. Терентьева, В.Ф. Поздеев, А.В. Гайда, М.Ю. Гололобов, Л.А. Люблинская, В.М. Степанов // Биоорг. Химия. – 1991. – Т.17, №8. – С. 1066-1073.
3. **Габдрахманова, Л.А.** Среда для биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* [Текст] / Л.А. Габдрахманова, Е.В. Шакиров, Н.П. Балабан и др. // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 5. – С. 653-659.
4. **Габдрахманова, Л.А.** Оптимизация среды культивирования для продукции глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* 3-19 [Текст] / Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Ю.С. Токмакова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2002. – Т.71, №3. – С.323-329.
5. **Демидюк, И.В.** Молекулярные механизмы стабилизации протеолитических ферментов. Модель термолизиноподобных микробных металлопротеиназ [Текст] / И.В. Демидюк, М.В. Заболотская, Д.Р. Сафина, С.В. Костров // Биоорг. Химия. – 2003. – Т.29, №5. – С.461-469.
6. **Ицкович, Е.Л.** Биосинтез щелочной внеклеточной протеиназы *Bacillus intermedius* [Текст] / Е.Л. Ицкович, Л.В. Знаменская, Н.П. Балабан, Т.А. Ершова, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 1995. - Т.64, №.5. - С. 623 - 629.
7. **Каверзнева, Е.Д.** Стандартный метод определения протеолитической активности комплексных препаратов протеаз [Текст] / Е.Д. Каверзнева // Прикл. биохимия и микробиология. – 1971. – Т. 7, № 2. – С. 225-228.

8. **Кириллова, Ю.М.** Условия роста культуры и биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* [Текст] / Ю.М. Кириллова, Е.О. Михайлова, Н.П. Балабан, А.М. Марданова, Г.Н. Руденская, С.В. Костров, М.Р. Шарипова // Микробиология. – 2006. – Т.75, №2. – С.172-178.
9. **Люблинская, Л.А.** р-Нитроанилиды пироглутамилпептидов – хромогенных субстратов сериновых протеиназ [Текст] / Л.А. Люблинская, Т.Л. Воюшина, В.М. Степанов // Биоорганическая химия. – 1987. – Т. 13, № 6. – С. 748-753.
10. **Маликова, Л.А.** Особенности биосинтеза внеклеточных субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых *Bacillus pumilus* КММ 62 [Текст] / Л.А. Маликова, А.М. Марданова, Е.А. Соколова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2006. – Т.148, кн.2. – С.90-102.
11. **Маликова, Л.А.** Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* КММ 62 [Текст] / Л.А. Маликова, А.М. Марданова, Е.А. Соколова, Н.П. Балабан, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Микробиология. – 2007. – Т.76, №3. – С.313-320.
12. **Михайлова, Е.О.** Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* АЖ 73 на разных фазах роста бацилл [Текст] / Е.О. Михайлова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Биохимия. – 2007. – Т.72, №2. – С.228-236.
13. **Морозова, И.П.** Выделение и характеристика металлопротеиназы *Bacillus megaterium* [Текст] / И.П. Морозова, Г.Г. Честухина, М.Е. Борматова, М.Ю. Гололобов, Н.М. Иванова, Е.Н. Лысогорская, И.Ю. Филиппова, О.М. Ходова, Е.А. Тимохина, В.М. Степанов. // Биохимия. – 1993. – Т.58, №6. – С. 896 – 907.

14. **Сафонова, М.Е.** Особенности роста и продукции внеклеточных протеиназ *Lactobacillus plantarum* ИМ-9/138 [Текст] / М.Е. Сафонова, Н.И. Астапович, И.А. Буряко // Микробиология. – 1999. – Т.68, № 4. – С. 396-403.
15. **Хазиев, А.Ф.** Изучение эффективности методов очистки металлопротеазы, продуцируемой *Bacillus subtilis* [Текст] / А.Ф. Хазиев, Н.А. Михайлова, М.М. Алсынбаев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2002. - №6. – С. 75 – 77.
16. **Хазиев, А.Ф.** Изучение свойств высокоочищенной металлопротеазы, продуцируемой *Bacillus subtilis* [Текст] / А.Ф. Хазиев, Н.А. Михайлова, М.М. Алсынбаев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2003. - №3. – С. 91 – 93.
17. **Хофманн, Э.** Что может дать медицине секвенирование генома человека [Текст] / Э. Хофманн // Биохимия, 2001, Т.66, №10, С. 1415-1424.
18. **Частухина, И.Б.** Регуляция биосинтеза внеклеточной глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* на стадии спорообразования [Текст] / И.Б. Частухина, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, Д.В. Сафина, С.В. Костров, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2004. – Т.73, №3. – С.1-8.
19. **Частухина, И.Б.** Особенности биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными клетками *Bacillus subtilis* в стационарной фазе роста [Текст] / И.Б. Частухина, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, С.В. Костров, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2005. – Т.74, №1. – С.39-47.
20. **Шакиров, Е.В.** Влияние компонентов питательной среды на накопление глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости *Bacillus intermedius* 3-19 [Текст] / Е.В. Шакиров, Л.А. Габдрахманова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 1. – С. 29 - 33.

