

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ В БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 157.152.3

© Коллектив авторов

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ *B. LICHENIFORMIS* И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ПРОЦЕССИНГА *IN VITRO*

А.В. СЕРКИНА¹, А.М. БУШУЕВА¹, Г.Г. ЧЕСТУХИНА¹, Й. ГУМПЕРТ²,
К. ХОЙШЕН², М. КУЯУ², А.Б. ШЕВЕЛЕВ¹

¹ Лаборатория химии белка им. В.М. Степанова, Институт Генетики и Селекции Промышленных Микроорганизмов, 113545 Москва, 1 Дорожный пр., 1, тел. (095) 315-37-38, факс (095) 315-05-01, эл. почта: serkina@rocketmail.com
тел: 49 (03641) 656305/06, факс: 49 (03641) 656310,
эл. почта: hoischen@imb-jena.de.

² Исследовательская группа клеточной биологии прохариотов Институт молекулярной биотехнологии, Йена, Д-07708, Германия

Разработана оригинальная экспрессионная система на основе L-форм *Proteus mirabilis*, позволившая впервые получить в нативной форме предшественник глутамилэндопептидазы *Bacillus licheniformis*. Полученный предшественник проявлял стабильность при длительной инкубации в физиологических условиях, а также в присутствии трипсина и глутамилэндопептидазы *B. intermedius*. Под действием бактериальных металлоэндопептидаз и субтилизина он количественно конвертировался в зрелую форму. Полученная в результате активации *in vitro* зрелая глутамилэндопептидаза была выделена с помощью аффинной хроматографии на бацитрацин-сефарозе. Наличие у очищенной глутамилэндопептидазы специфической ферментативной активности по хромогенному пептидному субстрату подтверждает нативность его структуры.

Ключевые слова: препептид, пропептид, секреция, L-формы, субтилизин, *Proteus mirabilis*

Сокращения: ПААГ – полиакриламидный гель, ТХУ – трихлоруксусная кислота, Gse – глутамилэндопептидаза (глутамил-специфичная эндопептидаза), GseBI – глутамилэндопептидаза *B. intermedius*, GseBL – глутамилэндопептидаза *B. licheniformis*, IPTG – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид, pNA – п-нитроанилидная группа, SDS – додецилсульфат натрия, Z – бензилоксикарбонильная группа.

ВВЕДЕНИЕ. Большинство охарактеризованных к настоящему времени протеаз из различных источников первоначально синтезируются в виде каталитически не активных предшественников - проферментов, в молекулах которых после секреторного лидера (препептида) содержится активационный пептид (пропептид). Известно, что активация предшественников, приводящая к появлению протеолитической активности, сопровождается отщеплением и деградацией соответствующих пропептидов. В отличие от препептидов, обеспечивающих транспорт белка через плазматическую мембрану, функциональная роль пропептидов до конца не установлена.

Обычно выделить предшественники непосредственно из природного продуцента не представляется возможным, так как они чрезвычайно нестабильны и быстро процессируются с образованием зрелой формы, которая может быть обнаружена в культуральной жидкости. Обычно предшественники столь же нестабильны и в гетерологичных клеточных системах. Тем не менее, в настоящее время существует несколько моделей, позволяющих изучать предшественники протеаз косвенными методами [1, 2].

Глутамилэндопептидаза *B. licheniformis* (GseBL), являющаяся представителем недавно открытого и немногочисленного подсемейства глутамил-специфичных сериновых протеаз, вследствие своей узкой субстратной специфичности и полного несоответствия сайта процессинга профермента (Lys-Ser) специфичности глутамилэндопептидаз, предпочитающих остаток Glu в P1 положении, выглядит достаточно удобным объектом для получения этого фермента в виде непроецессированного предшественника. Представители подсемейства глутамил-специфичных протеаз (Gse), включающего V8 протеазу *Staphylococcus aureus* [3], Gse из *Actinomyces spp.* [4], *Thermoactinomyces species* [5], *S. thermovulgaris* [6], *S. griseus* [7], *B. intermedius* [8], *B. licheniformis* [9] и некоторые другие, отдаленно родственны химотрипсину животных, в то время как их пропептиды принципиально отличаются от пропептидов панкреатических химотрипсиноподобных ферментов и по размеру больше похожи на пропептиды секреторных бактериальных протеаз. Препептид Gse *B. licheniformis* состоит из 94 аминокислотных остатков (а.о.) в то время как последовательность зрелого фермента насчитывает 222 [10]. Природный сайт процессинга препептида в предшественнике GseBL неизвестен.

