



УДК 579.222'152.34, 579.84, 579.8421/2

НОВАЯ МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗА *MORGANELLA MORGANII* ZM

© 2014 г. Н. М. Замалютдинова, Л. Ф. Миннуллина, М. Р. Шарипова, А. М. Марданова*

Казанский (Приволжский) федеральный университет,

420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

Поступила в редакцию 05.05.2014 г. Принята к печати 12.05.2014 г.

В клетках *Morganella morganii* ZM обнаружили протеолитическую активность, которая ингибируется в присутствии *o*-фенантролина. Протеазы, содержащиеся в клеточном лизате *M. morganii* ZM, в отличие от гримелизина, неограниченно расщепляют скелетно-мышечный актин. Зимография с желатином позволила выявить в клетках этих бактерий несколько белков, расщепляющих желатин. Индивидуальная металлоэндопептидаза с молекулярной массой 35 кДа была выделена и очищена из клеточных лизатов *M. morganii* ZM с помощью сульфатаммонийного фракционирования и гидрофобной хроматографии.

Ключевые слова: металлоэндопептидаза, *Morganella morganii*, BLASTP, выравнивание, очистка.

DOI: 10.7868/S0132342314060153

ВВЕДЕНИЕ

Металлоэндопептидазы (КФ 3.4.24.4.) относятся к одному из самых больших и разнообразных по свойствам классов протеолитических ферментов. Эти ферменты синтезируются различными бактериями и, в том числе, описаны у многих известных патогенов [1–3]. Протеазы могут разрушать структурные компоненты внеклеточного матрикса тканей, расщеплять белки гемостаза, вызывать деструкцию тканей и интоксикацию [4]. Например, в клетках *Klebsiella pneumoniae* описаны две цинкзависимые металлоэндопептидазы YggG и YpfJ [5, 6]. Гомологи YggG и YpfJ были обнаружены в таких бактериях, как *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterobacter* и др. Некоторые штаммы *Enterobacter sakazakii* синтезируют внутриклеточную цинксодержащую металлоэндопептидазу Zpx, вызывающую округление клеток культуры тканей [4]. Бактерии *Serratia grimesii*, описанные ранее как атипичный штамм *Escherichia coli* A2 [7], синтезируют цинксодержащую эндопептидазу гримелизин (ранее протеаза ECP32), относящуюся к семейству термолизиноподобных металлоэндопептидаз [8, 9]. *Ser. proteamaculans* синтезирует металлоэндопептидазу протеализин, представляющую новую группу термолизиноподобных протеаз [10]. Предполагают участие гримелизина и протеализина в инвазии бактерий в клетки эукариот [11, 12].

Сокращение: BLASTP – Basic Local Alignment Search Tool Protein.

* Автор для связи (тел.: +7 (843) 233-78-56; факс: +7 (843) 233-45-68; эл. почта: mardanovaayslu@mail.ru).

Morganella morganii, граммотрицательная бактерия семейства Enterobacteriaceae, является возбудителем оппортунистических и госпитальных инфекций, часто плохо поддающихся лечению из-за устойчивости бактерий к широкому спектру антибиотиков [13, 14].

Настоящая работа посвящена выделению, очистке и характеристике внутриклеточной металлоэндопептидазы *M. morganii*, расщепляющей актин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Используя референтную последовательность гримелизина *Ser. grimesii* A2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/163716943>) и программу BLASTX (поиск белков с использованием транслированной нуклеотидной последовательности), в геноме *M. morganii* subsp. *morganii* КТ, штамма близкородственного *M. morganii* ZM, провели поиск гена, кодирующего термолизиноподобную металлоэндопептидазу. Обнаруженный гипотетический белок состоял из 366 а.о. и относился к семейству M4 нейтральных протеаз суперсемейства глущинкинов. Молекулярная масса белка (с пропептидом) составила 41.7 кДа. Молекулярная масса гримелизина *Ser. grimesii* A2 – 32 кДа [9]. Гипотетическая металлоэндопептидаза *M. morganii* КТ идентична гримелизину *Ser. grimesii* A2 по аминокислотной последовательности на 37%. Низкое сходство белков *M. morganii* КТ и *Ser. grimesii* позволяет предположить, что эндопептидазы различаются по структуре и свойствам. Для поиска эндопеп-

тидаз, имеющих более высокое сходство с гипотетической металлоэндопептидазой *M. morganii*, провели BLASTP-анализ с использованием референтной последовательности YP_007505137.1 (с сервера NCBI). Результаты представлены в таблице.