21. **Шарипова, М.Р.** Локализация протеолитических ферментов в клетках *Bacillus intermedius* [Текст] / М.Р. Шарипова, Е.В. Шакиров, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, М.А. Шилова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2000. – Т.69, №5. – С.660-667.
22. **Шарипова, М.Р.** Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* [Текст] / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, М.А. Шилова, Ю.М. Кадырова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. – 2002. – Т.71, №4. – С.494-499.
23. **Шамсутдинов, Т.Р.** Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста [Текст] / Т.Р. Шамсутдинов, Н.П. Балабан, А.М. Марданова, Ю.В. Данилова, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Биоорганическая химия. – 2008. – Т.34, №3. – С.322-326.
24. **Adinarayana, K.** Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* [Текст] / K. Adinarayana, P. Ellaiah // J. Pharm. Pharmaceut Sci. – 2002. – V. 5, № 3. – P. 272-278.
25. **Anagnostopoulos, C.** Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* [Текст] / C. Anagnostopoulos, J. Spizizen // J Bacteriol. – 1961. – V.81, №5. – P.741-746.
26. **Balaban, N.** Selection of cultivation medium for production of late stationary phase serine proteinases from *Bacillus intermedius* / N. Balaban, L. Gabdrakhmanova, M. Sharipova, E. Sokolova, L. Malikova, A. Mardanova, G. Rudenskaya, I. Leshchinskaya // J. Basic Microbiol. – 2004. – V.44, №6. – P.415-423.
27. **Banerjee, A.** Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans* [Текст] / A. Banerjee, K. Ganesan, A. Datta // J. Gen. Microbiology. - 1991. – V. 137. – P. 2455-2461.

28. **Barrett, A.J.** Handbook of Proteolytic Enzymes. [Текст] / A.J. Barrett, N.D. Rawling, J.F. Woessner // Academic Press Inc., New York. – 1998. – P. 992 – 1415.
29. **Baumann, U.** Three-dimensional X-ray crystallographic structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa* [Текст] / U. Baumann, S. Wu, K.M. Flaherty, D.B. McKay // EMBO J. – 1993. – V.12. – P.3357-3364.
30. **Baumann, U.** Crystal structure of the 50 kDa metalloprotease from *Serratia marcescens* [Текст] / U. Baumann // J. Mol. Biol. – 1994. – V.242. – P.244-251.
31. **Becker, A.** An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases [Текст] / A. Becker, R.A. Roth // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V.89. – P.3835-3839.
32. **Becker, C.** Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin [Текст] / C. Becker, M.N. Kruse, K.A. Slotty, D. Köhler, J.R. Harris, S. Rösmann, E.E. Sterchi, W. Stöcker // J. Biol. Chem., 2003, V.384, №5, P.825-831.
33. **Beg, Q.K.** De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations [Текст] / Q.K. Beg, R.K. Saxena, R. Gupta // Process Biochem. – 2002. – V. 37. – P. 1103-1109.
34. **Beynon, R.J.** Purification and characterization of a metallo-endopeptidase from mouse kidney [Текст] / R.J. Beynon, J.D. Shannon, J.S. Bond // Biochem. J. – 1981. – V.199. – P.591-598.
35. **Bode, W.** Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases [Текст] / W. Bode, F.-X. Gomis-Rüth, R. Huber, R. Zwilling, W. Stöcker // Nature. – 1992. – V.358. – P.164-167.
36. **Bode, W.** Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environment (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins” [Текст] / W. Bode, F.-X. Gomis-Rüth, R. W. Stöcker // FEBS Lett. – 1993. – V.331. – P.134-140.

37. **Bode, W.** The metzincins – superfamily of zincpeptidases [Текст] / W. Bode, F. Grams, P. Reinmer, F.-X. Gomis-Rüth, U. Baumann, D.B. McKay, W. Stöcker // *Advan. Exp. Med. Biol.* – 1996. - V.389. - P. 1-11.
38. **Bond, J.** The astacin family of metalloendopeptidases [Текст] / J. Bond, R.J. Beynon // *Protein Science.* – 1995. – V.4 – P.1247-1261.
39. **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [Текст] / M.M. Bradford // *Anal Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
40. **Butler, G.S.** The canonical methionine 392 of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is not required for catalytic efficiency or structural integrity: probing the role of the methionine-turn in the metzincin metalloproteinase superfamily [Текст] / G.S. Butler, E.M. Tam, C.M. Overall // *J. Biol. Chem.* – 2004. - V.279. - P.15615-15620.
41. **Charney, J.** A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice [Текст] / J. Charney, R.M. Tomarelli // *J. Biochem.* – 1947. – V.177. –P.501-505.
42. **Cho, S-J.** Purification and Characterization of Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Traditional Soybean Fermentation Starter [Текст] / S-J. Cho, S-H. Oh, R.D. Pridmore, M.A. Juillerat, C.H. Lee // *J. Agricultural and Food Chemistry.* - 2003. – V.51. –P. 7664 – 7670.
43. **Dahlquist, F.W.** Role of calcium in the thermal stability of thermolysin [Текст] / F.W. Dahlquist, J.F. Long, W.L. Bigbee // *Biochemistry.* – 1976. – V.15, No5. – P.1103-1111.
44. **Demidyuk, I.V.** Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius* [Текст] / I.V. Demidyuk, D.V. Romanova, E.A. Nosovskaya, G.G. Chestukhina, I.P. Kuranova, S.V. Kostrov // *Prot. Eng., Des. and Selec.* – 2004. – V17, №5. – P.411-416.
45. **Dumermuth, E.** The astacin family of metalloendopeptidases [Текст] / E. Dumermuth, E.E. Sterchi, J. Jiang, R.L. Wolz, J.S. Bond, A.V. Flannery, R.J. Beynon // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V.266. – P.21381-21385.