В настоящей работе предложена оригинальная секреторная система на основе стабильных L-форм *P. mirabilis*, позволяющая получать нативный предшественник GseBL. L-формы, лишенные характерной для грам-отрицательных микроорганизмов внешней мембраны, известны способностью обеспечивать наиболее благоприятные условия для фолдинга широкого спектра различных белков и пептидов [11, 12]. Разработанная система позволила выделить предшественник GseBL в нативной форме и изучить его способность к активации *in vitro*.

МЕТОДИКА. Бактериальные штаммы и среды для их культивирования. В качестве основного хозяина для проведения экспрессии использовали штамм LVI *P. mirabilis*, поддерживающийся в виде стабильных, полностью лишенных клеточной стенки L-форм на протяжении нескольких лет [13]. В качестве источника гена *gseBL* использовали *Bacillus licheniformis* штамм ВКПМ В-6839, представляющий собой природный изолят, отобранный по признаку высокой хитиноподобной активности [14]. При подборе

олигонуклеотидных праймеров, предназначенных для ПЦР-амплификации *gseBL*, пользовались ранее опубликованной последовательностью [10].

Для поддержания L-форм *P. mirabilis* использовали жидкую среду FB (институт Молекулярной Биотехнологии, Йена, Германия) на основе мясного бульона с добавлением 1% сахарозы и 0,5% дрожжевого экстракта [15]. При поддержании клеток L-форм *P. mirabilis* на чашках использовали ту же формулу среды с добавлением 1% агара и 8% инактивированной лошадиной сыворотки (Flow Laboratories).

Плазмиды и олигонуклеотидные праймеры

В качестве источника ДНК, кодирующей секреторный лидерный пептид щелочной фосфатазы *E. coli* (*phoA*), использовали ранее описанную плазмиду pSMUK9 [15] на основе вектора pUKtg131, предоставленную М. Матцем. В качестве источника секреторного лидерного пептида стафилокиназы (*sak*) *S. aureus* использовали конструкцию pSIS2sak [16], предоставленную Ш. Зибеном.

Для амплификации фрагмента гена *phoA* был синтезирован праймер РНО-А, специфичный к его 5'-концевой части (табл. 1). Для амплификации фрагмента гена *sak* был синтезирован праймер SPY, специфичный к его 5'-концевой части. Для амплификации *gseBL* использовали праймер GapTH, отжигающийся в 3'-фланкирующей области гена. Для слияния кодирующей области *gseBL* с лидерными пептидами использовали бифункциональные праймеры:

1. праймер Jnc-FP про-GseBL с PhoA
2. праймер Jnc-FM про-GseBL с Sak
3. праймер Jnc-SP зрелый GseBL с PhoA
4. праймер Jnc-SM зрелый GseBL с Sak

Таблица 1. Праймеры, использованные при конструировании химерных вариантов гена *gseBL*, слитых с последовательностями лидерных пептидов щелочной фосфатазы (PhoA) и стафилокиназы (Sak)

Название	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
PhoA	GGG GGA TCC GTG GAG AAA ATA AAG TG
SPY	CGC GAA TTC AGG AGG CTT CAT ATG CTC AAA AGA AGT TTA TTA TTT TTA ACT
GAPTH	CCC AAG CTT CGT GTA TTA TTG TGC
JNC-SP	A TGA AGG ATC GCT TGA TGC ACT TAC CTC ATT AGT
JNC-SM	C AGA ACC AAT CAC CGA TGC GGC TTT TGT CAC AGG
JNC-FP	A TGA AGG ATC GCT TGA TGC GGC TTT TGT CAC AGG
JNC-FM	C AGA TCC AAT CAC CGA TGC ACT TAC CTC ATT AGT

Сборка и секвенирование генных конструкций

Искусственные химерные гены, кодирующие зрелую или про-GseBL, слитую с секреторным лидерным пептидом PhoA, получали с помощью трехпраймерной схемы ПЦР. Для этого на первой стадии получали амплификаты, кодирующие PhoA с парами праймеров Jnc-FP плюс РНО-А и Jnc-FM плюс РНО-А. Полученные амплификаты очищали элюцией из геля с помощью кита Bio101 (Bio101, США) и в качестве мегапраймеров в паре с праймером GapTH вводили в реакцию ПЦР-амплификации последовательности *gseBL* на матрице геномной ДНК *B. licheniformis* ВКПМ В-6839. Полученные амплифицированные фрагменты очищали элюцией из геля, полностью расщепляли по сайтам BamHI и HindIII и

клонировали в одноименные сайты стандартного вектора pUC19 (Pharmacia, Швеция). Отобранные в итоге конструкции получили названия pFP1 и pFM1 (табл. 2).

