



УДК 577.152.34'152

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ© 2001 г. А. В. Серкина[#], А. Б. Шевелев, Г. Г. ЧестухинаИнститут генетики и селекции промышленных микроорганизмов "ГосНИИгенетика",
113545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

Поступила в редакцию 01.11.2000 г. Принята к печати 15.03.2001 г.

Обобщены сведения о предшественниках бактериальных протеиназ. Обсуждены структура и особенности процессинга предшественников субтилизинов бацилл, α -литической протеиназы *Lysobacter enzymogenes* и родственных ей химотрипсиноподобных протеиназ *Streptomyces griseus*, а также металлопротеиназ бацилл и *Pseudomonas aeruginosa*. Особое внимание уделено анализу подходов к получению предшественников и пропептидов протеиназ, а также методов их изучения *in vitro*.

В качестве возможных физиологических функций пропептидов в составе предшественников протеиназ рассмотрены: (а) ингибирование протеиназ с целью предохранения клеток хозяина от протеолитического повреждения; (б) участие в фолдинге зрелого фермента; (в) обеспечение взаимодействия протеиназ с регуляторными механизмами бактериальной клетки, в том числе, участие в транслокации фермента через клеточную стенку.

Ключевые слова: профермент; пропептид; фолдинг; секреция; ингибирование; процессинг.

ВВЕДЕНИЕ

Большинство охарактеризованных к настоящему времени протеиназ из различных источников первоначально синтезируются в виде лишенных активности предшественников – проферментов, в молекулах которых за секреторным лидером (пропептидом) следует активационный пептид (пропептид). Известно, что процессинг предшественников, приводящий к появлению протеолитической активности у зрелого белка, сопровождается отщеплением и деградацией соответствующих пропептидов.

К настоящему времени известно, что пропептиды обеспечивают транспорт белка через плазматическую мембрану [1]. Что касается пропептидов, то их роль до конца не установлена и активно обсуждается [2–4]. Предполагается, что пропептиды не только выполняют функцию поддержания фермента в неактивном состоянии, но и, направляя свертывание белковой глобулы, могут принимать участие в формировании функциональной третичной структуры белка. Кроме того,

они могут обеспечивать передачу сигналов для своевременной активации протеиназ *in vivo*.

Изучение предшественников, их функциональной роли и роли их пропептидов требует в первую очередь наличия надежных способов получения проферментов, что в случае предшественников бактериальных протеиназ представляет сложную методическую задачу, которая до сих пор не имеет универсального решения. Основная проблема состоит в том, что предшественники бактериальных секреторных протеиназ, в отличие от предшественников пищеварительных ферментов млекопитающих, по своей природе не рассчитаны на длительное существование и при секреции быстро процессируются с образованием зрелого активного фермента. Поэтому в обзоре рассматриваются как методические приемы получения предшественников бактериальных протеиназ в препаративных количествах, так и косвенные методы, позволяющие моделировать структуру и функционирование предшественников *in vitro* и *in vivo*, в частности, распространенный прием изучения реассоциированных нековалентных комплексов пропептид–зрелый фермент. При этом мы стремились оценивать степень соответствия эффектов, наблюдаемых в условиях *in vitro*, природным феноменам, имеющим место в ходе синтеза, транспорта и процессинга предшественников в живых организмах.

Сокращения: PCA – рентгеноструктурный анализ; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; Spr – термолизиноподобная нейтральная протеиназа *Bacillus cereus*; S-SI – ингибитор субтилизина из стрептомицета; TLN – термолизин; pNA – *p*-нитроанилидная группа; SGPA–SGPE – протеиназы А–Е из *Streptomyces griseus*; Suc – сукцинил.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 315-37-38; факс: (095) 315-05-01; эл. почта: serkina@rocketmail.com).

1. ПРЕДШЕСТВЕННИКИ СУБТИЛИЗИНОПОДОБНЫХ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ БАЦИЛЛ

1.1. Структура генов предшественников бациллярных просубтилизинов

К настоящему времени известно более 50 представителей семейства субтилизиноподобных сериновых протеиназ (клан SB, семейство S8 по классификации [5]), обнаруженных не только у бактерий (грамположительных и грамотрицательных), грибов и дрожжей, но и у высших эукариот [6]. К наиболее изученным протеиназам этого семейства относятся субтилизины, секретируемые мезофильными видами бацилл: субтилизин E *Bacillus subtilis* [7, 8], субтилизин BPN' *B. amyloliquefaciens* [9, 10], субтилизин Carlsberg *B. licheniformis* [11,12]. Эти субтилизины благодаря имеющимся данным об их трехмерной структуре и о нуклеотидной последовательности соответствующих структурных генов часто используются как модельные системы для белковой инженерии [13].

Анализ нуклеотидной последовательности гена, кодирующего субтилизин E *B. subtilis* [7, 14], показал, что первоначально белок синтезируется в виде предшественника (препрофермента) и содержит сигнальный пептид (препептид), состоящий из 29 а. о. и необходимый для секреции белка через цитоплазматическую мембрану, препептид, включающий 77 а. о. и отщепляемый в результате процессинга профермента, и собственно зрелый субтилизин, состоящий из 275 а. о., обнаруживаемый в культуральной жидкости *B. subtilis*. Наличие препептида между последовательностями сигнального пептида и зрелого фермента характерно и для субтилизинов из других источников, причем длина этих фрагментов различна для разных белков.

Следует отметить, что прямыми экспериментальными методами определить N-концевой остаток препептида не представляется возможным по причине недоступности профермента из природного хозяина. Поэтому граница между пре- и препептидами определяется на основании теоретических предсказаний, базирующихся на анализе последовательностей бактериальных препеп-

тидов в целом [15]. При этом установлено, что район отщепления препептида в молекулах субтилизинов E, Carlsberg и BPN' представляет собой сайт Ser-Ala-(Gln/Ser)-Ala-Ala [7, 14]. Этот вывод согласуется с экспериментами по синтезу препросубтилизина в системе транскрипции-трансляции *in vitro* с последующим его процессингом сигнальной пептидазой [14].

Все зрелые субтилизиноподобные протеиназы, особенно бациллярные, имеют достаточно высокую степень структурного сходства. Так, для субтилизинов BPN' и Carlsberg количество остатков, совпадающих с остатками полипептидной цепи субтилизина E, составляет 87 и 72% соответственно, а между собой субтилизины BPN' и Carlsberg подобны по первичной структуре на 76% [16].

Структура препептидов субтилизинов существенно менее консервативна, чем структура соответствующих зрелых ферментов, хотя и для них выявлено наличие консервативной области в C-концевой части, а также общей последовательности Tyr-Ile-Val-Gly-Phe-Lys в N-концевой части (рис. 1), которые, по мнению авторов работы [17], могут играть важную роль в формировании структуры активного субтилизина.

1.2. Методы получения и очистки предшественников и препептидов субтилизинов

Зафиксировать *in vivo* в природных штаммах *B. subtilis* и других грамположительных бактерий какую-либо из форм первоначального продукта трансляции гена, кодирующего препросубтилизин E, не представляется возможным [18], поскольку при секреции предшественник быстро процессируется и появляется в культуральной жидкости уже в виде зрелого фермента.

In vitro нативный просубтилизин также подвергается немедленному аутопроцессингу, что не позволяет зафиксировать его и в искусственных системах. Просубтилизин E может быть получен с помощью гетерологичной экспрессии в *E. coli* под контролем T7-промотора в составе тел включения, которые представляют собой денатурированную форму фермента [17]. Ренатурация пред-

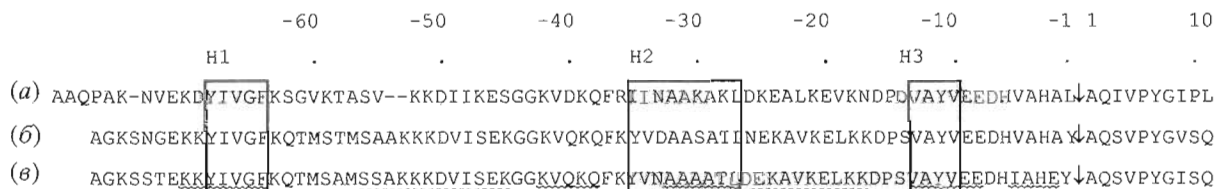


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей препептидов субтилизинов Carlsberg (а), BPN' (б) и E (в) (по данным работы [39]). H1, H2, H3 – гидрофобные области (взяты в рамки); стрелкой показан сайт отщепления препептида; волнистой линией подчеркнуты остатки, образующие β-структуру, пунктиром – α-спирали.

шественника, полученного в виде тел включения, хорошо отработана [19], однако удаление денатурирующего агента неизбежно сопровождается активацией предшественника с образованием зрелого фермента [20]. Этот процесс не удается заблокировать ни добавлением ингибиторов, ни изменением рН среды, ни какими-либо другими способами [19, 20].

Удобным подходом к получению непроецессированных просубтилизинов стало конструирование их неактивных мутантов, содержащих замены остатков каталитического центра: Asp32 [17], His64 [21], Ser221 [22–24]. Для некоторых вариантов модифицированных таким образом просубтилизинов удалось определить пространственную структуру методом РСА [23, 25, 26]. Однако при рассмотрении данных, полученных на таких мутантах, необходимо учитывать возможность для них структурных искажений, вызванных нарушением внутримолекулярных взаимодействий, характерных для нативного просубтилизина.

В отличие от белков-предшественников отдельно экспрессированные пропептиды бациллярных субтилизинов легко могут быть получены в растворимой форме. Для этого специально сконструированные гены, кодирующие пропептиды субтилизина E [4, 27] и субтилизина BPN' [23], экспрессировали в *E. coli*, после чего выделяли пропептиды из растворимой клеточной фракции или получали их путем ренатурации из тел включения.

1.3. Процессинг предшественников субтилизинов и его возможные механизмы

В природном штамме *B. subtilis* процесс активации (процессинг) предшественника субтилизина E, сопровождающийся разрывом ковалентной связи Tyr-Ala в проферменте и отщеплением пропептида, происходит настолько быстро, что единственной формой фермента, которую удается обнаружить, является активный субтилизин [18]. При экспрессии гена субтилизина BPN' в штамме *B. subtilis*, не содержащем собственных хромосомных генов щелочной и нейтральной протеиназы, в культуральной жидкости также был обнаружен только зрелый фермент [28].

Для того чтобы проверить роль остатков каталитической триады субтилизина в процессе активации профермента, полноразмерный ген субтилизина E дикого типа в составе экспрессионного вектора был введен в клетки *E. coli* [17]. При этом наблюдалась частичная активация предшественника, и зрелый активный субтилизин обнаруживался в периплазматическом пространстве. Напротив, при попытке получения в аналогичной системе мутантного субтилизина (Asp32Asn) не было обнаружено продукции активного фермента, а

предшественник накапливался в клетках в нерастворимой форме [17].

При ренатурации из тел включения дикого просубтилизина E приблизительно 20% просубтилизина активировались до зрелого фермента [19, 20], в то время как мутанты просубтилизина по каталитически активным остаткам (Asp32Asn) [20] и (Ser221Ala) [24], также полученные в *E. coli* в виде тел включения, не проявляли способности к аутоактивации в условиях ренатурации.

Возможность инициации этого процесса следовыми количествами зрелого субтилизина, имеющимися в препарате очищенного предшественника, в данной системе *in vitro* исключается по следующим причинам [20]:

- во-первых, зрелый субтилизин денатурирует при обработке его гуанидингидрохлоридом и не может быть ренатурирован в тех условиях, которые успешно используются для ренатурации просубтилизина;

- во-вторых, специфические ингибиторы субтилизина – PMSF и S-SI не могут блокировать аутопроцессинг предшественника, хотя ингибируют зрелый фермент;

- в-третьих, межмолекулярная активация мутантного просубтилизина Asp32Asn не происходит даже в присутствии зрелого субтилизина или интактного просубтилизина, способного процессироваться с образованием активного субтилизина.

На основании полученных данных авторы работы [20] предположили, что процессинг профермента, требующий протеолитического удаления N-концевого пропептида, представляет собой аутокаталитический внутримолекулярный процесс.

Интересный результат был обнаружен при замене в просубтилизине E остатка Ser221 на Cys [24]. Мутантный ген протиолсубтилизина был экспрессирован в *E. coli* и его продукт очищен до гомогенного состояния в денатурирующих условиях. При ренатурации *in vitro* протиолсубтилизин аутопроцессировался с эффективностью 60–80% по сравнению с просубтилизином E дикого типа, образуя интактный зрелый фермент и пропептид, которые сохранялись в виде стабильного нековалентного комплекса. Появление подобного комплекса, сопровождающее процессинг просубтилизина E дикого типа, практически невозможно зафиксировать, поскольку пропептид субтилизина E немедленно деградирует [4]. Деградации пропептида, образующегося при процессинге мутантного профермента, не происходит, так как тиолсубтилизин обладает сниженной на несколько порядков по сравнению с субтилизином пептидазной активностью [29].

Мономолекулярный характер аутопроцессинга просубтилизина был подтвержден на модели протиолсубтилизина (Ser221Cys), несущего на N-конце полипептид, состоящий из 10 остатков His [30].

Модифицированный протиолсубтилизин, полученный в *E. coli* в виде тел включения и иммобилизованный в денатурирующих условиях на Ni^{2+} -содержащей смоле в концентрации, исключающей межмолекулярное взаимодействие, на 70–75% подвергался аутопроцессингу в ходе ренатурации.

При экспрессии полноразмерного мутантного гена субтилизина BPN' (Ser221Cys) в штамме *B. subtilis* [22] с нарушенной собственной протеолитической активностью правильно процессированный зрелый тиолсубтилизин был обнаружен в секреторной форме, что еще раз доказывает аутокаталитический механизм процессинга просубтилизина *in vivo*.

Участие каталитической триады субтилизина в процессинге предшественника подтверждено также невозможностью активации просубтилизина *in vivo* и *in vitro* при замене остатка His64 активного центра субтилизина E на Ala [21]. Согласно предложенному авторами механизму, сайт процессинга просубтилизина располагается в активном центре фермента, подобно синтетическому пептидному субстрату Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA, так что остаток P2* в пептидном субстрате соответствует остатку Glu(-2) в пропептиде. Оказалось, что мутантный субтилизин His64Ala неактивен по отношению к указанному субстрату Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA, но расщепляет его аналог Suc-Phe-Ala-His-Phe-pNA, который содержит His в положении P2. Было высказано предположение, что оба атома азота остатка His субстрата могут быть наложены на соответствующие атомы каталитически активного His64, как бы заменяя его в мутантном субтилизине His64Ala, и делая его протеолитически активным [31].

Справедливость предложенной модели была подтверждена при замене Glu(-2) в пропептиде на His у мутантного (His64Ala) субтилизина E. Оказалось, что замена Glu(-2)His в пропептиде супрессирует мутацию в активном центре, так как двойной мутант просубтилизина, очищенный и ренатурированный из тел включения, полученных в *E. coli*, в отличие от мутанта с единственной заменой (His64Ala), способен аутопроцессироваться с образованием комплекса пропептид-зрелый фермент.