46. Enzyme nomenclature 1992: recombination of the Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular biology and classification of enzymes [Текст]. San Diego, 1992, P.862.
47. **Feder, J.** *Bacillus cereus* neutral protease [Текст] / J. Feder, L. Keay, L.R. Garrett, N. Cirulis, M.H. Moseley, B. S. Wildi // *Biochemica et biophysica acta*. – 1971. – V.251. –P. 74 – 78.
48. **Ge, G.** Development roles of the BMP1/TLD metalloproteinases [Текст] / G. Ge, D.S. Greenspan // *Birth Defects Research (Part C)*, 2006, V.78, P.47-68.
49. **Gomis-Rüth, F.-X.** Refined 1,8 Å X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus* L. [Текст] / F.-X. Gomis-Rüth, W. Stöcker, R. Huber, R. Zurilling, W. Bode // *J. Mol. Biol.* – 1993. – V.229. – P. 945-968.
50. **Gomis-Rüth, F.-X.** Crystal structures, spectroscopic features and catalytic properties of Cobalt (II), Copper (II), Nickel (II) and Mercury (II) derivatives of the zinc endopeptidase astacin [Текст] / F.-X. Gomis-Rüth, F. Grams, I. Yiallourous, H. Nar, U. Küsthardt, R. Zwillling, W. Bode, W. Stöcker // *J. Biol. Chem.* - 1994a. - V.269, №25. - P.17111-17117.
51. **Gomis-Rüth, F.-X.** Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc endopeptidase adamalysins II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin [Текст] / F.-X. Gomis-Rüth, L.F. Kress, J. Kellermann, I. Mayr, X. Lee, R. Huber, W. Bode // *J Mol Biol.* – 1994b. – V.239. – P.513-544.
52. **Gomis-Rüth, F.-X.** Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases [Текст] / F.-X. Gomis-Rüth // *Mol. Biotechnology.* – 2003. – V.24. – P.157-202.
53. **Gomis-Rüth, F.-X.** Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteinases [Текст] / F.-X. Gomis-Rüth // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V.284, №23. – P.15353-15357.

54. **Gong, W.** Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus* [Текст] / W. Gong, X. Zhu, S. Liu, M. Teng, L. Niu // J. Mol. Biol., 1998, V.283, P.657-668.
55. **Gorbea, C.M.** Homo- and heterotetrameric forms of the membrano-bound metalloendopeptidases meprin A and B [Текст] / C.M. Gorbea, A.V. Flannery, J.S. Bond // Arch. Biochem. Biophys. – 1991. – V.290. - P.549-553.
56. **Gorbea, C.M.** Cloning, expression and chromosomal localization of the mouse meprin beta subunit [Текст] / C.M. Gorbea, P. Marchand, W. Jiang, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, J.S. Bond // J. Biol. Chem. – 1993. – V.268. – P.21035-21043.
57. **Grams, F.** Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism [Текст] / F. Grams, R. Huber, L.F. Kress, L. Moroder, W. Bode // FEBS Lett. – 1993. - V.335, №1. - P.76-80.
58. **Guevara, T.** Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase [Текст] / T. Guevara, I. Yiallourous, R. Kappelhoff, S. Bissdorf, W. Stöcker, F.-X. Gomis-Rüth // J Biol Chem. – 2010. – V.285, №18. – P.13958-13965.
59. **Hamada, K.** Crystal srtructure of *Serratia* proteinase from *Serratia sp.* E-15, containing a beta-sheet coil motif at 2,0 Å resolution [Текст] / K. Hamada, Y. Hata, Y. Katsuya, H. Hiramatsu, T. Fujiwara, Y. Katsube // J. Biochem. – 1996. – V. 119. – P.844-851.
60. **Häse, C.C.** Bacterial extracellular zink-containing metalloproteases [Текст] / C.C. Häse, R.A. Finkelstein // Microbiol. Rew. – 1993. – V.57. – P.823-827.
61. **Hasty, K.A.** The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase [Текст] / K.A. Hasty, J.J. Jeffrey, M.S. Hibbs, H.G. Welgus // J. Biol. Chem. – 1987. – V.262. – P.313-318.
62. **Hege, T.** Protease C of *Erwinia chrysanthemi*: the crystal structure and role of amino acids Y228 and E189 [Текст] / T. Hege, U. Baumann // J. Mol. Biol. – 2001. – V.314. – P.187-193.
63. **Hite, L.A** cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: Structure, classification and their relationship to mammalian reproductive tract proteins

- [Текст] / L.A. Hite, L.G. Jia, J.B. Bjarnason, J.W. Fox // Arch Biochem Biophys. – 1994. – V.308. – P.182-191.
64. **Hojima, Y.** Type 1 procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization [Текст] / Y. Hojima, M. van der Rest, D.G. Prockop // J. Biol. Chem. – 1985. – V.260. – P.15996-16003.
65. **Jiang, W.** The alpha subunit of meprin A. Molecular cloning and sequencing, differential expression in inbred mouse strains, and evidence for divergent evolution of the alpha and beta subunits [Текст] / W. Jiang, C.M. Gorbea, A.V. Flannery, R.J. Beynon, G.A. Grant, J.B. Bond // J. Biol. Chem. – 1992a. – V.267. – P.9185-9193.
66. **Jiang, W.** Families of metalloendopeptidases and their relationships [Текст] / W. Jiang, J.S. Bond // FEBS Lett. – 1992b. – V.312. – P.110-114.
67. **Kessler, E.** Partial purification of a procollagen C-proteinase from the culture medium of mouse fibroblasts [Текст] / E. Kessler, R. Adar, B. Goldberg, R. Niece // Collagen Rel. Res. – 1986a. – V.6. – P.249-266.
68. **Kessler, E.** Bone morphogenetic protein-1: the type 1 procollagen C-proteinase [Текст] / E. Kessler, K. Takahara, L. Biniaminov, M. Brusel, D.S. Greenspan // Science. – 1986b. – V.271. – P.249-266.
69. **Kim, S.S.** Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674 [Текст] / S.S. Kim, Y.J. Kim, I.K. Rhee // Arch. Microbiol. – 2001. – V.175. – P. 458 – 461.
70. **Kuhn, S.** Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a calcium-dependent exoproteinase from *Bacillus megaterium* ATCC 14581 [Текст] / S. Kuhn, P. Fortnagel // J. Gen. Microbiol. – 1993. – V.139, №1. – P. 39 – 47.
71. **Kuhn, D.** Boilysin and thermolysin in dipeptide synthesis: a comparative study [Текст] / D. Kuhn, P. Durrschmidt, J. Mansfeld, R. Ulbrich-Holmann // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2002. – V.36 (Pt 1). – P. 71 – 76.
72. **Kumar, S.** Factors enhancing protein thermostability [Текст] / S. Kumar, C.-J. Tsai, R. Nussinov // Protein engineering. – 2000. – V.13, No3. – P.179-191.