Гомологи металлоэндопептидазы встречаются в геномах представителей разных родов семейства Enterobacteriaceae (*Serratia*, *Pantoea*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella* и некоторых др.). Однако во всех случаях идентичность аминокислотных последовательностей не превышала 37–39%. Наиболее близкими гомологами являются эластаза *Ser. marcescens* FG194, протеализин *Ser. proteamaculans* 568 и внеклеточная металлоэндопептидаза растительного патогена *Dickeya dadantii* 3937. Протеализин *Ser. proteamaculans* был ранее выделен и детально изучен [10]. Эта эндопептидаза относится к группе термолизиноподобных металлоэндопептидаз с коротким N-сигнальным пептидом.

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков-гомологов с последовательностью металлоэндопептидазы (YP_007505137.1) *M. morganii* КТ (рис. 1) показало, что в последовательности гена *M. morganii* КТ присутствуют вставки, отсутствующие в генах других металлоэндопептидаз. В последовательности гипотетической металлоэндопептидазы имелся консервативный мотив HEXXH, входящий в сайт связывания Zn. Однако состав аминокислот в позиции ХХ у металлоэндопептидазы *M. morganii* КТ отличается. ХХ-аминокислотные остатки представлены фенилаланином (F) и серином (S), в то время как в геномах *Serratia* это – лейцин (L) и аланин (A), а в металлоэндопептидазе *Dickeya dadantii* 3937 – лейцин и серин.

Для подтверждения синтеза металлоэндопептидазы в клетках *M. morganii* исследовали протеолитическую активность этих клеток по расщеплению ряда белковых субстратов – азоказеина, актина и желатина. В клетках 24- и 48-часовых культур обнаружили азоказеинрасщепляющую активность. Протеолитическая активность ингибировалась в присутствии *o*-фенантролина на 70% и не менялась в присутствии фенилметилсульфонилфторида – ингибитора сериновых протеаз. Результаты ингибиторного анализа и активация расщепления азоказеина в присутствии 1 мМ Zn⁺² (на 50–60%) позволяют сделать вывод, что в клеточном экстракте *M. morganii* протеолиз азоказеина обусловлен активностью металлоэндопептидазы. Клеточный экстракт расщеплял скелетно-мышечный актин даже при разведении в 8 раз (рис. 2). Характер расщепления глобулярного актина отличался от гримелизина: протеаза *Ser. grimesii* A2 расщепляла глобулярный актин в единственном сайте между Gly42 и Val43 с образо-

ванием двух фрагментов массой 36 и 8 кДа [15]. Металлоэндопептидаза *M. morganii* ZM расщепляла актин неспецифично (рис. 2).

Организм	Идентичность, %
<i>M. morganii</i> SC01	96
<i>Ser. marcescens</i> FG194	39
<i>Dickeya dadantii</i> 3937	39
<i>Ser. proteamaculans</i> 568	37
<i>Ser. grimesii</i> A2	37
<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	37
<i>Ser. plymuthica</i> 4Rx13	37
<i>Enterobacter</i> sp. SST3	37
<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	37
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047	37
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	37
<i>Salmonella enterica</i>	35
<i>Klebsiella oxytoca</i>	36

Для того чтобы выявить эндопептидазы, ассоциированные с клетками *M. morganii* ZM, использовали метод зимографии с желатином в качестве субстрата [19]. Из зимограммы видно, что клеточный экстракт содержал несколько полипептидов с протеолитической активностью (рис. 3).

Для выделения металлоэндопептидазы из клеточного экстракта использовали сульфатаммонийное фракционирование. Белки клеточного экстракта последовательно осаждали сульфатом аммония при его насыщении 0–20, 20–50 и 50–70%. В полученных фракциях обнаруживали активность с помощью метода зимографии (рис. 4а). Максимальную активность проявляла фракция, соответствующая 20–50% насыщения сульфатом аммония. Эту белковую фракцию после диализа использовали для гидрофобной хроматографии на колонке с фенил-сефарозой. Белок элюировали понижающимся градиентом сульфата аммония (рис. 5). На рис. 4б представлена зимограмма фракции с активностью, чувствительной к *o*-фенантролину. На зимограмме видна одна полоса, соответствующая пептиду с молекулярной массой 35 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе зрелого продукта гипотетической металлоэндопептидазы *M. morganii*.