Реакция аутопроцессинга просубтилизина чувствительна и к природе аминокислотного остатка, находящегося в положении (-1) пропептида. В случае субтилизинов E и BPN' это остаток Tug.

* Согласно принятой номенклатуре [5], аминокислотные остатки субстрата обозначают как $P_n, \dots, P_2, P_1, P_1', P_2', \dots, P_n'$, где $P_1 - P_1'$ соответствует расщепляемой пептидной связи. Соответствующие этим остаткам участки зоны связывания субстрата в ферменте обозначают $S_n, \dots, S_2, S_1, S_1', S_2', \dots, S_n'$.

При замене Tug(-1) на Gly в протиолсубтилизине аутопроцессинг блокируется, и пропептид остается ковалентно связанным со зрелым ферментом [26].

Таким образом, очевидно, что процесс активации просубтилизина, сопровождающийся протеолитическим отщеплением пропептида, требует наличия каталитически активных остатков зрелого фермента и происходит аутокаталитически за счет взаимодействия пропептида со зрелой частью профермента. Кроме того, просматривается корреляция между способностью мутантных вариантов субтилизина к самоактивации *in vitro* (если таковая имеется) и возможностью их получения в секреторной форме в бациллах. Так, мутанты просубтилизинов E и BPN' по активному центру, не способные к аутопроцессингу, не были обнаружены в культуральной жидкости ни в одном из экспериментов по экспрессии в *B. subtilis* [23, 28]. В то же время мутант Ser221Cys, характеризующийся пониженной способностью к аутопроцессингу, удалось получить в культуральной жидкости *B. subtilis* в виде правильно процессированного зрелого фермента, однако его выход в 50 раз уступал выходу фермента дикого типа [22].

1.4. Взаимодействие пропептидов со зрелыми ферментами

Как уже отмечалось выше, субтилизин секретируется в культуральную жидкость бацилл в виде активного зрелого фермента, в то же время пропептид, образующийся при процессинге просубтилизина до зрелой формы, невозможно обнаружить ни в культуральной жидкости, ни в мембраносвязанной фракции.

In vitro показано [4], что пропептид является субстратом субтилизина и подвергается гидролизу в присутствии зрелого фермента, причем субтилизин E расщепляет свой собственный пропептид гораздо быстрее, чем пропептид субтилизина BPN', а также бычий сывороточный альбумин.

BPN'-пропептид гидролизуется собственным зрелым ферментом через специфические промежуточные состояния, при этом основной сайт расщепления представляет собой связь Glu(-25)-Lys(-24), а два минорных - Thr(-61)-Met(-60) и Met(-57)-Ser(-56). Замена Glu(-25) в основном сайте на менее предпочтительный для субтилизина остаток Asp делает пропептид более устойчивым к расщеплению [32].

Поведение субтилизина при действии на специфический пептидный субстрат Suc-Ala-Ala-Phe-pNA в присутствии рекомбинантного пропептида [27] свидетельствует о том, что пропептид является высокоаффинным (slow tight binding) ингибитором субтилизина [33]. Поскольку пропептид служит также субстратом для субтилизина, точное определение константы ингибирования

(K_i) требует тщательного подбора отношения концентраций ингибитора (пропептида) к ферменту так, чтобы, с одной стороны, оно было достаточно высоким для предотвращения расщепления пропептида и поддержания его постоянной концентрации, а с другой стороны, достаточно низким для измерения скорости реакции в условиях равновесия. С учетом вышеуказанных требований были определены значения K_i для ингибирования пропептидом субтилизина E субтилизинов BPN' и Carlsberg, которые составляют 1.40 и 1.02 нМ, соответственно [27], а также K_i для ингибирования пропептидом BPN' собственного зрелого фермента и субтилизина Carlsberg – 0.41 и 0.14 нМ, соответственно [4].

Для специфического взаимодействия пропептида со зрелым субтилизином существенны остатки, локализованные по всей длине пропептида. Действительно, полноразмерный синтетический пропептид, соответствующий природному, и состоящий из 77 а. о., функционирует как специфический конкурентный ингибитор зрелого субтилизина E, в то время как укороченные синтетические пропептиды [(-44)-(-77)], [(-1)-(-43)] и [(-1)-(-64)], состоящие из 34, 43 и 64-х а. о., соответственно, теряют эту способность [34].

Отсутствие вторичной и тем более третичной структуры у изолированных пропептидов субтилизинов E и BPN' показано спектральными методами [35]. Однако некоторые аминокислотные замены в пропептиде субтилизина BPN' (Ala(-31)Phe, Gly(-65)Ile, Val(-13)Ile), направленные на увеличение его гидрофобности, изменяют свойства пропептида таким образом, что он становится способным образовывать третичную структуру в свободном состоянии, приобретая устойчивость к протеолитическому расщеплению зрелым ферментом [32].

Еще один пример взаимодействия между пропептидом и зрелым ферментом в составе предшественника – способность мутантного просубтилизина E Ser(221)Ala формировать димеры, что нехарактерно ни для зрелого субтилизина, ни для его пропептида в изолированном состоянии [4]. Не исключено, что способность к димеризации является общим свойством предшественников секреторных протеиназ грамположительных бактерий, так как димеры были обнаружены и при исследовании в физиологических условиях предшественника неродственной субтилизину металлопротеиназы *B. brevis* [36].

Взаимодействия пропептида с соответствующим зрелым ферментом были подробно изучены в комплексе пропептид–тиолсубтилизин (Ser221Cys) [24]. Комплекс обладает ярко выраженной вторичной и третичной структурой [21], а его гидродинамический объем, согласно результатам эксклюзионной хроматографии, хорошо согласуется

с молекулярной массой комплекса пропептид–зрелый фермент, что свидетельствует о его компактности [21, 24]. Оказалось, что температурная стабильность комплекса несколько ниже, чем стабильность зрелого субтилизина [21]. Кроме того, разделение пропептида и тиолсубтилизина методом ионообменной хроматографии приводит к дестабилизации зрелого фермента и нарушению его структуры [24]. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что протеолитическое расщепление пропептида, сопутствующее процессингу природного просубтилизина и невозможное в случае протиолсубтилизина, – неотъемлемая часть процесса активации субтилизина, необходимая для завершения структурообразования нативного фермента. В комплексе пропептид–тиолсубтилизин зрелый фермент, вероятно, еще не обладает пространственной структурой, характерной для нативного субтилизина, что и приводит к дестабилизации тиолсубтилизина при разрушении комплекса.

В 1998 г. впервые методом РСА с разрешением 2.0 Å была определена структура аутопроцессированного комплекса пропептид–тиолсубтилизин [26]. Согласно этим данным, ядро субтилизинового домена образует $\alpha\beta\alpha$ -структура, а пропептид представляет собой компактный домен, состоящий из четырехслойной (Glu(-8)–Val(-13), Leu(-27)–Ala(-32), Gln(-38)–Lys(-42), Phe(-64)–Lys(-70)) антипараллельной β -структуры и двух α -спиралей (Lys(-17)–Asp(-26), Glu(-46)–Ser(-56)). Кроме того, дополнительный β -слой (Glu(-2)–Phe(-5)) взаимодействует с β -слоем субтилизинового домена, находящегося по соседству с активным центром, формируя антипараллельную β -структуру. Две почти параллельные α -спирали (Tyr104–Asn117 и Ser132–Ser145), расположенные на поверхности субтилизинового домена, образуют сайт взаимодействия с пропептидом. C-Концевые остатки пропептида (Tyr(-1)–Asp(-7)) связываются, подобно субстрату, в щели активного центра субтилизина так, что остатки Tyr(-1), Glu(-2), His(-3), Ala(-4) занимают соответственно сайты S1–S4. Обнаружено 26 водородных связей между пропептидным и субтилизиновым доменами. В частности, Tyr(-1) образует пять водородных связей с остатками Asn155, Cys221, His64, Ser125 и Gly128, что отчасти объясняет, почему аминокислотный остаток в положении (-1) пропептида настолько важен для аутопроцессинга просубтилизина.

Третичная структура комплекса пропептид–тиолсубтилизин оказалась практически идентичной структуре комплекса, полученного при добавлении отдельно синтезированного пропептида субтилизина BPN' к зрелому ферменту, содержащему замену Ser221Ala, делецию Ca^{2+} -связывающей петли и ряд дополнительных мутаций, стабилизирующих фермент [23]. На основании изложенного можно заключить, что взаимодействие про-

пептида со зрелым субтилизиним действительно индуцирует процесс структурной перестройки в пропептиде.

1.5. Пропептид как внутримолекулярный шаперон для белкового фолдинга

Важная роль пропептида в образовании энзимически активного субтилизина *in vivo* впервые была показана в работе [17]. Когда полноразмерный ген, кодирующий препросубтилизин E, вводили в клетки *E. coli*, наблюдалась секреция активного зрелого субтилизина в периплазматическое пространство. Когда же сигнальный пептид был непосредственно соединен с последовательностью зрелого фермента, в клетках не было обнаружено протеолитической активности, а продукт, соответствующий зрелому субтилизину по молекулярной массе и N-концевой последовательности, накапливался в периплазматическом пространстве в нерастворимой форме, составляя до 10% общего клеточного белка. Аналогичный результат был получен и при экспрессии гена препросубтилизина, в котором сигнальный пептид присоединен к остаткам (-63) или (-33) пропептида [17]. Эти результаты свидетельствуют о том, что пространственная структура субтилизина, полученного в *E. coli* в отсутствие полноразмерного пропептида, не соответствует нативной структуре активного субтилизина. На основании полученных данных было сделано предположение, что пропептид необходим *in vivo* для фолдинга, т.е. для формирования функциональной третичной структуры белка, причем практически вся последовательность пропептида важна для осуществления этой функции.

Как известно, многие белки, будучи денатурированы, спонтанно ренатурируют при удалении денатурирующих агентов, возвращаясь к первоначальной конформации [37]. Денатурированный зрелый субтилизин лишен способности к спонтанной ренатурации, однако в работе [38] было показано, что ренатурация происходит *in vitro* с эффективностью до 20% в присутствии мутантного просубтилизина (Asp32Asn), неспособного к аутопроцессингу. Полученные результаты служат косвенным указанием на то, что подобная ренатурация стимулируется межмолекулярными взаимодействиями денатурированного субтилизина с пропептидом в составе профермента.

Еще одно доказательство тому, что пропептид способствует фолдингу субтилизина *in vitro*, было получено в работе [34], где показано, что синтетический 77-членный пропептид, соответствующий природному, помогает ренатурации субтилизина E с эффективностью 12%, в то время как синтетический 64-членный пропептид [(-1)-(-64)] не способствует фолдингу. Последний результат хо-

рошо согласуется с данными, полученными *in vivo* в *E. coli*.

При ренатурации *in vitro* просубтилизин E в отличие от зрелого фермента сворачивается и эффективно процессируется с образованием зрелого активного субтилизина [19, 20]. Вероятно, подобный процесс происходит и *in vivo* – после завершения фолдинга просубтилизина пропептид отщепляется в результате аутопроцессинга с образованием функционально активного фермента.

Таким образом, пропептид как ковалентно связанный (в составе предшественника), так и не связанный со зрелым ферментом, способствует фолдингу субтилизина с образованием функционально активной конформации. В этом плане пропептид имеет сходство с клеточными белками-шаперонами, поэтому в литературе его часто называют внутримолекулярным шапероном [35], так как до момента активации пропептид ковалентно связан со зрелым ферментом и способствует фолдингу единственной молекулы субтилизина. Однако существуют значительные различия между этими двумя понятиями. В частности, пропептид, характеризующийся высокой специфичностью по отношению к единственному субстрату – зрелому ферменту, непосредственно катализирует фолдинг, в то время как молекулярные шапероны, обладающие широкой субстратной специфичностью, блокируют процессы, обратные фолдингу, – агрегацию и другие межмолекулярные взаимодействия [2].

Для того чтобы проанализировать функциональную роль пропептида в фолдинге просубтилизина и выяснить, какие именно остатки принимают участие в специфическом взаимодействии между пропептидом и зрелым ферментом, было изучено 26 мутантных форм в области пропептида просубтилизина, полученных методом случайного мутагенеза и отобранных на основании их пониженной способности продуцировать активный субтилизин *in vivo* [39]. Оказалось, что 12 из 26 мутаций (46%) были локализованы внутри гидрофобных областей пропептида. Для дальнейшего анализа *in vitro* было отобрано шесть мутантных пропептидов, несущих следующие замены: Ile(-67)Val, Ile(-48)Thr, Gly(-44)Asp, Lys(-36)Glu, Ala(-30)Thr, Pro(-15)Leu [27]. Установлено, что очищенные до гомогенного состояния мутантные пропептиды с заменами Ala(-30)Thr, Lys(-36)Glu и Pro(-15)Leu, несмотря на их критичность, еще функционируют как шапероны, способствуя *in vitro* фолдингу денатурированного субтилизина BPN' с эффективностью 80, 60 и 54%, соответственно, по сравнению с интактным пропептидом. Напротив, эффективность фолдинга субтилизина BPN' в присутствии пропептидов с мутациями Ile(-67)Val и Gly(-44)Asp составляла 18 и 13%, а пропептид с заменой Ile(-48)Thr и укороченный пропептид, со-

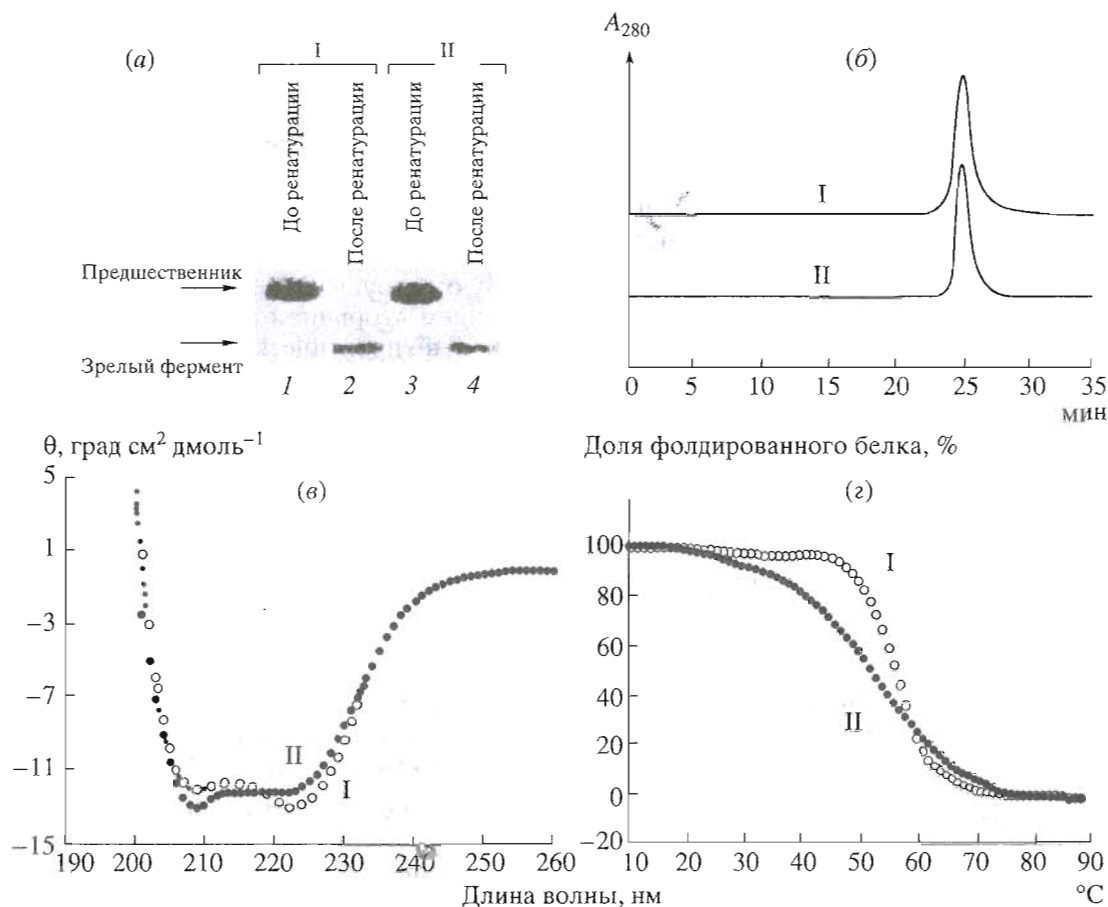


Рис. 2. Свойства конформеров субтилизина E, полученных аутопроцессингом интактного просубтилизина (I) и его мутантного варианта с заменой Ile(-48)Val (II) (по данным работы [3]). (a) SDS-электрофорез в 17.5% ПААГ: дорожки 1, 2 – интактный просубтилизин E дикого типа; 3, 4 – мутантный просубтилизин E Ile(-48)Val; (б) аналитическая гель-фильтрация в режиме HPLC; (в) спектры кругового дихроизма; (г) тепловая денатурация (доля нативного белка вычислена в терминах отрицательной эллиптичности при 222 нм).