73. **Laemmli, H.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Текст] / H.K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
74. **Letoffe, S.** Delepelaire P., Wandersman C. Characterization of a protein inhibitor of extracellular proteases produced by *Erwinia chrysantemi* [Текст] / S. Letoffe, P. Delepelaire, C. Wandersman // Mol. Microbiol. – 1989. – V. 3. – P. 79-86.
75. **Li, X.** PAPP-A: a possible pathogenic link to the instability of atherosclerotic plaque [Текст] / X. Li, Q. Liu, T. Zhou, S. Zhao, S. Zhou // Medical Hypotheses. – 2008. - V.70. - P.597-599.
76. **Lopez-Otin, C.** Proteases: multifunctional enzymes in life and disease [Текст] / C. Lopez-Otin, J.S. Bond J.S. // J. Biol. Chem., 2008, V.283, №45, P. 30433-30437.
77. **Mansfeld, J.** Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond [Текст] / J. Mansfeld, G. Vriend, B.W. Dijkstra, O.R. Veltman, B. van den Burg, G. Venema, R. Ulbrich-Hofman, V.G. Eijssink // J. Biol. Chem. – 1997. – V.272, No17. – P.11151-11156.
78. **Marokhazi, J.** Cleavage site analysis of a serralyisin-like protease, PrtA, from an insect pathogen *Photographus luminescens* and development of a highly sensitive and specific substrate [Текст] / J. Marokhazi, N. Mihala, F. Hudecz, A. Fodor, L. Graf, I. Venekei // FEBS Journal. - 2007. – V.274. – P.1946-1956.
79. **Matsui, T.** Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis [Текст] / T. Matsui, Y. Fujimura, K. Titani // BBA – 2000. - V.1477. - P.146-156.
80. **Miyatake, H.** Crystal structure of the unliganded alkaline protease from *P. aeruginosa* IF03080 and its conformational changes upon ligand binding [Текст] / H. Miyatake, Y. Hata, T. Fujii, K. Hamada, K. Morihara, Y. Katsube // J. Biochem. – 1995. – V.118. – P.474-479.
81. **Morichara, K.** On the specificity of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase with synthetic peptides [Текст] / K. Morichara, H. Tsuzuki, T. Oka // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – V.309. – P.414-429.

82. **Oberholzer, A.E.** Metzincin's canonical methionine is responsible for the structural integrity of the zinc-binding site [Текст] / A.E. Oberholzer, M. Bumann, T. Hege, S. Russo, U. Baumann // J. Biol. Chem., 2009, V.390, P.875-881.
83. **Pauptit, R.A.** Crystal structure of neutral protease from *Bacillus cereus* refined at 3,0 Å resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin [Текст] / R.A. Pauptit, R. Karlsson, D. Picot, J.A. Jenkins, F.-S. Niclaus-Reimer, L.N. Jansonius // J. Mol. Biol. – 1988. – V.199. – P.525-537.
84. **Pfleiderer, G.** Zur evolution der endopeptidasen III: eine protease vom molekulargewicht 11000 und eine trypsinähnliche fraktion aus *Astacus fluviatilis* [Текст] / G. Pfleiderer, R. Zwillig, H.H. Sonneborn // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. – 1967. – V. 348, №10. – P.1319-1331.
85. **Plummer, T.H.Jr.** Novel specific O-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins [Текст] / T.H.Jr. Plummer, A.L. Tarentino, C.R. Hauer // J. Biol. Chem. – 1995. – V.270. – P.13192-13196.
86. **Rao, M.B.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases [Текст] / M.B. Rao, A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande // Microbiology and molecular biology reviews. – 1998. – V.62 – P.597-635.
87. **Rawlings, N.D** Bone morphogenetic protein 1 is homologous in part with calcium-dependent serine proteinase [Текст] / N.D. Rawlings, A.J. Barrett // Biochem J. – 1990. – V.266, №2. – P.622-624.
88. **Rawlings, N.D.** Evolutionary families of peptidases [Текст] / N.D. Rawlings, A.J. Barrett // Biochem. J. – 1993. – V.290. – P.205-218.
89. **Rawlings, N.D.** MEROPS: the peptidase database [Текст] / N.D. Rawlings, F.R. Morton, C.Y. Kok, J. Kong, A.J. Barrett // Nucleic acid research. – 2004. – V.32. – D160-D164.
90. **Roche, R.S.** The structural and functional roles of metal ions in thermolysin [Текст] / R.S. Roche, G. Voordouw // CRC Crit Rev Biochem. – 1978. – V.5, №1. – P.1-23.