Таблица 2. Плазмидные конструкции, использованные в работе

Название	Вектор	Описание основного гена	Препетид	Промотор	Устойчивость
pFP1	pUC19	про-GseBL	PhoA	нет	Ap
pFM1	pUC19	зрелая GseBL	PhoA	нет	Ap
pSP1	pUC19	про-GseBL	Sak	нет	Ap
pSM1	pUC19	зрелая GseBL	Sak	нет	Ap
pFPS1	pSIS2	про-GseBL	PhoA	lac-tac	Ap, Km
pFMS1	pSIS2	зрелая GseBL	PhoA	lac-tac	Ap, Km
pSPS1	pSIS2	про-GseBL	Sak	lac-tac	Ap, Km
pSMS1	pSIS2	зрелая GseBL	Sak	lac-tac	Ap, Km

Примечание: Ap - ампицилин, Km - канамицин

По аналогичной схеме получали гены, кодирующие зрелую или про-GseBL, слитую с секреторным лидерным пептидом Sak. Для этого на первой стадии получали амплификаты, кодирующие Sak с парами праймеров Jnc-SP плюс SPY и Jnc-SM плюс SPY. Полученные амплификаты очищали элюцией из геля с помощью кита Bio101 и в качестве мегапраймеров в паре с праймером GarTH вводили в реакцию ПЦР-амплификации последовательности *gseBL* на матрице геномной ДНК *B. licheniformis* ВКПМ В-6839. Полученные амплифицированные фрагменты очищали элюцией из геля, полностью расщепляли по сайтам *EcoRI* и *HindIII* и клонировали в одноименные сайты стандартного вектора pUC19 (Pharmacia). Отобранные в итоге конструкции получили названия pSP1 и pSM1 (табл. 2).

Все описанные выше конструкции содержали вставки химерных вариантов гена *gseBL* в ориентации, противоположной *pLacZ*, что исключало их неконтролируемую экспрессию. ДНК каждой вставки в каждой из четырех конструкций pFP1, pFM1, pSP1 и pSM1 были полностью секвенированы с помощью автоматического секвенатора Applied Biosystems для доказательства их соответствия ожидаемой структуре.

Для получения экспрессионных конструкций вставки каждой из плазмид pFP1, pFM1, pSP1 и pSM1 были выщеплены по фланкирующим сайтам рестриктаз *EcoRI* и *HindIII*, очищены элюцией из геля и клонированы в одноименные сайты вектора pSIS2, несущего IPTG-зависимый *lac-tac* промотор и ген репрессора *lacI*. Полученные в результате этого экспрессионные конструкции получили названия pFPS1, pFMS1, pSPS1 и pSMS1 соответственно (таблица 2).

Трансформация L-forms и адаптация полученных трансформантов к росту на агаризованной и жидкой среде

Трансформацию *P. mirabilis* штамма LVI проводили по ранее описанной методике [13, 15]. Суспензию трансформантов высевали на агаризованную среду FB, содержащую лошадиную сыворотку и 10, 20 и 30 мкг/мл канамицина. Как рекомендовано в работах [11, 12], появившиеся клоны трансформантов адаптировали к росту в начале на агаризованной, а затем на жидкой среде, проводя по 3-20 ежедневных пересевов на плотных и жидких средах, содержащих 30 мкг/мл канамицина. Лишь после этого культуры, восстановившие способность

к быстрому росту, использовали для экспериментов по ферментации. Для подтверждения интактности вставок ДНК во введенных конструкциях по окончании процедуры адаптации из каждой культуры выделяли плазмидную ДНК и проводили ее рестриктазное картирование по сайтам *HindIII* и *EcoRI*. При этом была доказана полная сегрегационная и структурная стабильность введенных плазмид в рекомбинантных штаммах L-форм *P. mirabilis*.

Ферментация и определение содержания GseBL

Адаптированные культуры трансформантов L-форм *P. mirabilis* LVI, несущие конструкции rFPS1, rFMS1, rSPS1 и rSMS1, засеивали в 30 мл свежей среды FB с добавлением 30 мкг/мл канамицина и выращивали в условиях умеренной аэрации (200 об/мин) на лабораторной качалке в специальных стеклянных емкостях при 30°C в течение 6 часов. После этого в среду добавляли стерильный водный 0,5 М раствор IPTG до конечной концентрации в среде 5 мМ и продолжали культивирование в прежних условиях в течение 20-26 часов.

Культуру охлаждали, осаждали клетки центрифугированием в течение 15 мин при 10000 g при +4°C. Фракцию культуральной жидкости отделяли и лиофильно высушивали.