стоящий из 59 а. о. [(Leu(-19)-Met(-77)), были неспособны функционировать как шапероны.

Кроме того, оказалось [27], что способность мутантных пропептидов ренатурировать денатурированный субтилизин, как правило, коррелирует с их способностью ингибировать зрелый фермент. Так, значения K_i для ингибирования субтилизина BPN' пропептидами с заменами Ala(-30)Thr, Lys(-36)Glu и Pro(-15)Leu составляли 1.15, 1.61 и 2.10 нМ, соответственно, что сравнимо со значением K_i для ингибирования интактным пропептидом субтилизина BPN' (1.4 нМ). Пропептиды с заменами Ile(-67)Val и Gly(-44)Asp ингибировали субтилизин BPN' с K_i , превосходящей K_i для ингибирования интактным пропептидом в 7–8 раз: 10.0 и 11.0 нМ соответственно. Значение K_i для пропептида с заменой Ile(-48)Thr составляло 118 нМ, а укороченный 59-членный пропептид совсем не ингибировал зрелый фермент. Таким образом, способность пропептида функционировать как внутримолекулярный шаперон, облегчающий правильный фолдинг собственного протеиназного домена, опреде-

ляется тем, насколько хорошо пропептид способен связываться со зрелым ферментом и ингибировать его активность.

Хотя фолдирующая и ингибирующая функции пропептида субтилизина достаточно тесно связаны, недавно показано, что они могут быть разобщены с помощью точечных замен в зрелом ферменте [40]. Основываясь на данных PCA комплекса субтилизина с его пропептидом, была проведена замена Glu112Ala, предположительно вызывающая разрушение нескольких водородных связей, стабилизирующих комплекс. Полученный мутантный профермент оказался способным к полноценному фолдингу, однако обладал замедленной скоростью аутопроцессинга. Ингибирование полученного в конечном итоге зрелого мутантного Glu112Ala-субтилизина добавленным *in trans* пропептидом оказалось в 35 раз ниже аналогичного показателя для субтилизина дикого типа. Полученные таким образом результаты позволяют заключить: (а) фолдирующая и ингибирующая функции пропептида в отношении зре-

лого субтилизина могут быть разобщены; (б) остаток Glu112 зрелого субтилизина не существен для фолдинга, но принимает участие в нековалентном взаимодействии с пропептидом в составе комплекса.

Интересное явление, связанное с фолдингом просубтилизина E, и названное “белковой памятью”, описано в работе [3]. Интактный просубтилизин E и его мутантная форма с заменой Ile(-48)Val были получены в *E. coli* в виде тел включения и ренатурированы. В процессе ренатурации оба профермента подвергались аутопроцессингу с образованием энзиматически активных белков, гидролизующих собственные пропептиды (рис. 2а).

При анализе полученных зрелых ферментов оказалось, что субтилизин E, подвергшийся фолдингу в присутствии внутримолекулярного шаперона с заменой Ile(-48)Val, приобретает альтернативную энзиматически активную конформацию, отличную от той, которую имеет субтилизин E, фолдинг которого осуществлялся при участии интактного пропептида. Несмотря на идентичные N-концевые аминокислотные последовательности, одинаковую молекулярную массу и одинаковое поведение при аналитической гель-фильтрации (рис. 2б), два изоконформера субтилизина, согласно спектрам кругового дихроизма (рис. 2в), обладали похожей, хотя и не идентичной вторичной структурой, отличались по уровню термостабильности (рис. 2г) и по субстратной специфичности. Кроме того, при добавлении пропептидов *in trans* оба изоконформера субтилизина в 4.5 раза лучше связывали тот пропептид, который изначально принимал участие в их фолдинге, чем пропептид, альтернативный по а. о. в положении (-48).

Полученные результаты указывают на то, что в ходе фолдинга фермента пропептиды сообщают ему незакодированную в первичной структуре зрелого субтилизина структурную информацию, что может сказаться на его свойствах. Таким образом, одна и та же полипептидная цепь в зависимости от пути фолдинга может приобретать альтернативные, структурно различающиеся энзиматически активные конформации и поддерживать память об этом процессе.

1.6. Некоторые аспекты фолдинга просубтилизина

Субтилизины характеризуются высоким активационным барьером, отделяющим полностью сформированное нативное состояние зрелого белка от лишь частично подвергнувшегося фолдингу – промежуточного [22]. Подобная кинетическая изоляция является важным свойством протеиназ с широкой субстратной специфичностью, так как в противном случае в условиях динамического равновесия молекулы фермента в промежуточ-

ном состоянии подвергались бы гидролизу активным субтилизином. По-видимому, именно поэтому сворачивание молекул субтилизина *in vitro* происходит очень медленно по сравнению с фолдингом других белков. В работах [41, 42] было показано, что субтилизин BPN' при фолдинге в отсутствие собственного пропептида существует в каталитически неактивном виде, представляющем собой, вероятно, так называемую расплавленную глобулу. Это состояние характеризуется наличием вторичной структуры, идентичной нативной, но практически полным отсутствием третичной, что делает промежуточное состояние менее компактным, чем нативное, но более структурированным, чем полностью денатурированное. Добавление пропептида *in trans* к субтилизиону, находящемуся в таком промежуточном состоянии, приводит к быстрому образованию его энзиматически активной конформации, доказывая, что пропептид способствует преодолению кинетического барьера в ходе фолдинга. Было подсчитано, что взаимодействие пропептида с белком в промежуточном состоянии понижает энергию этого переходного состояния на 7.5 ккал/моль, тем самым увеличивая скорость сворачивания молекулы, по крайней мере, в 10^5 раз [42].

Изучение механизма фолдинга стабильного, т.е. неспособного к аутопроцессингу, Ser221Ala-мутанта просубтилизина BPN' показало [42], что этот белок обладает ярко выраженными вторичной и третичной структурами и по своим структурным характеристикам сходен с нативным субтилизином. Процесс приобретения третичной структуры в случае этого просубтилизина сопровождается образованием промежуточного состояния, сходного с тем, которое было обнаружено при изучении фолдинга субтилизина в отсутствие пропептида [42].

При анализе механизма фолдинга другого мутанта просубтилизина E с заменой Ser221Cys, неспособного к аутопроцессингу, но неспособного к протеолитическому расщеплению пропептида, также было обнаружено промежуточное состояние, имеющее конформацию расплавленной глобулы, которое затем (на стадии аутопроцессинга или на стадии, находящейся в быстром равновесии с промежуточным состоянием) претерпевает структурные изменения, приводящие к уменьшению доступной растворителю гидрофобной поверхности, увеличению компактности и приобретению третичной структуры [2].

Для того чтобы лучше понять процесс фолдинга субтилизина и объяснить, каким образом пропептид понижает активационный барьер, разделяющий частично свернутое и нативное состояние, в работах [22, 23, 25] был использован мутантный субтилизин BPN', сконструированный так, чтобы ускорить реакцию фолдинга. По-

сколько известно, что основной вклад в величину кинетического барьера, существующего при сворачивании субтилизина, вносит процесс формирования высокоаффинного Ca^{2+} -связывающего сайта (K_a 10^{-7} М при 25°C), так называемого сайта А [43], и удаление сайта А посредством делеции аминокислотных остатков 75–83 в субтилизине дестабилизирует фермент, но значительно (в 10^4 – 10^5 раз) ускоряет фолдинг как в присутствии катализатора (пропептида), так и в его отсутствие [22], мутантная форма фермента, использованная в этих работах, содержала: делецию фрагмента 75–83; замены Ser221Ala (для устранения протеолитической активности) и Lys43Asn, Met50Phe, Ala73Leu, Gln206Val, Tyr217Lys, Asn218Ser (для восстановления стабильности субтилизина). Надо отметить, что ни один из мутированных аминокислотных остатков, кроме Ser221, не имеет контактов с пропептидом в бимолекулярном комплексе.

Этот мутантный субтилизин, синтезируемый в *E. coli* в отсутствие пропептида, был получен в виде тел включения, очищен и подвергнут ренатурации *in vitro* в присутствии пропептида и без него. Ренатурированный субтилизин и комплекс субтилизин–пропептид были закристиализованы и их структуры определены с разрешением 2.2 и 2.0 Å соответственно [23]. Оказалось, что мутантный субтилизин способен к независимому фолдингу, причем структура этого субтилизина, синтезированного в чужом хозяине, и не имевшего контакта с пропептидом, соответствует нативной структуре, которую приобретает интактный субтилизин в результате биосинтеза в *B. subtilis*. На основании структуры комплекса пропептида с мутантным субтилизином, которая идентична описанной выше структуре аутопроцессированного комплекса пропептид субтилизина E–тиолсубтилизин E [26], было сделано предположение, что пропептид облегчает фолдинг, стабилизируя центральную $\alpha\beta$ -субструктуру зрелого белка. В отсутствие пропептида эта структура не имеет достаточной стабильности, чтобы инициировать фолдинг. Таким образом, взаимодействие пропептида с $\alpha\beta$ -субструктурой субтилизина может считаться стадией, лимитирующей скорость процесса фолдинга, после которой дальнейшее структурообразование происходит очень быстро. Низкая стабильность пропептида в отсутствие зрелого фермента [4] уменьшает энергию его связывания с субтилизином и вносит вклад в стабилизацию переходного состояния, поскольку выигрыш в энергии за счет фолдинга пропептида в составе комплекса компенсирует затраты энергии при образовании этого комплекса.

Способность пропептида катализировать сворачивание субтилизина, вероятно, нельзя рассматривать исключительно как следствие прочного связывания пропептида в субстратсвязывающем центре фермента, поскольку такие специфиче-

ские ингибиторы субтилизина, как S-SI и CI2 (химотрипсиновый ингибитор 2), характеризующиеся высоким сродством к субтилизиному BPN' ($K_i \sim 10^{-10}$ – 10^{-12} М) [44, 45], не способствовали фолдингу [23, 42]. Однако в работе [46] была достигнута практически полная ренатурация субтилизина BPN' в присутствии мутантного S-SI, который был превращен в расщепляемый субтилизином временный ингибитор путем удаления одной дисульфидной связи вблизи активного центра.

Поскольку мутантный субтилизин, лишенный высокоаффинного сайта А, в отличие от интактного субтилизина, был способен к фолдингу *in vitro* в отсутствие пропептида, можно предположить, что пропептид, ковалентно связанный со зрелым ферментом (в составе предшественника), понижает энергетический барьер перехода в нативное состояние не только за счет стабилизации определенной структуры субтилизина, но также за счет дестабилизации непродуктивного промежуточного состояния, образующегося в результате преждевременного формирования Ca^{2+} -связывающего сайта и препятствующего дальнейшему фолдингу. Вероятно, пропептид направляет сворачивание полипептидной цепи таким образом, чтобы сайт А формировался в последнюю очередь, и тем самым препятствует образованию непродуктивного промежуточного состояния, которое может служить кинетической ловушкой [22, 23].

Механизм аутопроцессинга просубтилизина, описанный в предыдущих главах, во многом согласуется с этой идеей. В нативном субтилизине остаток Gln2 является одним из лигандов атома Ca^{2+} , принимающих участие в образовании сайта А. В то же время, согласно предложенной модели внутримолекулярного аутопроцессинга просубтилизина, остатки Ala1 и Gln2 должны занимать S1'- и S2'-сайты субтилизина соответственно. Таким образом, сайт А не может быть полностью сформирован до тех пор, пока не произойдет аутопротеолитическое отщепление пропептида, а временное ингибирование пропептидом субтилизина может защищать фермент от автолиза до того момента, когда будет завершено образование Ca^{2+} -связывающего сайта.