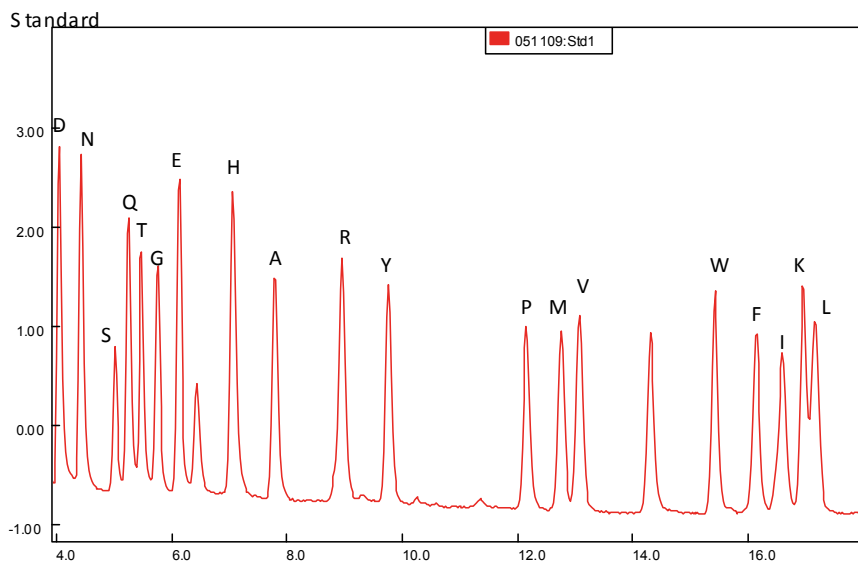
91. **Sambrook, J.** Molecular cloning: a laboratory manual [Текст] / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed. NY. - 1989.
92. **Sato, H.** A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells [Текст] / H. Sato, T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto, M. Seiki // Nature (Lond). – 1994. – V.370. – P.61-65.
93. **Seals, D.F.** The ADAM_s family of metalloproteases: multidomain protein with multiple functions [Текст] / D.F. Seals, S. Courtneidge // Gene. – 2003. – V.17. – P.7-30.
94. **Sharipova, M.R.** The expression of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene in *Bacillus subtilis* recombinant strains [Текст] / M.R. Sharipova, E.I. Shagimardanova, I.B. Chastukhina, T.R. Shamsutdinov, N.P. Balaban, A.M. Mardanova, G.N. Rudenskaya, I.V. Demidyuk, S.V. Kostrov // Mol. Biol. Rep. – 2007. – V.34. – P.79-87.
95. **Sharipova, M.** The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* [Текст] / M. Sharipova, N. Balaban, A. Kayumov, Yu. Kirillova, A. Mardanova, L. Gabdrakhmanova, I. Leschinskaya, G. Rudenskaya, T. Akimkina, D. Safina, I. Demidyuk, S. Kostrov // Microbiological Research. – 2008. – V.163. – P.39-50.
96. **Sookkheo, B.** Purification and characterization of the highly thermostable protease from *Bacillus stearothermophilus* TLS33 [Текст] / S. Sinchaikul, S. Phutrakul, S. S. Chen // Protein Expr. Purif. – 2000. – V.20, №2. – P. 142 – 151.
97. **Sorokin, A.V.** Expression unit from the replication region of the *Streptococcal* plasmid pSM19035 [Текст] / A.V. Sorokin, V.E. Khazak // Molecular Biology. – 1990. – V. 24. – P. 993-1000.
98. **Springman, E.B.** Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for activation [Текст] / E.B. Springman, E.L. Angleton, H. Birkedal-Hansen, H.E. Van Wart // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. - V.87. - P.364-368.

99. **Stepanov, V.M.** Proteinase affinity chromatography on bacitracin-Sepharose [Текст] / V.M. Stepanov, G.N. Rudenskaya // J. Appl. Biochem, - 1983. – V.5, №6. – P.420-428.
100. **Sterchi, E.E.** Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinase [Текст] / E.E. Sterchi, W. Stöcker, J.S. Bond // Molecular Aspects of Medicine. – 2008. – V.29. – P.309-328.
101. **Stöcker, W.** Fluorescent oligopeptide substrates for kinetic characterization of the specificity of *Astacus* protease [Текст] / W. Stöcker, M. Ng, D.S. Auld // Biochemistry. – 1990. – V.29, №45. – P.10418-10425.
102. **Stöcker, W.** The metzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases [Текст] / W. Stöcker, F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F.-X. Gomis-Rüth, D.B. McKay, W. Bode // Protein Sci.- 1995a. – V.4. – P.823-840.
103. **Stöcker, W.** Structural feature of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins [Текст] / W. Stöcker, W. Bode // Current Opinion in Structural Biology. – 1995b. – V.5. – P.383-390.
104. **Tallant, C.** Molecular analysis of Ulilysin, the structural prototype of a new family of metzincin metalloproteases [Текст] / C. Tallant, R. Garcia-Castellanos, J. Seco, U. Baumann, F.-X. Gomis-Rüth // J. Biol. Chem. – 2006. - V.281, №26. - P.17920-17928.
105. **Tallant, C.** Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains [Текст] / C. Tallant, A. Marrero, F.-X. Gomis-Rüth // BBA. – 2010. - V.1803, №1. - P.20-28.
106. **Tarentino, A.L.** Molecular cloning and sequence analysis of flavastacin: an O-glycosylated prokaryotic zinc metalloendopeptidase [Текст] / A.L. Tarentino, G. Quinones, B.G. Grimwood, C.R. Hauer, T.H.Jr. Plummer // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – V.319. – P.281-285.

