

ВЫЯВЛЕНИЕ АКТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЛИЗИНА,
МЕТАЛЛОПРОТЕАЗЫ СЕМЕЙСТВА M4

Работа посвящена изучению ферментативных и функциональных свойств металлопротеиназ бактерий в связи с возможным участием этих протеиназ в бактериальной инвазии. Ранее в отделе клеточных культур Института цитологии РАН обнаружили, выделили и охарактеризовали бактериальную протеазу ECP 32, ограниченно расщепляющую актин в одном сайте, интенсивно вовлеченном в образование межмономерных контактов в полимере [1]. Способность бактерий синтезировать протеазу ECP 32 коррелирует со способностью этих бактерий проникать в эукариотические клетки, вызывая реорганизацию их цитоскелета. Такая же корреляция была обнаружена в мутантах дизентерийных бактерий *Shigella flexneri*, полученных с помощью фуразолидона [2], в бактериях пациентов, длительно принимавших фуразолидон, и в бактериях *Serratia grimesii*, синтезирующих ECP 32-подобную металлопротеиназу гримелизин [3]. В свою очередь, последовательность гена гримелизина оказалась сходной с последовательностью гена протеализина, выделенного из *Serratia proteamaculans*. В структуре протеализина выявлены каталитический и субстрат-связывающий сайты, характерные для термолизиноподобных металлопротеиназ семейства MEROPS M4 [4]. Однако субстратная специфичность протеализина по отношению к нативным белкам ранее не проверялась. Задача настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить, обладает ли протеализин актиназной активностью, т.е. способен ли он ограниченно расщеплять актин, и сопоставить эти данные со способностью к инвазии в эукариотические клетки бактерий-продуцентов протеализина.

С этой целью в работе исследованы очищенный протеализин, дикий штамм *S. proteamaculans* и полученные в Лаборатории белковой инженерии Института молекулярной генетики РАН бактерии рекомбинантных штаммов *E.coli*, экспрессирующие протеализин (pSP1.8 с вектором pUC19, содержащим 3,3 кб полностью секвенированный фрагмент геномной ДНК *S. proteamaculans* [4], и pPLN-6HisC с вектором на основе pET23b, содержащим только кодирующую часть гена протеализина, находящуюся под управлением промотора фага T7), а также неактивный мутант (pPLN-6HisC-A, который является производной pPLN-6HisC, отличающейся точечной заменой глутаминовой кислоты на аланин в сайте связывания цинка HELAH). В качестве контроля использовался штамм *E.coli* с вектором, не несущим ген протеализина.

В молекуле актина протеаза гримелизин расщепляет только одну полипептидную связь между Gly 42 и Val 43, в результате чего образуются два не подвергающихся дальнейшему протеолизу фрагмента с молекулярной массой 36 и 5 кДа [1]. Протеализин при весовом отношении к актину порядка 1:100 расщепляет актин с образованием фрагмента с молекулярной массой 36 кДа. При увеличении концентрации протеализина в десять раз (весовое соотношение протеализина к актину 1:10) образовавшийся 36 кДа фрагмент расщепляется далее с образованием еще как минимум двух фрагментов. С увеличением времени инкубации видно, что фрагмент 33 кДа образуется в результате расщепления 36 кДа фрагмента. Протеализин относится к семейству металлопротеаз M4 (MEROPS), типичным представителем которого является термолизин. Сравнение протеолиза актина протеализином и термолизином показывает, что при тех же условиях термолизин расщепляет актин неограниченно.

Ранее было показано, что гримелизин появляется на поздней стационарной фазе роста бактериальной культуры. Поэтому были построены кривые роста и выявлен момент появления способности расщеплять актин с образованием фрагмента с молекулярным весом

36кДа у штамма *S. proteamaculans* (после 48 часов роста), pSP1.8 (после 30 часов роста на поздней стационарной фазе роста), pPLN-6HisC (уже после 6,5 часов роста), pPLN-6HisC-A (наблюдается слабая активность после 30 часов роста).

Таким образом, в определенных условиях и очищенный протеализин, и лизаты бактерий, синтезирующих протеализин, расщепляют актин ограниченно. При высоком соотношении фермент-субстрат протеолиз актина протеализином неограничен. Для того чтобы выяснить, способны ли к инвазии в эукариотические клетки бактерии, экспрессирующие активный протеализин, была оценена способность к инвазии рекомбинантного штамма *E.coli*, содержащей ген протеализина. По предварительным результатам, полученным с помощью конфокальной микроскопии, бактерии рекомбинантного штамма *E.coli*, экспрессирующие протеализин, проникали в цитоплазму клеток. Бактерии контрольного штамма *E.coli* с плазмидой, не содержащей ген протеализина, в клетки не проникали.

В дальнейшем будет проверено с помощью конфокальной микроскопии, способны ли к инвазии в эукариотические клетки бактерии, экспрессирующие неактивный мутант протеализина. Планируется также провести электронно-микроскопический анализ препаратов, полученных при инкубации клеток Нер-2 с бактериями рекомбинантных штаммов, экспрессирующих активный и неактивный протеализин.

Некоторые бактерии секретируют протеазы, которые становятся вирулентными факторами, активируя или ингибируя матричные металлопротеиназы [5]. Используя зимографию с желатином, мы показали чувствительность матричной металлопротеазы MMP2 к протеализину. С другой стороны, бактериальные факторы могут взаимодействовать непосредственно с белками клеточной поверхности и цитоскелета [6]. Металлопротеазы семейства М4 расщепляют множество различных белков, в том числе белки внеклеточного матрикса [4]. Поэтому будет проверена чувствительность неденатурированного коллагена, фибронектина, ламинина и комплекса белков внеклеточного матрикса к гримелизину и протеализину.

Работа поддержана грантом РФФИ 05-04-49604.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Khaitlina S.Yu., Collins J.H., Kusnetsova I.M., Pershina V.P., Synakevich I., Turoverov K.K., Usmanova A.M. FEBS Lett. – 1991. - V.279.- P.49-51
2. Ефремова Т.Н., Груздева И.Г., Матвеев И.В., Божокина Е.С., Комиссарчик Я.Ю., Федорова З.Ф., Хайтлина С.Ю. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – том 137, № 5. – с. 546-550.
3. Божокина Е. С., С. Ю.Хайтлина и Т. Адам. Цитология – 2007. – том 49, №10. – с. 718.
4. Demidyuk I.V., Kalashnikov A.E., Gromova T.Yu., Gasanov E.V. , SaWna D.R., Zabolotskaya M.V., Rudenskaya G.N., Kostrov S.V. Protein Expression and Purification. – 2006. Vol. 47. – P. 551–561.
5. Okamoto T., Akuta T., Tamura F., Albert van der Vliet and Akaike T. Biol. Chem.-2004.- Vol. 385. - P. 997–1006.
6. Cossart P., Sansonetti P.J. Science. – 2004. – V.304. – P. 242-248.