2. ПРЕДШЕСТВЕННИКИ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ СЕМЕЙСТВА ХИМОТРИПСИНА

2.1. Структурная организация генов химотрипсиноподобных протеиназ

α -Литическая протеиназа – внеклеточная протеиназа, секретируемая грамотрицательным микроорганизмом *Lysobacter enzymogenes*, подобно химотрипсину, принадлежит к клану SA сериновых протеиназ [5, 47, 48], внутри которого образует семейство S2, включающее также протеина-

| | |
|------|---|
| ALP | ADQVDPQLKFMQRDLGI FPTQLPQYLQTEKLARTQAAAIERE |
| SGPE | ADTPPAAPSAI PAPSAYALDAAVERQ |
| SGPC | AAPPVSADSLSPGMLAALERDLGLDEDAARSRIANEYRAAAVAAGLEKS |
| SGPD | SDDVPAFGAKTLSADAAGKLATTLDRD |
| ALP | FGAQTAFAGSWIERNEDGSFKLVAATSGARKSSTL-GGVEVRNVRYSLKQLQSAME |
| SGPE | LGAATAGTYLDAKTGGLVVTVTDRAEEQAR-----AAGATVRRVARSAA |
| SGPC | LGARYAGARVSGAKATL--TVATTDASEAARITEAGARAEEVGHSLDRFEGVKK |
| SGPD | LGADAGSYDATAKTLLVNVVDEAGAEQVR-----QAGGKARIVENSLA |
| SGPA | APEAESKATVS |
| SGPB | ETPRTFSAN |
| ALP | QLDAGANARVKGVSPLDGVQSWYVDPRSNAVVVVKVDDGATEAGVD-FVALSGA |
| SGPE | QLD-AAMATLEA-EAKIT-GTSWGVDPRTNRVAVEADSSVSARDMARLEAVAER |
| SGPC | SLDKAALDKAPK-----VPVWYVDVAANRVVV--NAASPAAGQA-FLKVAGV |
| SGPD | ELK-SARGTLTE-KATIP-GTSMAVDPVSNKVLVTADSTVDGAAWKKLSAVVEG |
| SGPA | QLA-DASSAIL--AADVA-GTAWYTEASTGKIVLTADSTVSKAELAKVSNALAG |
| SGPB | QLT-AASDAVL--GADIA-GTAWNIDPQSKRLVVTVDSTVSKAEINQIKKSAGA |
| ALP | DSAQVRIESSPGKLQTT↓ANIVGGIEYSINNASLCSVGFVS↓TRGATKGFV↓TAGHC |
| SGPE | LGSAVDIKRVPGVFHRE-↓VLGGGAIYGG-GSRCSAAFNVTKGGARYFV↓TAGHC |
| SGPC | DRGLVTVARSAEQPRAL↓ADIRGGDAYMNGSGRC↓SVGFVS↓TRGTQNGFATAGHC |
| SGPD | LGGKAE LNRTAGEFTPL-↓IAGGD AIWGS-GSRCSLGFNVVKGGEPEYFLTAGHC |
| SGPA | SKAKLTVKRAEGKFTPL-↓IAGGEA ITTG-GSRCSLGFNVSVNGVAHALTAGHC |
| SGPB | NADALRIERTPGKFTKL-↓ISGGDAIYSS-TGRCSLGFNVRSYSTYYFLTAGHC |
| ALP | GTVNATAR---IGGAVVGI FAARVFPNDRAVVS↓LTSAQTL-LPRVA--NGSSF |
| SGPE | TNISANWS-ASSGGSVVGVREGTSFPNDYGI VRYTDGSSP-AGTVDLYNGS-T |
| SGPC | GRVGT TTN--GVNQQAQGT FQGSTFPGRDI AWVATNANWTP-RPLVNGYGRG-D |
| SGPD | TESVTSWS-DTQGGPEIGANEGSSFPENDYGLVKYTS DTAH-PSEVNLYDGS-T |
| SGPA | TNISASWS-----IGTRTGTSPFNNDYGI IRHSNPAAA-DGRVYLYNGS-Y |
| SGPB | TDGATTWWANSARTTVLGTTSGSSFPFNNDYGI VRYTNTTIPKDGTVG-----G |
| ALP | VTVRGSTEAAVGAAVCRSGRTTG YQCGTITAKNV TANYAE-GAVRGLTQGNACM |
| SGPE | QDISSAANAVVGA I KKS GSTTKVTS GVTAVNVTVNYGD-GPVYNMVVRTTACS |
| SGPC | VTVAGSTASVVGASVCRSGSTTGWHCGTIQQLNTSVTYPE-GTISGVRTTSVCA |
| SGPD | QAITQAGATVGA VTRSGSTTG VHDGEVTALD ATVNYGNGDI VNGLIQTTVCA |
| SGPA | QDITTAGNAFVGA VQRSGSTTGLRSGSVTGLNATVNYGSSGIVYGM IQTNVCA |
| SGPB | QDITSAANATVGM AVTRRGSTTG THSGSVTALNATVNYGGGDVVYGMIRTNVCA |
| ALP | GRGDSGGSWITSAGQAQGVMSGGNVQSNGNNGGIPASQRSSLFERLQPI LSQLYG |
| SGPE | AGGDSGGAHFAGS-VALGIHSGSS-----G-CS--GTAGSAIHQPVTEALSAYG |
| SGPC | EPGDSGGSYISGS-QA QVTS GGS-----GNCS---SGGTTYFQPINPLLQAYG |
| SGPD | EPGDSGGALFAGD-TALGLTSGGS-----GDCSS---GGTTYFQVPVPEALAAYG |
| SGPA | EPGDSGGSLFAGS-TALGLTSGGS-----GNCR---TGTTYFQVPVTEALSAYG |
| SGPB | EPGDSGGPLYSGT-RAIGLTS GGS-----GNCS---SGTTYFQVPVTEALSAYG |
| ALP | LSLV |
| SGPE | VTVY |
| SGPC | LTLVTSGGGTPDPPTTPTDPSGGTWAVGTAYAGATVTYGGATYRCLQANTAQPGWTPAOVPALQWRV |
| SGPD | AEIG |
| SGPA | ATVL |
| SGPB | VS VY |

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей препроферментов бактериальных протеиназ семейства химотрипсина (по данным работы [62]). Стрелками обозначены сайты отщепления пропептидов. ALP – α -литическая протеиназа *L. enzymogenes*. Мелким шрифтом обозначен дополнительный С-концевой хитинсвязывающий домен SGPC, не характерный для других протеиназ этого семейства. Консервативные блоки обозначены боксами.

зы А, В, С, D и Е из грамположительной бактерии *Streptomyces griseus* (SGPA, SGPB, SGPC, SGPD и SGPE) [49–51]. Анализ нуклеотидной последовательности структурного гена, кодирующего α -ли-

тическую протеиназу [52], показал, что подобно субтилизину [9] и ряду секреторных протеиназ бацилл и актиномицетов [7, 53–55], этот фермент первоначально синтезируется в виде большого

предшественника, первичная структура которого включает последовательность сигнального пептида (33 а. о.), 166-членный пропептид и последовательность зрелого фермента (198 а. о.). Интересно, что α -литическая протеиназа *L. enzymogenes* – первый пример бактериальной протеиназы, секретлируемой грамотрицательным микроорганизмом, предшественник которой содержит большой N-концевой пропептид. До этого были известны только две протеиназы грамотрицательных бактерий, синтезирующиеся в виде предшественников с протяженными C-концевыми пропептидами: сериновая химотрипсиноподобная IgA-специфичная протеиназа *Neisseria gonorrhoea* [56] и внеклеточная сериновая протеиназа *Serratia marcescens* [57]. Таким образом, обнаружение N-концевого пропептида у предшественника α -литической протеиназы *L. enzymogenes* показало, что различная локализация пропептида в структуре препрофермента не связана напрямую с отличиями в механизмах секреции грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Подобно α -литической протеиназе, остальные представители S2-семейства синтезируются в виде препроферментов [58]. В то время как зрелые ферменты имеют существенное сходство в последовательностях и пространственной структуре, их пропептиды заметно отличаются друг от друга по размеру (78, 76, 162, 140 и 139 а. о. у протеиназ SGPA, SGPB, SGPC, SGPD и SGPE соответственно) [58] и первичной структуре (рис. 3, табл. 1 и 2). Так, пропептиды SGPA и SGPB совпадают по аминокислотной последовательности на 49%, в то время как их зрелые ферменты, состоящие из 181 и 185 а. о., соответственно, содержат 62% совпадающих остатков [58]. Степень совпадения первичных структур пропептидов α -литической протеиназы с пропептидами SGPA и SGPB составляет 23.0 и 36.5% соответственно (табл. 2).

2.2. Процессинг проферментов *in vivo*

Структурно-функциональные отношения в молекуле предшественника α -литической протеиназы изучались с помощью экспрессионной системы на основе *E. coli* [59], которая в общих чертах воспроизводила условия функционирования в природном хозяине. При экспрессии полноразмерного природного гена функционально активный зрелый фермент накапливался в периплазматическом пространстве. Отсутствие непротестированного предшественника в какой-либо из внутриклеточных фракций свидетельствовало о том, что в гетерологичной системе *E. coli* наблюдается эффективная активация профермента α -литической протеиназы с образованием зрелой формы. Анализ N-концевой аминокислотной последовательности, полученной в этой системе протеиназы, подтвер-

Таблица 1. Степень идентичности последовательностей зрелых ферментов бактериальных химотрипсиноподобных протеиназ семейства α -литической протеиназы (в процентах совпадающих остатков)

| Протеиназа | ALP | SGPE | SGPC | SGPD | SGPA | SGPB |
|------------|-----|------|------|------|------|------|
| ALP | 100 | 43.1 | 49.7 | 40.2 | 40.0 | 40.3 |
| SGPE | | 100 | 38.2 | 57.6 | 58.4 | 55.6 |
| SGPC | | | 100 | 47.3 | 46.6 | 50.0 |
| SGPD | | | | 100 | 63.4 | 62.9 |
| SGPA | | | | | 100 | 62.0 |
| SGPB | | | | | | 100 |

ALP – α -литическая протеиназа *L. enzymogenes*. Результаты получены путем обработки выравнивания [62] (см. рис. 3) с помощью программы MicroGenie (Beckman).

Таблица 2. Степень идентичности последовательностей пропептидов бактериальных химотрипсиноподобных протеиназ семейства α -литической протеиназы (в процентах совпадающих остатков)

| Протеиназа | ALP | SGPE | SGPC | SGPD | SGPA | SGPB |
|------------|-----|------|------|------|------|------|
| ALP | 100 | 31.4 | 26.8 | 29.3 | 23.0 | 36.5 |
| SGPE | | 100 | 34.0 | 41.0 | 38.7 | 38.3 |
| SGPC | | | 100 | 33.1 | 42.9 | 49.7 |
| SGPD | | | | 100 | 39.4 | 48.1 |
| SGPA | | | | | 100 | 49.0 |
| SGPB | | | | | | 100 |

ALP – α -литическая протеиназа *L. enzymogenes*. Результаты получены путем обработки выравнивания [62] (см. рис. 3) с помощью программы MicroGenie (Beckman).

дил, что сайт процессинга пропептида в клетках *E. coli* полностью соответствует природному.

Экспрессия в аналогичных условиях мутантного гена α -литической протеиназы с заменой S195A приводила к образованию и накоплению внутри клеток непротестированного предшественника в нерастворимой форме и не сопровождалась появлением зрелого фермента [59]. Этот результат может свидетельствовать, что в случае α -литической протеиназы, как и в случае субтилизина, процесс активации профермента является аутокаталитическим и требует протеолитической активности α -литической протеиназы.

Существует ряд данных, указывающих на то, что процессинг предшественников химотрипсиноподобных протеиназ *S. griseus*, сопровождающийся образованием функционально активных зрелых ферментов, также является аутокаталитическим и не требует действия внешних протеиназ:

1. Сайт процессинга предшественника точно соответствует первичной специфичности каждого фермента. Так, SGPA, SGPB, SGPC и SGPD, спе-

цифичные к аминокислотным остаткам с большими гидрофобными боковыми цепями, имеют в положении P1 (С-концевой остаток пропептида) Leu [49], а SGPE, предпочитающая в положении P1 остаток Glu, гидролизует в соответствующем проферменте связь Glu-Val [60].

2. Экспрессия полноразмерного природного гена протеиназы SGPB в *E. coli* и в *B. subtilis* [61] позволяет получать правильно процессированный зрелый фермент, в то время как попытка экспрессии в *E. coli* того же гена с точечной заменой в области активного центра приводит к образованию непроцессированного предшественника [49]. Невозможность получить зрелый фермент при экспрессии в *B. subtilis* полноразмерных вариантов гена SGPE с заменами в области активного центра также свидетельствует об аутопротеолитическом удалении пропептида [62].

3. На примере протеиназ SGPB [49] и SGPE [62] было показано, что природа аминокислотного остатка в положении (-1) профермента существенна для его активации. Так, при замене в экспрессируемом в *B. subtilis* полноразмерном гене SGPE остатка Glu в положении (-1) на Ala, Leu, Ser, Asp и Gln не было обнаружено продукции активного фермента. Подобный результат наблюдался и при экспрессии в *E. coli* гена, кодирующего мутантный предшественник SGPB с заменой Leu(-1)Val. В то же время замена остатка Leu(-1) на оптимальный для положения P1 остаток Phe не сказывалась на уровне продукции зрелого SGPB [49].

Необходимо отметить, что природа аминокислотного остатка в положении (-1) профермента может влиять не только на его аутопроцессинг, но также и на предшествующий этому событию фолдинг фермента [49].

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о том, что в случае бактериальных химотрипсиноподобных протеиназ образование функционально активного зрелого фермента зависит от эффективности аутопроцессинга соответствующего предшественника, хотя механизм аутоактивации (внутри- или межмолекулярный) остается пока неизученным.

2.3. Функциональная роль пропептида α -литической протеиназы

В работе [63] было показано, что пропептид α -литической протеиназы играет важную роль в образовании функционально активного фермента *in vivo*. Для этого в *E. coli* была осуществлена экспрессия гена зрелой протеиназы, лишённой пропептида (пропептид был сохранен). При этом ни в культуральной жидкости, ни в клетках не было обнаружено протеолитической активности, а специфический продукт, соответствующий по молекулярной массе зрелой протеиназе, присут-

ствовал в периплазматическом пространстве в нерастворимой форме. В то же время при экспрессии в этой же рекомбинантной системе природного гена α -литической протеиназы функционально активный зрелый фермент накапливался в периплазме. Полученные результаты свидетельствуют о том, что пропептид α -литической протеиназы, как и в случае субтилизина, способствует фолдингу фермента, причем *in vivo* подобный эффект наблюдается и при отсутствии ковалентной связи между пропептидом и зрелой протеиназой [63].

Эксперименты *in vitro*, направленные на дальнейшее изучение взаимодействий между пропептидом и зрелым ферментом α -литической протеиназы, подтвердили, что пропептид в отсутствие других белковых факторов и внешних источников энергии способствует рефолдингу зрелой протеиназы, денатурированной без разрыва дисульфидных связей [64]. При проведении реакции ренатурации в отсутствие пропептида удалось впервые зафиксировать неактивное переходное состояние [64, 65], нестабильное в случае других протеиназ. Это переходное состояние устойчиво в течение нескольких недель при физиологическом значении pH в отсутствие денатурирующих агентов, но быстро переходит в активную форму при добавлении пропептида. Эффективность фолдинга в данном случае составляет приблизительно 75%. Физическими методами обнаружено, что по содержанию элементов вторичной структуры и гидродинамическому радиусу переходное состояние обладает свойствами, промежуточными между свойствами нативного и полностью денатурированного белка.

В отсутствие пропептида высокий энергетический барьер (27 ккал/моль) блокирует переход белка из промежуточного состояния к нативному. Пропептид, связываясь непосредственно с белком в переходном состоянии, которое образуется на поздней стадии процесса фолдинга и имеет структуру, подобную нативной, стабилизирует это состояние, тем самым снижая энергию активации и увеличивая скорость сворачивания более чем в 10^7 раз. Таким образом, механизм действия пропептида существенно отличается от механизма действия молекулярных шаперонов, которые связываются с частично свернутыми белками и препятствуют обратным фолдингу процессам, не участвуя непосредственно в образовании нативной конформации.

В результате экспериментов, направленных на изучение фолдинга α -литической протеиназы *in vitro*, была обнаружена еще одна особенность пропептида, играющая, вероятно, существенную роль в механизме, посредством которого пропептид способствует фолдингу протеиназного домена [66, 67]. Оказалось, что пропептид является вы-

сокоаффинным ингибитором зрелого фермента с $K_i \sim 0.5\text{--}2.0 \times 10^{-10}$ М, т.е., пропептид – самый эффективный среди известных ингибиторов α -литической протеиназы [68]. Механизм, с помощью которого прекращается подобное ингибирующее действие пропептида *in vivo*, не известен, но *in vitro* многие протеиназы способны гидролизовать пропептид, разрушая тем самым фермент-пропептидный комплекс и способствуя освобождению активной протеиназы [66].