Таким образом, в клетках бактерий *M. morganii* идентифицировали металлоэндопептидазу, расщепляющую актин. Фермент ингибировался *o*-фенантролином – специфическим ингибито-

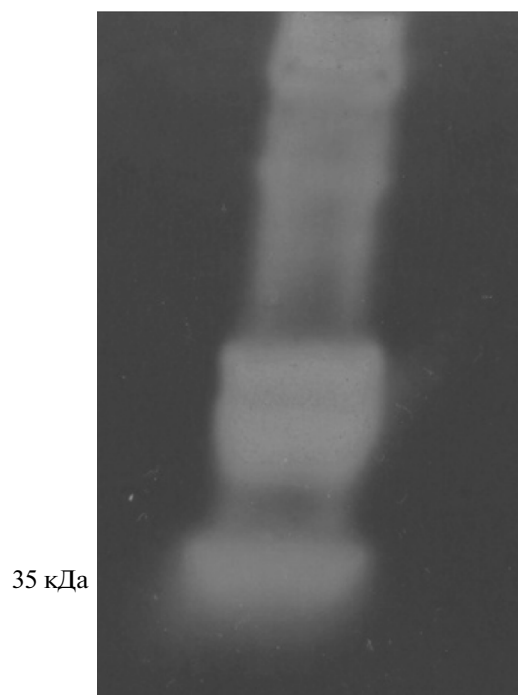


Рис. 3. Зимография клеточного экстракта 48-часовой культуры *M. morganii* ZM.

Бактерии культивировали на среде LB [17] при 37°C на вибростенде при 200 об/мин.

Протеолитическую активность выявляли по расщеплению азоказеина по методу [10]. Время инкубации клеточного экстракта с субстратом составляло 60 минут при температуре 37°C.

Расщепление скелетно-мышечного актина [9] детектировали электрофоретически по методу

Лаэмли [18]. Клеточный экстракт инкубировали с актином в течение 2 ч при комнатной температуре. Зимографию клеточных экстрактов с использованием в качестве субстрата желатина осуществляли по методу [19]. Зимография включала сополимеризацию желатина с полиакриламидным гелем для обнаружения ферментативной активности. После проведения электрофореза SDS удаляли из геля промывкой Тритон X-100, выдерживали в 0.05 М Трис-НСl-буфере, рН 8.2 в течение 12–18 ч при 37°C. Гель окрашивали Кумаси бриллиантовым голубым. В месте, где субстрат был расщеплен ферментом, проявлялись светлые полосы на темном фоне.

Содержание белка определяли по методу Бредфорд [20].

Выделение фермента из клеточного экстракта *M. morganii* ZM проводили с помощью сульфатаммонийного фракционирования и гидрофобной хроматографии на фенол-сефарозе (Pharmacia, США). Клетки из 200 мл 48-часовой культуры осаждали центрифугированием при 13000 g в течение 15 мин. Бактерии отмывали от внеклеточных белков двукратно, ресуспендируя осадок в 0.05 М Трис-НСl-буфере, рН 7.3. Клетки в 15 мл 0.05 М Трис-НСl-буфера, рН 7.3 разрушали ультразвуком. Клеточный лизат центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Полученный супернатант использовали как клеточный экстракт для фракционирования сульфатом аммония с интервалом насыщения 20–70%. Сульфатаммонийные фракции диализовали против 0.05 М Трис-НСl-буфера, рН 7.3 до исчезновения следов сульфата аммония (контроль – 5% раствор BaCl₂) и обнаруживали протеолитическую активность методом зимографии. На колонку с фенол-сефарозой объ-