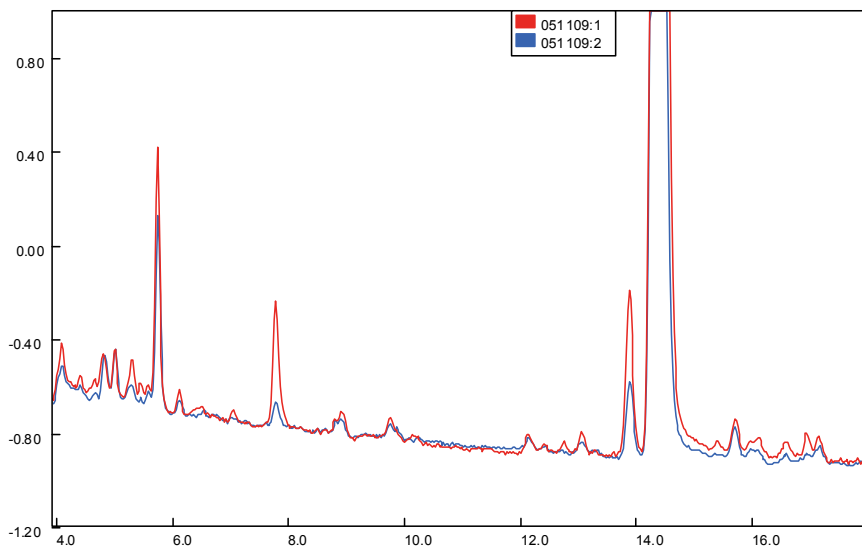
107. **Titani, K.** Amino acid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis* [Текст] / K. Titani, H.-J. Torff, S. Hormel, S. Kumar, K.A. Walsh, L. Rödi, H. Neurath, R. Zwilling // Biochemistry. – 1987. – V.26, №1. – P.222-226.
108. **Tran, L.** Cloning and expression of novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis* [Текст] / L. Tran, X.C. Wu, S.L. Wong // J. Bacteriol. – 1991. – V.173, №20. – P. 6364 – 6372.
109. **van den Burg, B.** Engineering an enzyme to resist boiling [Текст] / B. van den Burg, G. Vriend, O.R. Veltman, G. Venema, V.G.H. Eilsink // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1998. – V.95. – P. 2056 – 2060.
110. **Varela, H.** Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity [Текст] / H. Varela, M.D. Ferrari, L. Belobradjic, R. Weyrauch, M.L. Loperena // World J. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – V. 12. – P. 643-645.
111. **Veltman, O.R.** Engineering thermolysin-like proteases whose stability is largely independent of calcium [Текст] / O.R. Veltman, G. Vriend, B. van den Burg, F. Hardy, G. Venema, V.G.H. Eijsink // FEBS Lett. – 1997. – V.405. – P.241-244.
112. **Veltman, O.R.** A single calcium binding site is crucial for the calcium-dependent thermal stability of thermolysin-like proteases [Текст] / O.R. Veltman, G. Vriend, H.J.C. Berendsen, B. van den Burg, G. Venema, V.G.H. Eijsink // Biochemistry. – 1998. – V.37. – P.5312-5319.
113. **Vieille, C.** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability [Текст] / C. Vieille, G.J. Zeikus // Microbiol. And Mol. Biol. Reviews. – 2001. – V.65, No1. – P.1-43.
114. **Walasek, P.** Nonnatural amino acid incorporation into the methionin 214 position of the metzincin pseudomonas aeruginosa alkaline protease [Текст] / P. Walasek, J.F. Honek // BMC Biochemistry. – 2005. – V.6, №21. - doi:10.1186/147-2091-6-21.
115. **Yasumasu, S.** Medaka hatching enzyme consists of two kinds of proteases which act cooperatively [Текст] / S. Yasumasu, I. Iuchi, K. Yamagami // Zool. Sci. – 1988. – V.5. – P.191-195.

116. **Yiallourous, I.** The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases [Текст] / I. Yiallourous, E.G. Berkhoff, W. Stöcker // FEBS Lett. – 2000. – V.484. – P.224-228.
117. **Yiallourous, I.** Activation mechanism of pro-astacin: role of the propeptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing [Текст] / I. Yiallourous, R. Kappelhoff, O. Schilling, F. Wegmann, M.W. Helms, A. Auge, G. Brachtendorf, E.G. Berkhoff, B. Beermann, H.-J. Hinz, S. König, J. Peter-Katalinic, W. Stöcker // J. Mol. Biol. – 2002. – V.324. – P.237-246.