Специфичность ингибирования пропептидом α -литической протеиназы изучалась [66] на примере двух структурно родственных сериновых протеиназ – SGPB и панкреатической эластазы. Аминокислотная последовательность SGPB на 37% совпадает с последовательностью α -литической протеиназы, но субстратная специфичность этих ферментов несколько отличается. Панкреатическая эластаза по первичной структуре совпадает с α -литической протеиназой всего на 18%, но обладает той же субстратной специфичностью. Оказалось, что пропептид α -литической протеиназы является сильным конкурентным ингибитором протеиназы SGPB (K_i 1.1 нМ), но не проявляет никакого эффекта в отношении панкреатической эластазы. Все это свидетельствует о многоточечном характере связывания пропептида со зрелым ферментом, не ограничивающимся центром первичной субстратной специфичности фермента. Тот факт, что пропептид α -литической протеиназы ингибирует SGPB, позволяет ожидать, что собственный пропептид SGPB тоже обладает ингибирующей функцией.

Спектроскопические, биохимические и кинетические эксперименты, направленные на изучение механизма ингибирования α -литической протеиназы собственным пропептидом, показали, что, подобно многим другим протеиназным ингибиторам [69], пропептид не вносит никаких конформационных изменений в строение активного центра протеиназы и оставляет его функциональным [70]. Однако имеет место экранирование субстратсвязывающего центра протеиназы пропептидом, в результате чего блокируется доступ субстрата. Было показано, что С-концевые остатки пропептида α -литической протеиназы располагаются в S-подцентрах фермента (Thr(-1) занимает сайт S1), осуществляя специфические взаимодействия в этой области. Необходимо отметить, что в отличие от ситуации, реализующейся в случае субтилизина (см. выше), образование комплекса между пропептидом и зрелым ферментом α -литической протеиназы не приводит к существенным изменениям вторичной или третичной структуры компонентов комплекса, что позволяет констатировать более независимую пространственную организацию пропептида α -литической протеиназы по сравнению с пропептидом субтилизина [4, 70].

Таким образом, эксперименты *in vitro* показали, что пропептид α -литической протеиназы имеет, по крайней мере, две различные функции: катализ фолдинга зрелого фермента и его ингибирование.

2.4. Взаимодействие между зрелыми химотрипсиноподобными протеиназами *S. griseus* и их пропептидами

Эксперименты, направленные на исследование взаимодействий между зрелыми химотрипсиноподобными протеиназами *S. griseus* и их пропептидами, проводились *in vivo* методом делеционного анализа. В работе [71] было получено несколько конструкций, несущих варианты гена SGPB с делециями различной длины в области пропептида. Делеции длиной 4, 10, 15 и 20 а. о. соответственно начинались с N-конца 76-членного пропептида (пропептид был сохранен полностью). При экспрессии полученных конструкций в *B. subtilis* оказалось, что активность SGPB в культуральной жидкости экспоненциально уменьшается с увеличением размера делеции в пропептиде. Протеолитическая активность, обнаруживаемая в культуральной жидкости при экспрессии мутантных генов SGPB с делециями 15 и 20 а. о., составляла соответственно 3 и 0.3% активности, фиксируемой при экспрессии интактного гена SGPB. Было доказано, что эффект вызван исключительно уменьшением концентрации активной зрелой протеиназы в культуральной жидкости, при этом ни в супернатантах, ни в клеточных фракциях не было обнаружено непротессированных, неправильно протессированных или неактивных форм фермента. Аналогичные результаты были получены и для других химотрипсиноподобных протеиназ *S. griseus* [71]. Такая зависимость секреции активного фермента от размера делеции в его пропептиде может отражать каталитическую роль пропептида в процессе фолдинга протеиназ, а также возможно существующую связь между фолдингом и секрецией фермента. Кроме того, полученные результаты позволили авторам предположить, что взаимодействия между пропептидом и протеиназным доменом в процессе фолдинга, активации и, возможно, секреции осуществляются скорее через множественные, равномерно распределенные по всей длине пропептида (по крайней мере в N-концевой части) контакты, нежели через ключевые точечные взаимодействия.

Поскольку ферменты SGPA и SGPB гомологичны как в области зрелого фермента, так и в области пропептида (табл. 1 и 2), и, кроме того, положения α -углеродных атомов этих протеиназ, как следует из их кристаллических структур [72], топологически эквивалентны на 85%, было интересно выяснить, может ли пропептид одного фер-

мента взаимодействовать с протеиназным доменом другого. Для этого в работе [71] была получена секреторная конструкция, несущая химерный ген, в котором последовательность, кодирующая пропептид SGPA, была непосредственно соединена с последовательностью, соответствующей зрелой SGPB. При экспрессии гена гибридного белка (пропептид SGPA–зрелая SGPB) в гетерологичной системе *B. subtilis* в культуральной жидкости было обнаружено 7% протеиназной активности зрелой SGPB. Полученный результат позволил авторам сделать вывод, что пропептид SGPA может способствовать образованию секреторной активной формы SGPB, хотя эффективность этого взаимодействия значительно ниже, чем в случае гомологичного пропептида.

2.5. Сравнительная характеристика предшественников химотрипсиноподобных протеиназ бактериального и животного происхождения

Поскольку до настоящего времени не получено данных о пространственных структурах предшественников бактериальных химотрипсиноподобных протеиназ или соответствующих реассоциированных комплексов пропептид–зрелый фермент, многие (особенно структурные) аспекты взаимодействий, существующих между пропептидом и протеиназным доменом в составе профермента и после разрыва ковалентной связи между ними в результате процессинга, остаются неясными. В то же время первичная и пространственная структуры, механизмы ингибирования и активации предшественников панкреатических химотрипсиноподобных протеиназ животных – химотрипсиногена, трипсиногена и проэластазы – изучены достаточно хорошо. Сравнение предшественников химотрипсиноподобных протеиназ бактерий и их структурных гомологов животного происхождения выявляют между ними существенные различия.

Во-первых, все предшественники бактериальных химотрипсиноподобных протеиназ, за исключением трипсина *S. griseus*, обладают большими пропептидами, в то время как пропептиды химотрипсиноподобных панкреатических протеиназ имеют небольшие размеры, насчитывая иногда несколько аминокислот, как в случае трипсина, пропептид которого содержит всего 6 а. о. [48].

Во-вторых, на примере α -литической протеиназы было доказано, что пропептиды химотрипсиноподобных бактериальных протеиназ необходимы для фолдинга протеиназного домена, тогда как трипсин, химотрипсин и эластаза не нуждаются в своих коротких пропептидах для приобретения нативной конформации [73].

В-третьих, α -литическая протеиназа ингибируется собственным пропептидом, в отличие от про-

пептидов структурно родственных протеиназ – трипсина, химотрипсина и эластазы, не являющихся протеиназными ингибиторами [74]: функция пропептидов протеиназ животных заключается в том, чтобы блокировать *N*-конец зрелого фермента, препятствуя несвоевременному образованию активной конформации.

Таким образом, механизмы, с помощью которых пропептиды химотрипсиноподобных протеиназ бактериального и животного происхождения поддерживают свои ферменты в неактивном состоянии, существенно различаются. В случае α -литической протеиназы, как обсуждалось выше, ингибирование, по-видимому, происходит за счет связывания пропептида в субстратсвязывающих центрах, в результате чего блокируется доступ к каталитическим остаткам активного центра фермента. По всей вероятности, связывание пропептида или его отщепление в результате аутопроцессинга не вносит конформационных изменений в строение активного центра протеиназы, оставляя его полностью функциональным.

На основании изложенного можно предположить, что существенные различия, выявленные между проферментами химотрипсиноподобных протеиназ бактерий с одной стороны и животных с другой стороны, отражают более сложный механизм активации в случае бактериальных протеиназ или более комплексную роль их предшественников.

3. ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ТЕРМОЛИЗИНОПОДОБНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1. Структура генов, кодирующих металлопротеиназы, и краткая характеристика ферментов

Термостабильная Zn^{2+} -содержащая металлопротеиназа термолизин (TLN) – нейтральная эндопептидаза, секретлируемая клетками *B. thermoproteolyticus* [75], является наиболее изученным представителем большого семейства внеклеточных металлопротеиназ (клан MA, семейство M4 [5]), обнаруженных как у грамположительных, так и у грамотрицательных микроорганизмов. В состав семейства термолизиноподобных протеиназ входят бактериальные нейтральные протеиназы, секретлируемые *B. cereus* [76], *B. amyloliquefaciens* [18], *B. subtilis* [53, 77], *B. stearothermophilus* [55, 78], *B. caldolyticus* [79], *Brevibacillus brevis* [80], *Streptomyces cacaoi* [81], *Pseudomonas aeruginosa* [82, 83] и некоторыми другими микроорганизмами. Представители данного семейства обладают высокой степенью сходства последовательностей и третичной структуры, а также похожей субстратной специфичностью. Данные РСА кристал-

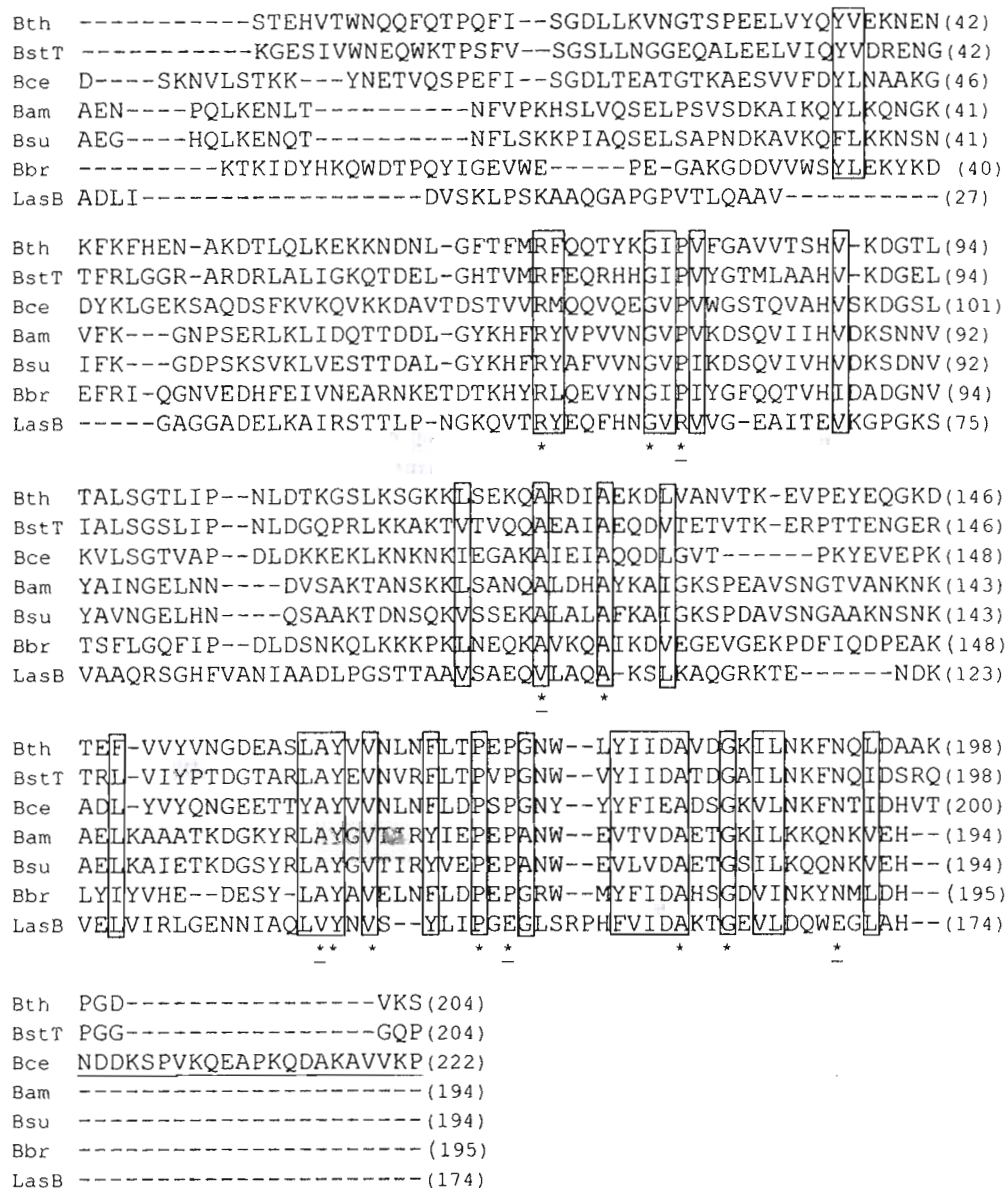


Рис. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей пропептидов бактериальных металлопротеиназ. Использованные сокращения металлопротеиназ (в скобках даны номера доступа в базе EBI): Bth – *B. thermoproteolyticus*, термолизин (X76986), BstT – *B. stearothermophilus* (M11446), Bce – *B. cereus* (M83910), Bam – *B. amyloliquefaciens* (K02497), Bsu – *B. subtilis* (K01985), Bbr – *B. brevis* (X61286), LasB – *P. aeruginosa*, эластаза (M19472). Консервативные блоки взяты в рамки; полностью инвариантные позиции обозначены звездочками, позиции, инвариантные только среди ферментов бацилл, – подчеркнутыми звездочками, делеции – дефисами. Уникальная дополнительная последовательность в C-концевой части металлоэндопептидазы *B. cereus* подчеркнута.

лических структур металлопротеиназ из *B. cereus* [84] и граммотрицательного организма *P. aeruginosa* [85] подтвердили сходство их пространственных структур с трехмерной структурой термолизина [86]. Похожие структуры были предсказаны и для других представителей семейства термолизиноподобных нейтральных протеиназ [87–89]. Для всех представителей этого семейства характерна двухдоменная организация: в щели между

N-концевым доменом, образованным преимущественно β -структурами, и C-концевым доменом, состоящим в основном из α -спиральных участков, расположен активный центр, содержащий один ион Zn^{2+} . В соответствии с данными РСА термолизина и предложенным механизмом его каталитического действия [90], ион Zn^{2+} в активном центре имеет тетраэдрическую конфигурацию связей и координируется остатками His142, His146,

Glu166 и молекулой воды. Кроме каталитического иона Zn^{2+} представители семейства термолизиноподобных нейтральных протеиназ связывают различное число (2–4) ионов Ca^{2+} , что обеспечивает стабилизацию протеиназ в отношении химической и термической денатурации и автолиза [91].