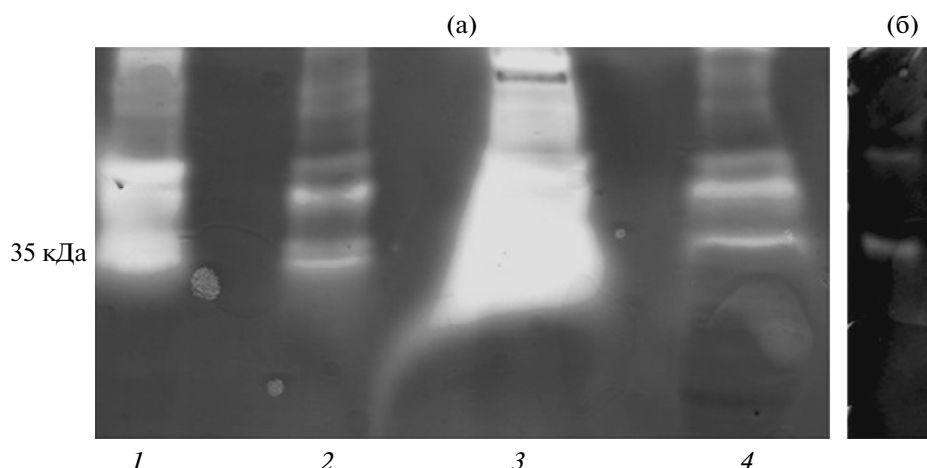


Рис. 4. Зимография белковых фракций клеточного экстракта *M. morganii* ZM при осаждении сульфатом аммония. (а) – исходный экстракт (1), фракции осаждения сульфатом аммония при 0–20 (2), 20–50 (3), 50–70% насыщения (4). (б) – зимография фракции после фенол-сефарозы с протеолитической активностью, чувствительной к *o*-фенантролину.

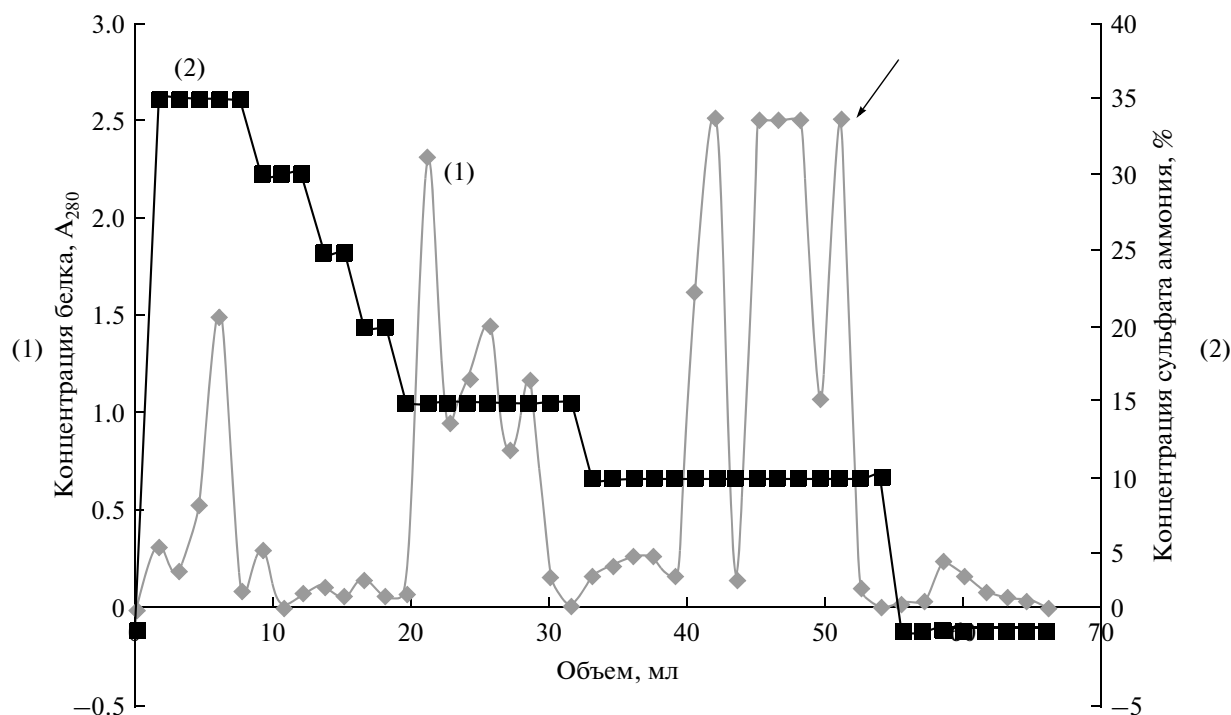


Рис. 5. Хроматография белков *M. morgani* ЗМ на фенил-сефарозе. Фракция, проявляющая протеолитическую активность, чувствительную к *o*-фенантролину, указана стрелкой.

емом 1 мл, уравновешенной 0.05 М Трис-НСI-буфером, pH 7.3, 5 мМ Са²⁺, содержащим 35% сульфат аммония, наносили фракцию с максимальной активностью (20–50% насыщения) в буфере 0.05 М Трис-НСI, pH 7.3, 5 мМ СаCl₂, содержащем 35% сульфат аммония. Элюцию проводили тем же буфером с понижением концентрации сульфата аммония до 10–15%.

Полученные фракции белка диализовали против 0.05 М Трис-НСI-буфера pH 7.3 с 5 мМ СаCl₂.