По ходу ферментации периодически отбирали пробы культуры объемом 500 мкл, которые анализировали с помощью Вестерн-блоттинга. Для этого клетки отделяли центрифугированием на настольной центрифуге в течение 10 мин. Суммарную фракцию белков культуральной жидкости осаждали добавлением ТХУ до конечной концентрации 7%. Осадок целых клеток или осажденную внеклеточную фракцию солибилизировали в денатурирующем буфере Лэммли для подготовки образцов [17] и подвергали SDS-электрофорезу в ПААГ. Белки из геля с помощью электроблоттинга переносили на мембрану PVDF (Millipore, США). Мембраны с перенесенными на них белками блокировали от неспецифического связывания в 0,3% растворе желатина, окрашивали специфической кроличьей сывороткой, полученной против природной зрелой GseBL. Связывание антител визуализировали антивидовым конъюгатом со щелочной фосфатазой и субстратным китом BCIP/NBT (BioRad, США). В качестве отрицательного контроля использовали культуральную жидкость исходного штамма LVI L-форм *P. mirabilis* [12], не несущего каких-либо плазмид. В качестве положительного контроля использовали GseBL, выделенный из рекомбинантного продуцента этого фермента на основе *B. subtilis* [18].

Активация предшественника GseBL экзогенными протеазами

Для активации использовали: бычий трипсин и термолизин (Serva, Германия); металлопротеазу *B. megaterium* и субтилизин 72 из *B. licheniformis*, очищенные как описано ранее [19]; зрелые GseBL и GseBI, очищенные до гомогенного состояния из рекомбинантных штаммов *B. subtilis* с помощью аффинной хроматографии на бацитрацин-сефарозе и ионно-обменной хроматографии в режиме FPLC на колонке MonoQ [18].

Образцы лиофилизированной культуральной жидкости L-форм, содержащих приблизительно 50 мг про-GseBL, растворяли в 1 мл буфера А (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 1 мМ CaCl₂). Нерастворившийся остаток удаляли центрифугированием.

Активирующие ферменты добавляли к аликвотам (200 мкл) полученного раствора (табл. 3) и инкубировали 1,5 часа при 37°C. Для контроля стабильности про-GseBL в условиях эксперимента аликвота препарата параллельно инкубировалась без добавления фермента.

Таблица 3. Активация про-GseBL экзогенными протеазами

Фермент	Концентрация (мкг/мл)	Эффект
субтилизин	1	ступенчатая активация
термолизин	10	полная активация
трипсин	20	нет активации
GseBI	5	нет активации
металлопротеаза <i>B. megaterium</i>	2	полная активация
металлопротеаза <i>B. megaterium</i>	20	полная активация

Аффинная хроматография активированной *in vitro* GseBL

100 мг лиофилизированного препарата культуральной жидкости L-форм, содержащей про-GseBL растворяли в буфере А в концентрации 10 мг/мл, добавляли металлопротеазу *B. megaterium* в массовом соотношении с 10:1 и инкубировали 1,5 часа при 37°C. Для ингибирования активирующей металлопротеазы добавляли фосфорамидон 17 мкМ (в конечной концентрации) и инкубировали смесь в течение 30 мин при комнатной температуре, как описано ранее [20]. Реакционную смесь наносили на колонку объемом 5 мл, содержащую бацитрацин-сефарозу, уравновешенную буфером А [21]. Колонку промывали 50 мл буфера А. Элюцию проводили буфером А, содержащим дополнительно 1 М NaCl и 25% изопропанола. Собранные фракции анализировали методом Вестерн-блоттинга. Активированная GseBL, очищенная от металлопротеазы и компонентов культуральной жидкости L-форм, находилась во фракции, полученной в результате элюции.

Измерение ферментативной активности

Активность очищенной GseBL измеряли по отношению к хромогенному синтетическому субстрату Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNA как описано ранее [22] при концентрации субстрата 200 мкМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Распространенным подходом, используемым для создания оптимальных условий формирования третичной структуры белков, синтезируемых гетерологичными продуцентами, является введение в их состав сигналов транспорта за пределы цитоплазмы [15, 16]. Природные секреторные лидерные пептиды белков из грамположительных бактерий нередко оказываются недостаточно эффективны в граммотрицательных хозяевах [15]. Поэтому, чтобы обеспечить секрецию бациллярного фермента GseBL из клеток L-форм *P. mirabilis*, ее собственный лидерный пептид на уровне гена был заменен на препептид периплазматической щелочной фосфатазы *E. coli* (PhoA) или стафилокиназы *Staphylococcus aureus* (Sak), которые, как было показано ранее, функциональны в выбранной экспрессионной системе [15, 16].