Термолизиноподобные металлопротеиназы, так же как и другие секреторные протеиназы, синтезируются в виде неактивных предшественников, пропептиды которых имеют очень большой размер (в среднем около 200 а. о., рис. 4) – до $\sim 2/3$ размера соответствующих зрелых ферментов. Так, предшественник термолизина включает последовательность сигнального лидера, состоящую из 27 а. о., удаляемую в процессе секреции через цитоплазматическую мембрану, последовательность пропептида из 204 а. о. и непосредственно зрелый фермент, насчитывающий 316 а. о. [92]. Полноразмерный ген металлопротеиназы *B. cereus* [76] кодирует последовательности лидерного пептида (27 а. о.), пропептида (222 а. о.) и зрелого фермента (317 а. о.). Соответствующие элементы металлопротеиназы *S. cacaoi* состоят из 34, 171 и 345 а. о. соответственно [93].

Эластаза, кодируемая геном *lasB*, – один из основных секреторных ферментов патогенного микроорганизма *P. aeruginosa* – деградирует ряд биологически активных белков, включая эластин [94], некоторые коллагены [95], иммуноглобулины G и A [96], сывороточный α_1 -протеиназный ингибитор [97], компоненты комплемента [98]. Специфичность эластазы *LasB* как по белковым, так и по синтетическим олигопептидным субстратам практически полностью совпадает со специфичностью лейкоцитарной эластазы млекопитающих, хотя в отличие от структурно родственных химотрипсину панкреатической и лейкоцитарной эластаз, *LasB* относится к семейству термолизиноподобных металлопротеиназ [94].

Ген *lasB* кодирует препрофермент с молекулярной массой 53.6 кДа [82], в состав которого входит последовательность сигнального пептида (3.0 кДа), после косекреторного удаления которой образуется проэластаза (50.6 кДа). Проэластаза процессируется с образованием периплазматической эластазы (33.0 кДа) и пропептида, состоящего из 174 а. о. (18 кДа) [99]. Процессированная эластаза и пропептид временно накапливаются в периплазме *P. aeruginosa* в виде комплекса до тех пор, пока не происходит дальнейшая секреция зрелого фермента через внешнюю мембрану.

При сравнении аминокислотных последовательностей пропептидов 7 бациллярных термолизиноподобных протеиназ и пропептида эластазы *P. aeruginosa* (рис. 4) было обнаружено 13 а. о., полностью инвариантных в пропептидах бациллярных металлопротеиназ, 8 из которых оказались инвариантными и в пропептиде эластазы [76].

Кроме того, 29 позиций, локализованных преимущественно в С-концевой части пропептидов, были заняты функционально подобными аминокислотами. Идентичность первичных структур в области пропептидов была наивысшей у тех протеиназ, которые содержали наибольшее число совпадающих остатков в области зрелых ферментов, хотя степень сходства последовательностей для пропептидов была существенно ниже, чем для зрелых протеиназ.

3.2. Активация предшественников металлопротеиназ *in vivo* и *in vitro*

Существует ряд доказательств, что процессинг термолизиноподобных протеиназ, подобно процессингу субтилизина [20] и химотрипсиноподобных бактериальных протеиназ [49, 59, 61], является аутокаталитическим [90, 100–103]. Большинство этих доказательств базируется на анализе данных мутагенеза, затрагивающего каталитические остатки активного центра, и экспрессии мутантных генов в различных клеточных системах. Согласно модели, описывающей механизм каталитического действия термолизина [86, 90], к ключевым остаткам, вовлеченным в катализ, относятся Glu143, осуществляющий поляризацию молекулы воды, и His231, обеспечивающий стабилизацию переходного состояния за счет образования водородной связи с карбонильной группой субстрата. Замена любого из этих остатков приводит к инактивации термолизина.

Для исследования родственной термолизину нейтральной протеиназы *B. subtilis* были получены мутанты, в которых остаток Glu143 был заменен на остатки Ala, Ser, Trp или Arg, а остаток His231 – на остатки Leu, Val и Cys [100]. При анализе полученных мутантов в используемом для трансформации штамме *B. subtilis* SMS108, не содержащем собственных хромосомных генов нейтральной протеиназы, оказалось, что мутанты по остатку Glu143 практически полностью утрачивали способность секретироваться в культуральную жидкость *B. subtilis*, но присутствовали в клеточных экстрактах в непроецессированной форме с молекулярной массой 62 кДа. Уровень секреции His-мутантов был приблизительно в 100 раз ниже, чем для интактного фермента, а протеолитическая активность этих мутантов по синтетическому пептидному субстрату составляла 0.15–1.92% активности зрелой протеиназы, экспрессированной в виде интактного препрофермента. При анализе клеточных экстрактов *B. subtilis* также была обнаружена непроецессированная форма мутантов по остатку His231. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что полная инактивация или частичное уменьшение активности нейтральной протеиназы, вызванные заменой каталитических остатков активного центра

фермента, приводят к нарушению процессинга профермента, что может являться аргументом в пользу аутокаталитического удаления пропептида. Кроме того, данные результаты предполагают наличие связи между потерей ферментативной активности, блокирующей активацию предшественника нейтральной протеиназы, и уровнем секреции зрелого белка в культуральную жидкость.

Подобные результаты были обнаружены при экспрессии в протеадефицитном штамме *B. subtilis* DB117 мутантов по активному центру металлопротеиназы *B. stearothermophilus* с заменами His231Ala и His231Phe [90]. В этом случае детектируемый уровень зрелой мутантной металлопротеиназы в культуральной жидкости *B. subtilis* был ниже, чем при экспрессии интактного гена металлопротеиназы в этом же штамме. Кроме того, иммуноферментный анализ клеточных экстрактов *B. subtilis* обнаружил присутствие 60-кДа-белка, соответствующего непроцессированному мутантному проферменту, образование которого не наблюдалось при экспрессии природного гена металлопротеиназы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что замена каталитического остатка в активном центре термолитиноподобной протеиназы *B. stearothermophilus*, понижающая ее протеолитическую активность приблизительно в 500 раз [90], влияет на процессинг профермента. Это позволяет предположить, что и в данном случае механизм аутокаталитической активации предшественника наиболее вероятен.

Для изучения механизмов процессинга проэластазы *P. aeruginosa* была создана гетерологичная система, обеспечивающая суперэкспрессию гена *lasB*, кодирующего эластазу, в клетках *E. coli* под контролем индуцибельных промоторов T7 или *tac* [102]. При экспрессии интактного гена *lasB* эластаза была обнаружена в периплазматической фракции *E. coli* в ферментативно активной 33-кДа-форме, хотя небольшое количество непроцессированной 51-кДа-проэластазы также было зафиксировано в периплазме. Анализ N-концевой аминокислотной последовательности периплазматической эластазы подтвердил, что сайт процессинга проэластазы в клетках *E. coli* соответствует природному. Тот факт, что в гетерологичном хозяине в отсутствие секреторного аппарата *P. aeruginosa* наблюдается правильный процессинг профермента эластазы, может свидетельствовать об аутокаталитическом механизме этого процесса. В качестве доказательства аутокаталитического удаления пропептида можно рассматривать накопление в периплазматическом пространстве *E. coli* белка с молекулярной массой 51 кДа, соответствующего проферменту эластазы, при суперэкспрессии мутантных вариантов гена *lasB*, с заменой остатка His223 активного центра на Phe (*lasB1*) или Tyr (*lasB2*) [102].

Подобный механизм согласуется с наблюдением, что хелатирующие агенты, такие, как EDTA, 1,10-фенантролин, тетраэтиленпентамин, действующие как ингибиторы эластазы, блокируют также процессинг проэластазы [99].

Чтобы исключить предположение о том, что причиной устойчивости мутантов проэластазы по активному центру к процессингу являются конформационные изменения в молекуле, вызванные этими мутациями, лизаты *E. coli*, содержащие продукты экспрессии мутантных генов *lasB1* и *lasB2* были подвергнуты действию зрелой эластазы. Результатом такой межмолекулярной активации *in vitro* было исчезновение 51-кДа-профермента эластазы и накопление процессированной 33-кДа-формы, что свидетельствует об отсутствии драматических конформационных изменений в мутантных белках [102].

В работах [76, 103] была сделана попытка изучить роль пропептида термолитиноподобной нейтральной протеиназы *B. cereus* в процессинге собственного профермента. Для этого был сконструирован мутантный вариант гена, кодирующий профермент с делецией 23 C-концевых а. о. пропептида (остатки 198–220, рис. 4). При исследовании экспрессии полученного мутанта в штамме *B. subtilis*, не содержащем собственных хромосомных генов субтилилина и нейтральной протеиназы А, было обнаружено существенное снижение уровня секреторной продукции зрелой активной протеиназы *B. cereus* – до 25% от аналогичного показателя для интактной протеиназы в той же системе. Анализ клеточных экстрактов *B. subtilis* зафиксировал накопление непроцессированной формы профермента *B. cereus*, что свидетельствует о нарушении процессинга мутантного протеиназного предшественника. Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменения в структуре пропептида, так же как и нарушения протеолитической активности зрелого фермента, оказывают существенное влияние на последовательность и скорость процессов, связанных с активацией предшественников протеиназ.

Наиболее детально механизм активации проферментов был изучен *in vivo* и *in vitro* на примере протермолитина с присоединенным к N-концевой части полипептидом, состоящим из шести остатков His (His₆-проTLN) [103]. Аналогичная удлиненная форма профермента (His₆-проTLN') была получена также для мутантного протермолитина, содержащего замену Glu143Ala в активном центре фермента. Гены природного и мутантного протермолитина были экспрессированы в клетках *E. coli* под контролем промотора T7. При анализе экстрактов клеток *E. coli*, синтезирующих His₆-проTLN, наряду с высокомолекулярным продуктом (62 кДа), накапливающимся в нерастворимой клеточной фракции и соответствующим His₆-про-

термолизину, была обнаружена процессированная форма (36 кДа), соответствующая зрелому термолизу. В случае с мутантным His₆-проTLN' в клеточных экстрактах не было обнаружено специфического белка, соответствующего зрелому ферменту. Эти результаты предполагают аутокаталитический механизм активации протермолизина *in vivo*.

Для того чтобы выяснить, по какому из двух возможных механизмов (меж- или внутримолекулярному) происходит аутопроцессинг протермолизина, интактный и мутантный проферменты, экстрагированные в денатурирующих условиях (в присутствии 6 М гуанидингидрохлорида) из тел включения, полученных в *E. coli*, были иммобилизованы за счет poly(His)-линкера на Co²⁺-содержащей смоле [103]. Это позволило, во-первых, избежать агрегации, происходящей в растворе в процессе ренатурации проферментов, а во-вторых, создать условия, позволяющие отличить внутримолекулярный процессинг от межмолекулярного. В условиях ренатурации интактный протермолизин количественно превращался в активный зрелый фермент, тогда как протермолизин, содержащий замену в активном центре, оставался в непротермолизованной форме. Полученные результаты строго доказывают аутокаталитическую природу процессинга протермолизина, причем внутримолекулярный механизм в данном случае имеет явное предпочтение, так как концентрация, в которой проферменты были сорбированы на носителе (4–6% теоретической емкости сорбента), сильно ограничивала возможность межмолекулярного взаимодействия.

Хотя аутокаталитический характер активации для всех изученных бактериальных металлопротеиназ можно считать доказанным, существуют данные о получении *in vivo* нативного предшественника металлопротеиназы термофильной бактерии *B. brevis* (семейство Bacillaceae) [104]. Несмотря на сходство по структурно-функциональной организации и субстратной специфичности этого фермента с термолизином, он в отличие от термолизина обнаружил уникальное свойство в условиях гетерологичной экспрессии в *E. coli* сохраняться в растворимой форме в виде непротермолизованного предшественника или стабильного нековалентного неактивного комплекса пропептид–зрелый фермент. По-видимому, эта особенность обусловлена необычно высоким сродством пропептида к зрелой металлопротеиназе (K_i 1.7 нМ при 37°C). В то же время при температуре +65°C происходила активация комплекса пропептид–зрелый фермент, сопровождающаяся полной деградацией пропептида [104].

3.3. Функциональная роль пропептидов металлопротеиназ грамположительных бактерий

Известно, что денатурированный термолизин, подобно субтилизину (см. п. 1.5.), не подвергается спонтанной ренатурации при удалении денатурирующих агентов, а максимальная активность, которую удается обнаружить после ренатурации, составляет менее 2% активности неденатурированного контроля. В работе [105] было показано, что термолизин, денатурированный при кислых значениях pH с помощью гуанидингидрохлорида, может быть ренатурирован *in vitro* с образованием активного фермента с эффективностью до 20% в присутствии собственного пропептида, добавленного в ренатурационный буфер в стехиометрических количествах. Подобный эффект, предполагающий влияние пропептида на фолдинг термолизина *in vitro* обладает специфичностью, поскольку замена пропептида в ренатурационном буфере на бычий сывороточный альбумин не позволяет восстановить ферментативную активность термолизина. Однако проведение ренатурации в присутствии фосфорамидона – конкурентного ингибитора термолизина – повышает выход активного фермента до 65%, вероятно, за счет предотвращения автолиза.

Эксперименты *in vivo* [106] по экспрессии термолизина в клетках *E. coli* в присутствии пропептида (*in trans*) и без него подтвердили, что пропептид термолизина необходим для продукции активного фермента в качестве внутримолекулярного шаперона. Причем, ковалентная связь между пропептидом и протеиназным доменом не обязательна для правильного фолдинга фермента.

В работе [105] было обнаружено, что пропептид термолизина, полученный в клетках *E. coli* и очищенный из растворимой клеточной фракции, способен ингибировать термолизин *in vitro* со значением IC₅₀ 14 нМ. Ингибирование представляется достаточно специфичным, поскольку влияние пропептида термолизина на нейтральную протеиназу *B. stearothermophilus*, аминокислотная последовательность которой совпадает с последовательностью термолизина на 85% в области зрелого фермента и на 50% в области пропептида, оказалось в 16 раз слабее и характеризовалось значением IC₅₀ 220 нМ [105]. В этих же условиях нейтральная Zn²⁺-связывающая эндопептидаза животного происхождения 24.11 [105], обладающая той же субстратной специфичностью, что и термолизин, и имеющая высокую степень структурного сходства с ним в области активного центра, совсем не ингибировалась пропептидом термолизина. При определении кинетических параметров ингибирования оказалось, что пропептид действует как неконкурентный ингибитор термолизина с K_i 6 нМ для взаимодействия про-

Таблица 3. Ингибирование зрелых протеиназ собственными пропептидами (по данным работы [105])

| Фермент | Константа ингибирования, нМ | Тип ингибирования* |
|--|-----------------------------|--------------------|
| Субтилизин Е | 2000 | конкурентный |
| Протеиназа IV из папайи | 860 | н.о. |
| Термолизин | 6.0 | неконкурентный |
| Нейтральная протеиназа из <i>A. fumigatus</i> | 3.0 | н.о. |
| Карбоксипептидаза А | 2.0 | конкурентный |
| Папаин | 1.89 | н.о. |
| Субтилизин BPN' | 1 | конкурентный |
| Катепсин В | 0.4 | н.о. |
| Нейтральная протеиназа из <i>B. brevis</i> [104] | 0.17 | конкурентный |
| α -Литическая протеиназа | 0.1 | конкурентный |

* н.о. – не определялся.