Для ингибиторного анализа использовали *o*-фенантролин и фенилметилсульфонилфторид (PMSF) (Sigma, США). Клеточный экстракт инкубировали с 5 мМ *o*-фенантролина или 2 мМ PMSF в течение 1 ч при 23°C, после чего определяли остаточную активность по гидролизу актина и азоказеина.

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

Статья подготовлена по материалам доклада на Всероссийской конференции “Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция”, 2014. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурен-

тоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ и Правительством Республики Татарстан (проект № 13-04-97130).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Häse C.C., Finkelstein R.A. // *Microbiol. Rev.* 1993. V. 57. P. 823–837.
2. Stohl E.A., Dale E.M., Criss A.K., Seifert H.S. // *MBio.* 2013. V. 4. pii: e00399–13. doi: 10.1128/mBio.00399–13.
3. Kwon K., Hasseman J., Latham S., Grose C., Do Y., Fleischmann R.D., Pieper R., Peterson S.N. // *BMC Biochem.* 2011. V. 12. doi: 10.1186/1471–2091–12–17.
4. Kothary M.H., McCardell B.A., Frazar C.D., Deer D., Tall B.D. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 4142–4151.
5. Kuan C.S., Wong M.T., Choi S.B., Chang C.C., Yee Y.H., Wahab H.A., Normi Y.M., Too W.C., Few L.L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. P. 4441–4455.
6. Wong M.T., Choi S.B., Kuan C.S., Chua S.L., Chang C.H., Normi Y.M., Too W.C., Wahab H.A., Few L.L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 901–917.
7. Khaitlina S.Yu., Collins J.H., Kuznetsova I.M., Pershina V.P., Synakevich I.G., Turoverov K.K., Usmanova A.M. // *FEBS Lett.* 1991. V. 279. P. 49–51.
8. Matveyev V.V., Usmanova A.M., Morozova A.V., Collins J.H., Khaitlina S.Yu. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1296. P. 55–62.

9. *Bozhokina E., Khaitlina S., Adam T.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 367. P. 888–892.
10. *Demidyuk I.V., Kalashnikov A.E., Gromova T.Y., Gasanov E.V., Safina D.R., Zabolotskaya M.V., Rudenskaya G.N., Kostrov S.V.* // Protein. Expr. Purif. 2006. V. 47. P. 551–561.
11. *Bozhokina E.S., Tsaplina O.A., Efremova T.N., Kever L.V., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Adam T., Komissarchik Y.Y., Khaitlina S.Y.* // Cell. Biol. Int. 2011. V. 35. P. 111–118.
12. *Tsaplina O., Efremova T., Demidyuk I., Khaitlina S.* // FEBS J. 2012. V. 279. P. 264–274.
13. *O'Hara C.M., Brenner F.W., Miller J.M.* // Clin. Microbiol. Rev. 2000. V. 13. P. 534–546.
14. *Chen Y.T., Peng H.L., Shia W.C., Hsu F.R., Ken C.F., Tsao Y.M., Chen C.H., Liu C.E., Hsieh M.F., Chen H.C., Tang C.Y., Ku T.H.* // BMC Genomics. 2012; 13 Suppl 7:S4. doi: 10.1186/1471–2164–13–S7–S4.
15. *Khaitlina S.Y., Moraczewska J., Strzelecka-Gołaszewska H.* // Eur. J. Biochem. 1993. V. 218. P. 911–920.
16. *Edgar R.C.* // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. 1792–1797.
17. *Sambrook J.K., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
18. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
19. *Oliver G.W., Stettler-Stevenson W.G., Kleiner D.E.* Zymography, casein zymography and reverse zymography; activity proteases and their inhibitors. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. San Diego: Acad. Press, 1999.
20. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

New Metalloendopeptidase of *Morganella morganii* ZM

N. M. Zamaliutdinova, L. F. Minnullina, M. R. Sharipova, A. M. Mardanova #

#Phone: +7 (843) 233-78-56; fax: +7 (843) 233-45-68; e-mail: mardanovaayslu@mail.ru

Kazan (Volga region) Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia

Proteolytic activity which is inhibited in the presence of o-phenanthroline was found in *M. morganii* ZM. Intracellular proteases of *M. morganii* ZM unlimited split musculoskeletal actin in contrast to grimeysin. Several proteolytic proteins of *M. morganii* ZM cells were identified by zymography with gelatin. Metalloproteinase of *M. morganii* ZM cell lysate was purified by hydrophobic chromatography fractionation. The molecular weight of the protein was 35 kDa.

Keywords: metalloendopeptidase, Morganella morganii, BLASTP, sequence alignment