ПРИЛОЖЕНИЕ

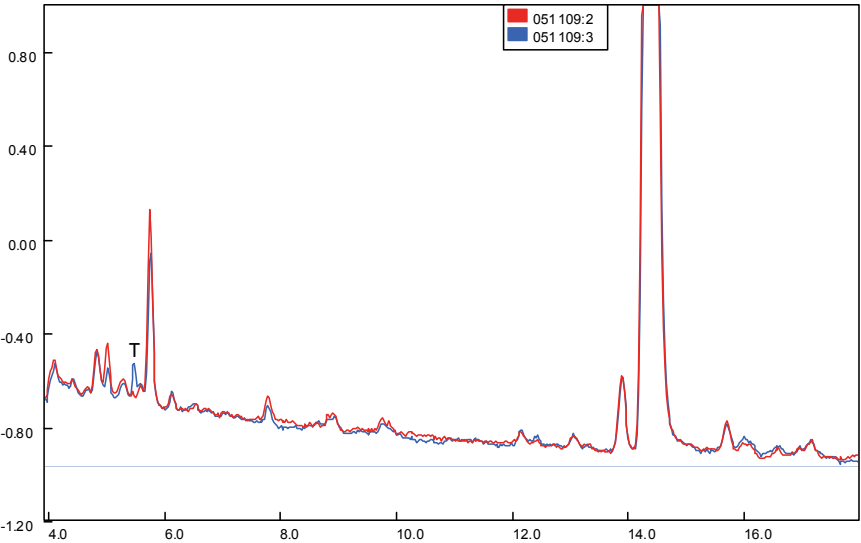


Cycle 1: -
Cycle 2: -

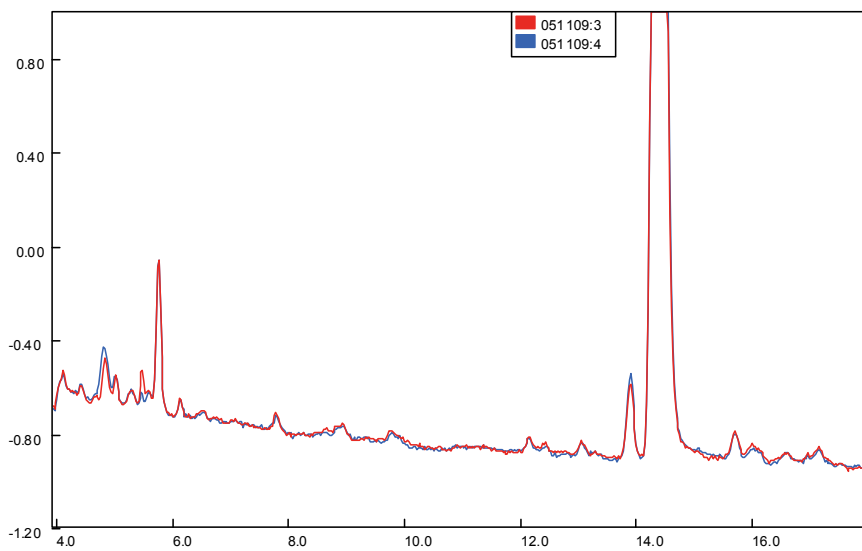


Cycle 2: -

Cycle 3: T

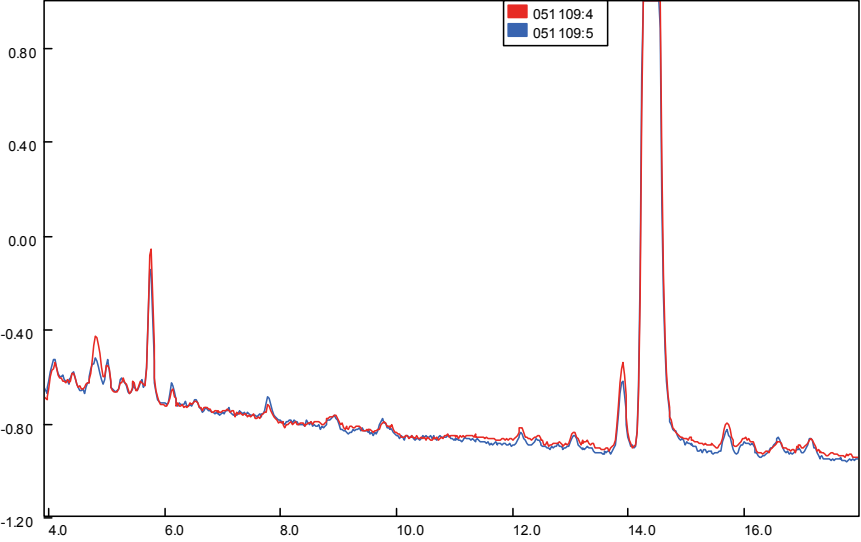


Cycle 3: T
Cycle 4: -

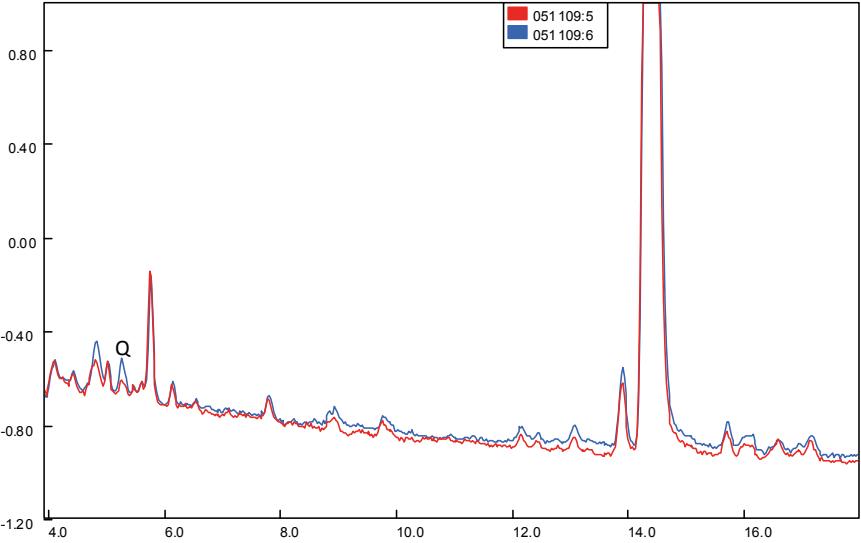


Cycle 4: -

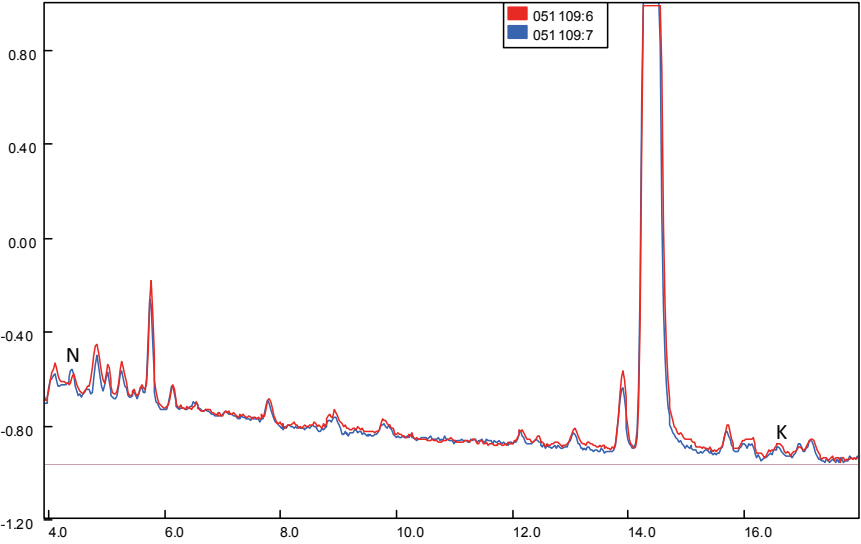
Cycle 5: -



Cycle 5: -
Cycle 6: Q

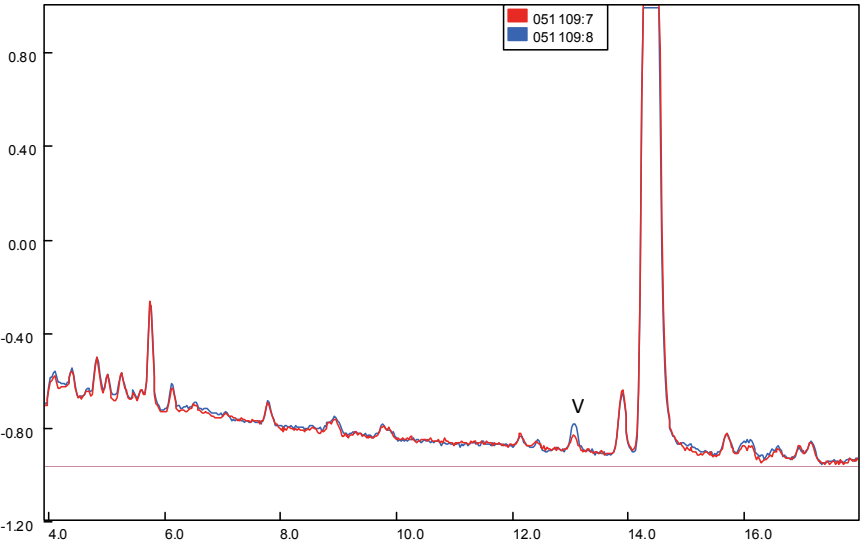


Cycle 6: Q
Cycle 7: K, N



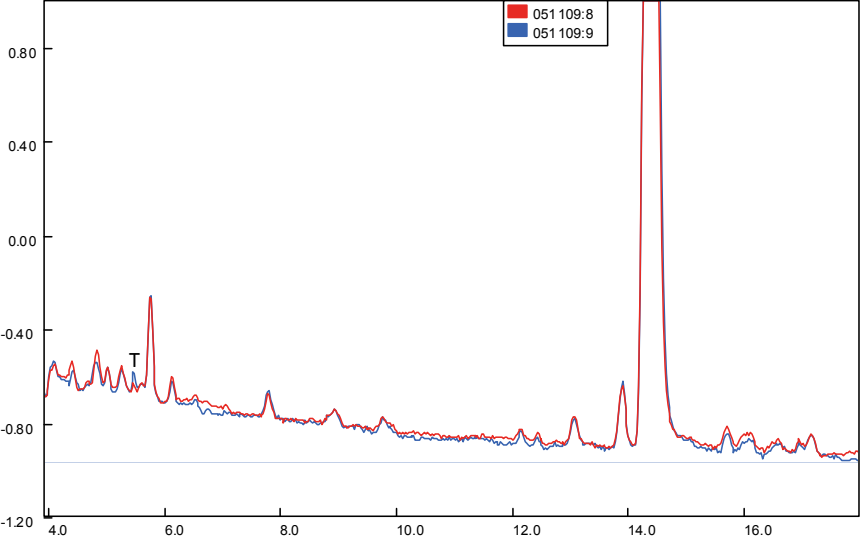
Cycle 7: K, N

Cycle 8: V

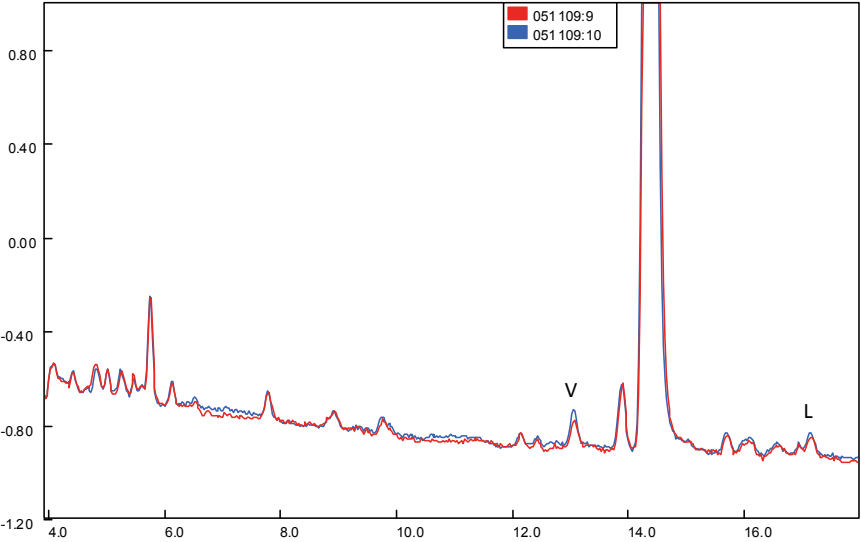


Cycle 8: V

Cycle 9: T



Cycle 9: T
Cycle 10: V, (L)



Люблю книги
ljubljuknigi.ru



yes
I want morebooks!

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн - в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов!
Мы используем экологически безопасную технологию "Печать-на-Заказ".

Покупайте Ваши книги на
www.ljubljuknigi.ru

Buy your books fast and straightforward online - at one of the world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.ljubljuknigi.ru

OmniScriptum Marketing DEU GmbH
Heinrich-Böcking-Str. 6-8
D - 66121 Saarbrücken
Telefax: +49 681 93 81 567-9

info@omniscrptum.com
www.omniscrptum.com

OMNIScriptum