пептида с ферментом и с K_i 20 нМ для взаимодействия пропептида с фермент-субстратным комплексом [105]. Сравнение констант ингибирования свидетельствует о том, что связывание субстрата с термолизином лишь незначительно влияет на сродство ингибитора к ферменту, т.е. основные сайты связывания пропептида с металлопротеиназой находятся вне активного центра. Одно из возможных мест локализации взаимодействий пропептидного ингибитора с термолизином может находиться вблизи двух α -спиральных участков, образованных остатками 255–299 в С-концевом домене термолизина. По крайней мере, в присутствии моноклональных антител, узнающих этот регион в ферменте, значение IC_{50} для ингибирования термолизина пропептидом увеличивается в 15 раз. Полученные значения констант ингибирования согласуются с имеющимися в литературе данными, касающимися ингибирования протеиназ собственными пропептидами (табл. 3), в то время как неконкурентный тип ингибирования, обнаруженный для термолизина, отличается от известных примеров: для пропептидов субтилизина [4, 34], α -литической протеиназы [66] и металлопротеиназы *B. brevis* [104] установлен конкурентный тип ингибирования. В последнем случае [104], ингибирование также является высокоспецифичным, поскольку значение IC_{50} для ингибирования пропептидом металлопротеиназы *B. brevis* родственного фермента из *B. megaterium* было в 16 раз выше, чем в случае гомологичного фермента (12.5 и 0.8 нМ соответственно), в то время как термолизин совсем не ингибируется этим пропептидом [104].

Обычно ингибирующую функцию пропептидов бактериальных протеиназ связывают с предотвращением нежелательного внутриклеточного протеолиза, хотя в случае с термолизином возможно и другое объяснение [101]. Тепловая денатурация термолизина становится необрати-

мой благодаря локальному нарушению пространственной структуры небольшого поверхностного района в менее стабильном N-концевом домене с последующим автолизом фермента [107]. Ионы Ca^{2+} стабилизируют термолизин, предотвращая денатурацию этой поверхностной петли, причем наиболее существенная роль в подобной стабилизации принадлежит иону кальция (Ca^{2+} -3), который связывается с N-концевым доменом термолизина [91, 107]. Аутоактивация молекулы протермолизина происходит по связи Ser-Ile [92], полностью соответствующей специфичности фермента, и осуществляется по внутримолекулярному механизму. Для подобного процессинга профермента необходимы, по крайней мере, два условия: наличие функционально активного центра и локализация остатка Ile1 последовательности зрелого фермента в S'_1 -сайте связывания субстрата. Однако анализ кристаллической структуры термолизина свидетельствует о том, что активный центр расположен на значительном удалении (29 Å) от N-концевого остатка Ile1, что предполагает возможное перемещение N-концевых аминокислотных остатков молекулы зрелого фермента после завершения аутопроцессинга. Вполне вероятно, что только после репозиционирования N-концевого фрагмента термолизина, освободившегося в результате активации профермента, происходит формирование Ca^{2+} -3-связывающего сайта. А пока образование этого сайта не будет завершено, временное ингибирование фермента пропептидом после аутопроцессинга может защищать его от автолиза.

3.4. Функциональная роль пропептида эластазы *P. aeruginosa*

По первичной структуре как в области зрелого фермента, так и в области пропептида эластазы имеет выраженное сходство с металлопротеина-

зами грамположительных микроорганизмов, что позволяло надеяться на общие особенности в принципах структурной организации их предшественников. Тем не менее, в отличие от секреторных протеиназ грамположительных бактерий, для которых характерны короткоживущие предшественники, эластаза в течение некоторого времени до момента секреции через внешнюю мембрану существует в периплазме *P. aeruginosa* в виде устойчивого неактивного комплекса с пропептидом. Это дало возможность выделить указанный комплекс в препаративных количествах и детально охарактеризовать его [108].

Активация нековалентного комплекса пропептид–зрелая эластаза, образующегося в периплазматическом пространстве *P. aeruginosa*, в условиях *in vitro* посредством ограниченного протеолиза трипсином сопровождалась исчезновением пропептида. Зрелая эластаза, секретируемая в культуральную жидкость, ингибируется различными клеточными фракциями *P. aeruginosa*, содержащими пропептид. Подобного ингибирования не наблюдалось в присутствии специфических антител, полученных на пропептид эластазы и препятствующих его связыванию со зрелым ферментом. Зато ингибиторы эластазной активности, такие, как EDTA, 1,10-фенантролин и *N*-(2-меркаптоацетил)Phe-Leu, не препятствовали связыванию пропептида со зрелой эластазой. Кроме того, диссоциации комплекса не наблюдалось после аффинной хроматографии на Gly₃-D-Phe-сефарозе. Эти результаты хорошо согласуются с данными для термолизина о неконкурентном типе его ингибирования собственным пропептидом. Ингибирование, по всей вероятности, является специфичным, так как сходный с эластазой по структуре и субстратной специфичности термолизин не взаимодействует с пропептидом эластазы и не ингибируется клеточными фракциями *P. aeruginosa*, содержащими пропептид [108].

В работах [109, 110] была продемонстрирована существенная роль пропептида эластазы *P. aeruginosa* в образовании функционально активной зрелой протеиназы. Для этого был сконструирован мутантный ген эластазы (*lasB6*) [109], в котором была полностью удалена последовательность, кодирующая пропептид. Таким образом, в рекомбинантном белке сигнальный лидер был непосредственно соединен с последовательностью, соответствующей зрелому ферменту. При экспрессии мутантного гена в гетерологичной системе *E. coli* не было обнаружено функционально активной эластазы, хотя анализ клеточных экстрактов *E. coli* подтвердил наличие специфического 33-кДа-белка, соответствующего зрелому ферменту, в нерастворимой форме [110].

Когда ген, кодирующий препропептид эластазы (*lasB7*), был экспрессирован совместно с му-

тантным геном *lasB6* в клеточной системе *E. coli*, наблюдалось образование активной эластазы, причем уровень протеолитической активности при этом составлял 30% эластазной активности, полученной при экспрессии в *E. coli* интактного гена *lasB*, кодирующего препрофермент [109]. При проведении аналогичного эксперимента по экспрессии *in trans* генов пропептида и зрелой эластазы в штамме *P. aeruginosa*, несущем делецию хромосомного гена *lasB*, эластазная активность, обнаруживаемая в культуральной жидкости, соответствовала активности, полученной при экспрессии в том же штамме интактного гена *lasB*, т.е. эффективность фолдинга эластазы при коэкспрессии с собственным пропептидом в *P. aeruginosa* достигает 100% [109]. В то же время при экспрессии гена *lasB6* в *P. aeruginosa* в отсутствие гена *lasB7* эластазная активность отсутствовала [109, 110].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что пропептид эластазы способствует эффективному фолдингу протеиназы и потому необходим для образования функционально активной, стабильной конформации фермента. Таким образом, пропептид эластазы, подобно пропептидам субтилизина E [34] и α -литической протеиназы [66], может функционировать как внутримолекулярный шаперон, причем шапероноподобная активность пропептида эластазы проявляется *in vivo* и в отсутствие ковалентной связи между пропептидом и протеиназным доменом.

3.5. Роль пропептида в секреции протеиназ

На примере двух Zn²⁺-связывающих металлоэндопептидаз грамотрицательного микроорганизма *P. aeruginosa* – эластазы и протеиназы LasA, впервые было доказано участие пропептида в секреции внеклеточных бактериальных протеиназ через внешнюю мембрану [111].

Первое доказательство существенной роли пропептида в секреции было получено для эластазы при ее экспрессии в отсутствие пропептида в штамме *P. aeruginosa*, несущем делецию хромосомного гена эластазы (*lasB*) [109, 110]. В этом случае неактивная эластаза накапливалась внутри клеток и не секретировалась в культуральную жидкость. Когда ген *lasB7*, кодирующий препропептид эластазы, был коэкспрессирован в клеточной системе *P. aeruginosa* с геном *lasB6*, кодирующим зрелый фермент, наблюдалась эффективная секреция, и активная эластаза обнаруживалась в супернатанте.

Ранее было показано, что секреция эластазы включает несколько стадий [111, 112]. Первичный продукт трансляции гена *lasB* – препроэластаза, секретируется через внутреннюю мембрану, в процессе чего удаляется препептид. Преоэластаза

в периплазматическом пространстве быстро аутопроцессуруется с образованием неактивного комплекса пропептид–зрелая эластаза. Стадия процессинга профермента, очевидно, необходима для секреции эластазы в культуральную жидкость, так как мутация в активном центре эластазы, блокирующая энзиматическую активность и процессинг, блокирует также и секрецию [113]. Секреция эластазы через внешнюю мембрану осуществляется с помощью специального экспортного аппарата (Хср) *P. aeruginosa* в составе нековалентного комплекса со своим пропептидом, который некоторое время существует в культуральной жидкости, а потом гидролизует зрелой эластазой, причем для внеклеточной деградации пропептида не требуется предварительной диссоциации комплекса [111]. Поскольку секреция эластазы зависит от наличия в периплазме ковалентно несвязанного пропептида, можно предположить, что пропептид поддерживает зрелый фермент в конформации, которая узнается секреторным аппаратом Хср. Кроме того, пропептид сам может обеспечивать сигналы, необходимые для секреции.

Еще одной протеиназой, секретлируемой *P. aeruginosa*, является 20-кДа-металлоэндопептидаза LasA, принадлежащая к семейству β-литических протеиназ и обладающая специфичностью к Gly-содержащим последовательностям $-(\text{Gly})_3-$ или $-(\text{Gly})_2-\text{Ala}-$ [114]. Так же как эластаза, протеиназа LasA синтезируется в виде препрофермента с длинным N-концевым пропептидом (22 кДа), который по размеру превышает зрелую протеиназу [115, 116]. Существуют доказательства, что профермент протеиназы LasA не способен к самоактивации. Так, продукт экспрессии в гетерологической системе *E. coli* гена, кодирующего про-LasA, не подвергается аутопроцессингу [115, 116], а замена остатка His активного центра не препятствует процессингу мутантного профермента в *P. aeruginosa* и появлению энзиматически неактивной (вследствие мутации) 20-кДа-протеиназы LasA в культуральной жидкости [114]. Экспорт протеиназы LasA также осуществляется через Хср-систему [111], но, в отличие от эластазы, протеиназа LasA секретруется как непроцессированный 42-кДа-профермент и не образует внутриклеточных процессированных форм, что хорошо согласуется с приведенными выше данными о неспособности про-LasA к аутопроцессингу. Было доказано, что процессинг профермента LasA происходит в культуральной жидкости *P. aeruginosa* с помощью секреторных протеиназ – эластазы и лизинспецифичной протеиназы.

Внеклеточный процессинг осуществляется в две стадии [111]. Сначала отщепляется 14-кДа-фрагмент пропептида, и образуется недопроцессированный интермедиат (28 кДа). Судя по размеру продуктов и специфичности ферментов, ли-

зинспецифичная протеиназа может расщеплять в проферменте связь с участием карбоксильной группы Lys168*, а эластаза распознавать один из остатков Ala, окружающих Lys168 [111]. Оставшийся связанным с LasA C-концевой фрагмент пропептида впоследствии деградируется, как предполагается, при совместном участии эластазы и лизинспецифичной протеиназы. В дальнейшем, аминопептидаза, недавно обнаруженная в культуральной жидкости *P. aeruginosa*, отщепляет по одному оставшиеся остатки пропептида вплоть до первого остатка зрелой протеиназы, за которым следуют два остатка Pro, являющиеся своеобразным стоп-сигналом процессинга.

Тот факт, что отщепление фрагмента пропептида массой 14-кДа, которое можно рассматривать как первую стадию активации профермента LasA, происходит по специфическому сайту и приводит к образованию достаточно стабильных продуктов, позволило авторам работы [111] предположить, что пропептид LasA может состоять из двух функционально различных доменов. Авторы полагают, что один из этих доменов может отвечать за фолдинг и взаимодействие с секреторным аппаратом, а другой функционировать как ингибитор протеиназы LasA. Сходная доменная организация была предложена для пропептида α-литической протеиназы [117].

Таким образом, для эластазы и протеиназы LasA *P. aeruginosa* – представителей класса металлопротеиназ, так же как для других секреторных бактериальных протеиназ, обладающих достаточно большими N-концевыми пропептидами, – субтилизина *E. B. subtilis* [35] и α-литической протеиназы *L. enzymogenes* [118], была обнаружена тесная связь между процессами фолдинга, отщепления пропептида и секреции [109, 110, 113]. Предполагалось, что только правильно структурированные и процессированные протеиназы могут секретироваться в культуральную жидкость [119]. Экспериментальные данные, полученные для эластазы и протеиназы LasA *P. aeruginosa*, позволили впервые предположить, что основную роль в процессе секреции может играть пропептид, взаимодействующий с экспортным аппаратом клетки и обеспечивающий узнавание протеиназы этим аппаратом. Однако феномен протеиназы LasA свидетельствует о том, что аутокаталитическое удаление пропептида нельзя рассматривать как универсальный механизм процессинга для всех типов протеиназ. По всей вероятности, такой механизм наиболее характерен для протеиназ с широкой специфичностью, подобных термолизину, субтилизину, эластазе, α-литической протеиназе, тогда как процессинг проферментов эндопептидаз с узкой специфичностью или предшест-

*Нумерация дана по последовательности препро-LasA, начиная с N-концевого остатка пропептида.

венников экзопептидаз, а также последующий гидролиз их пропептидов, как правило, зависит от гетерологичных эндопептидаз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре охарактеризованы примеры известных в настоящее время предшественников и пропептидов бактериальных секреторных протеиназ, принадлежащих к трем неродственным в структурном отношении группам – субтилизинам, хмотрипсиноподобным и металлозависимым протеиназам. Несмотря на принципиальные различия в первичной и третичной структуре, а также в механизме действия зрелых ферментов, структура и механизмы активации предшественников обнаруживают некоторые общие черты:

– пропептиды имеют молекулярную массу в диапазоне от 8 до 25 кДа против 1–3 кДа у предшественников панкреатических протеиназ;

– в молекуле предшественника пропептиды располагаются между препептидом и зрелым ферментом;

– в тех случаях, когда субстратная специфичность протеиназы достаточно широка, процессинг предшественника, как правило, идет по аутокаталитическому механизму;

– изолированные пропептиды способны образовывать более или менее прочные нековалентные комплексы со зрелыми ферментами, в составе которых зрелый фермент оказывается заингибированным.

К сожалению, набор протеиназ, для которых есть прямые экспериментальные данные о структуре проферментов, крайне ограничен, причем подавляющее большинство из них принадлежат грамположительным микроорганизмам, что не позволяет говорить об универсальности обсуждаемых принципов организации предшественников. Именно поэтому особенно ценными на наш взгляд представляются сравнительные данные о структурной организации проферментов металлопротеиназ *Bacillus* и эластазы *P. aeruginosa*, имеющих сходную структуру зрелых ферментов, но адаптированных к взаимодействию с существенно различающимися секреторными механизмами грамположительных или грамотрицательных хозяев.

В заключение следует отметить, что при рассмотрении перечисленных примеров проферментов удается обнаружить косвенные аргументы в пользу существования функций пропептидов, связанных с секрецией ферментов во внешнюю среду и обеспечением их взаимодействия с клеточными механизмами, ответственными за контроль активации предшественников. Особенно ярко они проиллюстрированы на примере эластазы и протеиназы LasA *P. aeruginosa*. Эти функции могут

иметь важнейшее биологическое значение, а также могут быть использованы в прикладных целях при конструировании штаммов-продуцентов. Однако они лишь в небольшой мере рассматривались авторами ранее опубликованных экспериментальных и обзорных работ, посвященных изучению предшественников протеиназ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 98-04-48168, 99-04-48812 и 00-04-48320).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Simonen M., Palva I.* // *Microbiol. Rev.* 1993. V. 57. P. 109–137.
2. *Eder J., Fersht A.R.* // *Mol. Microbiol.* 1995. V. 16. P. 609–614.
3. *Shinde U.P., Liu J.J., Inouye M.* // *Nature.* 1997. V. 389. P. 520–522.
4. *Hu Z., Haghjoo K., Jordan F.* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 3375–3384.
5. *Handbook of Proteolytic Enzymes / Ed. Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F.* San Diego: Academic Press, 1998.
6. *Siezen R.J., de Vos W.M., Leunissen J.A., Dijkstra B.W.* // *Protein Eng.* 1991. V. 4. P. 719–737.
7. *Stahl M.L., Ferrari E.* // *J. Bacteriol.* 1984. V. 158. P. 411–418.
8. *Chu N.M., Chao Y., Bi R.C.* // *Protein Eng.* 1995. V. 8. P. 211–215.
9. *Wells J.A., Ferrari E., Henner D.J., Estell D.A., Chen E.Y.* // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. P. 7911–7925.
10. *Hirono S., Akagawa H., Mitsui Y., Iitaka Y.* // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 178. P. 389–414.
11. *Jacobs M., Eliasson M., Uhlen M., Flock J.J.* // *Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. P. 8913–8926.
12. *Bode W., Papamokos E., Musil D., Seemueller U., Fritz H.* // *EMBO J.* 1986. V. 5. P. 813–818.
13. *Siezen R.J., Leunissen J.A.* // *Protein Science.* 1997. V. 6. P. 501–523.
14. *Wong S.L., Doi R.H.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 10176–10181.
15. *Sarvas M.* // *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 1986. V. 125. P. 103–125.
16. *Hu Z., Zhu X., Jordan F., Inouye M.* // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 562–569.
17. *Ikemura H., Takagi H., Inouye M.* // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 7859–7864.
18. *Vasantha N., Thompson L.D., Rhodes C., Banner C., Nagle J., Filpula D.* // *J. Bacteriol.* 1984. V. 159. P. 811–819.
19. *Ohta Y., Inouye M.* // *Mol. Microbiol.* 1990. V. 4. P. 295–304.
20. *Ikemura H., Inouye M.* // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 12959–12963.
21. *Shinde U., Inouye M.* // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 252. P. 25–30.

22. Strausberg S., Alexander P., Wang L., Schwarz F., Bryan P. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 8112–8119.
23. Bryan P., Wang L., Hoskins J., Ruvinov S., Strausberg S., Alexander P., Almog O., Gilliland G., Gallagher T. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 10310–10318.
24. Li Y., Inouye M. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 4169–4174.
25. Gallagher T., Gilliland G., Wang L., Bryan P. // *Structure*. 1995. V. 3. P. 907–914.
26. Jain S.C., Shinde U., Li Y., Inouye M., Berman H.M. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. P. 137–144.
27. Li Y., Hu Z., Jordan F., Inouye M. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 25127–25132.
28. Power S.D., Adams R.M., Wells J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 3096–3100.
29. Philipp M., Bender M.L. // *Mol. Cell. Biochem.* 1983. V. 51. P. 5–32.
30. Li Y., Inouye M. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 262. P. 591–594.
31. Carter P., Wells J.A. // *Science*. 1987. V. 237. P. 394–399.
32. Kojima S., Minagawa T., Miura K. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 277. P. 1007–1013.
33. Williams J.W., Morrison J.F. // *Meth. Enzymol.* 1979. V. 63. P. 437–467.
34. Ohta Y., Hojo H., Aimoto S., Kobayashi T., Zhu X., Jordan F., Inouye M. // *Molec. Microbiol.* 1991. V. 5. P. 1507–1510.
35. Shinde U., Inouye M. // *Trends Biochem. Sci.* 1993. V. 18. P. 442–446.
36. Серкина А.В. Предшественники бактериальных секреторных протеиназ: получение и характеристика. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 2000.
37. Anfinsen C.B. // *Science*. 1973. V. 181. P. 223–230.
38. Zhu X.L., Ohta Y., Jordan F., Inouye M. // *Nature*. 1989. V. 339. P. 483–484.
39. Kobayashi T., Inouye M. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. P. 931–933.
40. Fu X., Inouye M., Shinde U. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 16871–16878.
41. Eder J., Rheinnecker M., Fersht A.R. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 18–26.
42. Eder J., Rheinnecker M., Fersht A.R. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 233. P. 293–304.
43. Bryan P., Alexander P., Strausberg S., Schwarz F., Lan W., Gilliland G., Gallagher D.T. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 4937–4945.
44. Laskowski M., Jr., Kato I. // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. V. 49. P. 593–626.
45. Longstaff C., Campbell A.F., Fersht A.R. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 7339–7347.
46. Matsubara M., Kurimoto E., Kojima S., Miura K., Sakai T. // *FEBS Lett.* 1994. V. 342. P. 193–196.
47. Fujinaga M., Delbaere L.T., Brayer G.D., James M.N. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 184. P. 479–502.
48. Lesk A.M., Fordham W.D. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 258. P. 501–537.
49. Sidhu S.S., Borgford T.J. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 257. P. 233–245.
50. Huang K., Lu W., Anderson S., Laskowski M., Jr., James M.N. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. P. 1985–1997.
51. Read R.J., Fujinaga M., Sielecki A.R., James M.N. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 4420–4433.
52. Silen J.L., McGrath C.N., Smith K.R., Agard D.A. // *Gene*. 1988. V. 69. P. 237–244.
53. Yang M.Y., Ferrari E., Henner D.J. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 160. P. 15–21.
54. Nakayama A., Shimada H., Furutani Y., Honjo M. // *J. Biotechnol.* 1992. V. 23. P. 55–69.
55. Takagi M., Imanaka T., Aiba S. // *J. Bacteriol.* 1985. V. 163. P. 824–831.
56. Holland B. // *Trends Microbiol.* 1998. V. 6. P. 388–389.
57. Yanagida N., Uozumi T., Beppu T. // *J. Bacteriol.* 1986. V. 166. P. 937–944.
58. Henderson G., Krygsman P., Liu C.J., Davey C.C., Malek L.T. // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. P. 3778–3784.
59. Silen J.L., Frank D., Fujishige A., Bone R., Agard D.A. // *J. Bacteriol.* 1989. V. 171. P. 1320–1325.
60. Sidhu S.S., Kalmar G.B., Borgford T.J. // *Biochem. Cell Biol.* 1993. V. 71. P. 454–461.
61. Sidhu S.S., Kalmar G.B., Willis L.G., Borgford T.J. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 7594–7600.
62. Stennicke H.R., Birkoft J.J., Breddam K. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. P. 2266–2275.
63. Silen J.L., Agard D.A. // *Nature*. 1989. V. 341. P. 462–464.
64. Baker D., Sohl J.L., Agard D.A. // *Nature*. 1992. V. 356. P. 263–265.
65. Anderson D.E., Peters R.J., Wilk B., Agard D.A. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 4728–4735.
66. Baker D., Silen J.L., Agard D.A. // *Proteins*. 1992. V. 12. P. 339–344.
67. Peters R.J., Shiau A.K., Sohl J.L., Anderson D.E., Tang G., Silen J.L., Agard D.A. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 12058–12067.
68. Kettner C.A., Bone R., Agard D.A., Bachovchin W.W. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 7682–7688.
69. Bode W., Huber R. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 204. P. 433–451.
70. Sohl J.L., Shiau A.K., Rader S.D., Wilk B.J., Agard D.A. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 3894–3902.
71. Baardsnes J., Sidhu S., MacLeod A., Elliott J., Morden D., Watson J., Borgford T. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 3241–3244.
72. Delbaere L.T., Brayer G.D., James M.N. // *Can. J. Biochem.* 1979. V. 57. P. 135–144.
73. Higaki J.N., Evin L.B., Craik C.S. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 9256–9263.
74. Stroud R.M., Kossiakoff A.A., Chambers J.L. // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1977. V. 6. P. 177–193.
75. Hooper N.M. // *FEBS Lett.* 1994. V. 354. P. 1–6.
76. Wetmore D.R., Wong S.L., Roche R.S. // *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. P. 1593–1604.
77. Tran L., Wu X.C., Wong S.L. // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 6364–6372.
78. Fujii M., Takagi M., Imanaka T., Aiba S. // *J. Bacteriol.* 1983. V. 154. P. 831–837.
79. van den Burg B., Enequist H.G., van der Haar M.E., Eijssink V.G., Stulp B.K., Venema G.A. // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 4107–4115.
80. Аваков А.С., Болотин А.П., Сорокин А.В. // *Молекулярн. биол.* 1990. Т. 24. С. 1363–1372.
81. Chang P.C., Kuo T.C., Tsugita A., Lee Y.H. // *Gene*. 1990. V. 88. P. 87–95.
82. Bever R.A., Iglewski B.H. // *J. Bacteriol.* 1988. V. 170. P. 4309–4314.

83. Fukushima J., Yamamoto S., Morihara K., Atsumi Y., Takeuchi H., Kawamoto S., Okuda K. // J. Bacteriol. 1989. V. 171. P. 1698–1704.
84. Pauptit R.A., Karlsson R., Picot D., Jenkins J.A., Niklaus-Reimer A.S., Jansonius J.N. // J. Mol. Biol. 1988. V. 199. P. 525–537.
85. Thayer M.M., Flaherty K.M., McKay D.B. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 2864–2871.
86. Hangauer D.G., Monzingo A.F., Matthews B.W. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 5730–5741.
87. Vriend G., Eijsink V. // J. Comput. Aided. Mol. Des. 1993. V. 7. P. 367–396.
88. Signor G., Vita C., Fontana A., Frigerio F., Bolognesi M., Toma S., Gianna R., De Gregoriis E., Grandi G. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 189. P. 221–227.
89. Tsuru D., Imajo S., Morikawa S., Yoshimoto T., Ishiguro M. // J. Biochem. (Tokyo). 1993. V. 113. P. 101–105.
90. Beaumont A., O'Donohue M.J., Paredes N., Rousset N., Assicot M., Bohuon C., Fournie-Zaluski M.C., Roques B.P. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 16803–16808.
91. Corbett R.J., Ahmad F., Roche R.S. // Biochem. Cell Biol. 1986. V. 64. P. 953–961.
92. O'Donohue M.J., Roques B.P., Beaumont A. // Biochem. J. 1994. V. 300. P. 599–603.
93. Chang P.C., Lee Y.H. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 3952–3958.
94. Werb Z., Banda M.J., McKerrow J.H., Sandhaus R.A. // J. Invest. Dermatol. 1982. V. 79. P. 154–159.
95. Heck L.W., Morihara K., McRae W.B., Miller E.J. // Infect. Immun. 1986. V. 51. P. 115–118.
96. Heck L.W., Alarcon P.G., Kulhavy R.M., Morihara K., Russell M.W., Mestecky J.F. // J. Immunol. 1990. V. 144. P. 2253–2257.
97. Morihara K., Tsuzuki H., Oda K. // Infect. Immun. 1979. V. 24. P. 188–193.
98. Schultz D.R., Miller K.D. // Infect. Immun. 1974. V. 10. P. 128–135.
99. Kessler E., Safrin M. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 5241–5247.
100. Toma S., Campagnoli S., De Gregoriis E., Gianna R., Margarit I., Zamai M., Grandi G. // Protein Eng. 1989. V. 2. P. 359–364.
101. Marie-Claire C., Roques B.P., Beaumont A. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 5697–5701.
102. McIver K., Kessler E., Ohman D.E. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 7781–7789.
103. Wetmore D.R., Wong S.L., Roche R.S. // Mol. Microbiol. 1994. V. 12. P. 747–759.
104. Serkina A.V., Gorozhankina T.F., Shevelev A.B., Chestukhina G.G. // FEBS Lett. 1999. V. 456. P. 215–219.
105. O'Donohue M.J., Beaumont A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 26477–26481.
106. Marie-Claire C., Ruffet E., Beaumont A., Roques B.P. // J. Mol. Biol. 1999. V. 285. P. 1911–1915.
107. Eijsink V.G., Veltman O.R., Aukema W., Vriend G., Venema G. // Nat. Struct. Biol. 1995. V. 2. P. 374–379.
108. Kessler E., Safrin M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 22726–22731.
109. McIver K.S., Kessler E., Olson J., Ohman D.E. // Mol. Microbiol. 1995. V. 18. P. 877–889.
110. Braun P., Tommassen J., Filloux A. // Mol. Microbiol. 1996. V. 19. P. 297–306.
111. Kessler E., Safrin M., Gustin J.K., Ohman D.E. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 30225–30231.
112. Kessler E., Safrin M. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 1215–1219.
113. McIver K.S., Olson J.C., Ohman D.E. // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 4008–4015.
114. Kessler E. // Meth. Enzymol. 1995. V. 248. P. 740–756.
115. Schad P.A., Iglewski B.H. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 2784–2789.
116. Gustin J.K., Kessler E., Ohman D.E. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 6608–6617.
117. Epstein D.M., Wensink P.C. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 16586–16590.
118. Fujishige A., Smith K.R., Silen J.L., Agard D.A. // J. Cell Biol. 1992. V. 118. P. 33–42.
119. Taylor M.A., Baker K.C., Briggs G.S., Connerton I.F., Cummings N.J., Pratt K.A., Revell D.F., Freedman R.B., Goodenough P.W. // Protein Eng. 1995. V. 8. P. 59–62.

Structure and Functions of Precursors of Bacterial Proteases

A. V. Serkina[#], A. B. Shevelev, and G. G. Chestukhina

All-Russia Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms GosNIIGenetika,
Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia

The data on the precursors of bacterial proteases were generalized. The structure and special features of processing of the precursors of bacillary subtilisins, the α -lytic protease from *Lysobacter enzymogenes* and the related chymotrypsin-like proteases from *Streptomyces griseus*, and the metalloproteases from bacilli and *Pseudomonas aeruginosa* were discussed. The approaches to producing the precursors and the protease propeptides and to *in vitro* characterizing them were particularly analyzed. The following physiological functions of the propeptides within the protease precursors were considered probable: (a) inhibition of the proteases to protect the host cells from the proteolytic damage; (b) participation in the folding of the mature enzyme; and (c) providing for the protease interaction with the bacterial cell surveillance mechanisms, including protease translocation through the cell wall. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: folding, inhibition, processing, proenzyme, propeptide, secretion

[#]To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 315-3738; fax: +7 (095) 315-0501; e-mail: serkina@rocketmail.com.