Точка процессинга препептида GseBL в природном хозяине не может быть установлена прямыми методами, поскольку образующийся после отделения препептида профермент немедленно подвергается активации и не может быть зафиксирован. При конструировании искусственных вариантов гена *gseBL* гетерологичные лидеры PhoA (в конструкции pFPS1) или Sak (в конструкции pSPS1) присоединяли к последовательности природного GseBL так, что первые 38 а.о. с N-конца препрофермента, предположительно соответствовавших препептиду, были deletированы (рис. 1). Кроме того, были получены конструкции pFMS1 (лидер PhoA) и pSMS1 (лидер Sak), в которых гетерологичные секреторные лидеры непосредственно соединялись с последовательностью зрелой GseBL.

(A)

GGATCCGTGGAGAAAATAAAGTGAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTACTGTTTACCCTGT
M K Q S T I A L A L L P L L F T P V
GACAAAAGCCGCATCAAGCGATCCTTCATACAAAGCGGAAACATCGGTTACTTATGACCC
T K A A S S D P S Y K A E T S V T Y D P
AAACATTAAGAGTGATCAATACGGCTTGTATTCAAAGCGTTTACAGGCACCGGCAAAGT
N I K S D Q Y G L Y S K A F T G T G K V
GAATGAAACAAAGGAAAAAGCGGAAAAAAGTCACCCGCCAAAGTCTTACAGCATTA
N E T K E K A E K K S P A K A P Y S I K
ATCGGTGATTGGTTCTGATGATCGGACAAGGGTCACCAACACAACCGCATATCCGTACA
↓ S V I G S D D R T R V T N T T A Y P Y

(B)

ATATTATATTTGGAGGAAGCGCCATGCTCAAAGAAGTTTATTATTTTAACTGTTTATTGTTATTATTCTCATTTC
M L K R S L L F L T V L L L L F S F S
TCAATTACTAATGAGGTAAGTGCATCAAGCGATCCTTCATACAAAGCGGAAACATCGGTTACTTATGACCCAAAC
S I T N E V S A S S D P S Y K A E T S V T Y D P N

Рисунок 1.

Нуклеотидная последовательность модифицированного гена *gseBL* в конструкции рFP (A) и рSP (B). Последовательности секреторных лидерных пептидов Sak и PhoA подчеркнуты. Природный сайт процессинга пропептида GseBL обозначен символом ↓.

Экспрессионные конструкции с модифицированными формами гена *gseBL* были собраны на основе вектора рSIS2, специально разработанного для клонирования и экспрессии в клетках L-форм *P. mirabilis*. Он содержал детерминанты устойчивости к канамицину и ампицилину, гибридный IPTG-зависимый промотор *lac-tac*, множественный сайт клонирования и ген репрессора лактозного оперона *lacI*. Последний элемент имеет особое значение при использовании вектора в клетках *P. mirabilis*, не имеющих собственного лактозного оперона, и неспособных осуществлять репрессию искусственно введенных производных рLac.

Получение и активация предшественника GseBL

Рекомбинантные клоны, несущие модифицированные производные, кодирующие про-GseBL, были выращены в условиях индукции IPTG как описано в разделе "Методика". После оптимизации условий экспрессии модифицированных генов *gseBL* в клетках L-форм *P. mirabilis* оказалось, что оба лидерных препептида, несмотря на различия в структуре и происхождении, примерно с равной эффективностью способны обеспечивать секрецию GseBL в культуральную жидкость L-форм в виде предшественника. Несекретированных форм GseBL во внутриклеточной фракции обнаружено не было.

По данным иммуноблоттинга секретированный предшественник имеет молекулярную массу ~30 кДа (рис. 2), что хорошо совпадает с теоретически предсказанной молекулярной массой про-GseBL (30,507 кДа). Полученный профермент был вполне стабилен при физиологических условиях и не проявлял тенденции к образованию зрелой формы или деградации даже при длительной инкубации (48-72 часа) в культуральной жидкости L-форм (рис. 2).

В то же время, в шести независимых экспериментах, проведенных в оптимизированных условиях экспрессии с клонами, предназначенными для непосредственного получения зрелой GseBL (конструкции рFMS1 и рSMS1), не удалось получить детектируемых количеств иммуноположительного продукта ни в культуральной жидкости, ни во внутриклеточной фракции бактерий. Подобный

результат может отражать существенную роль пропептида GseBL в фолдинге фермента *in vivo* или его секреции.

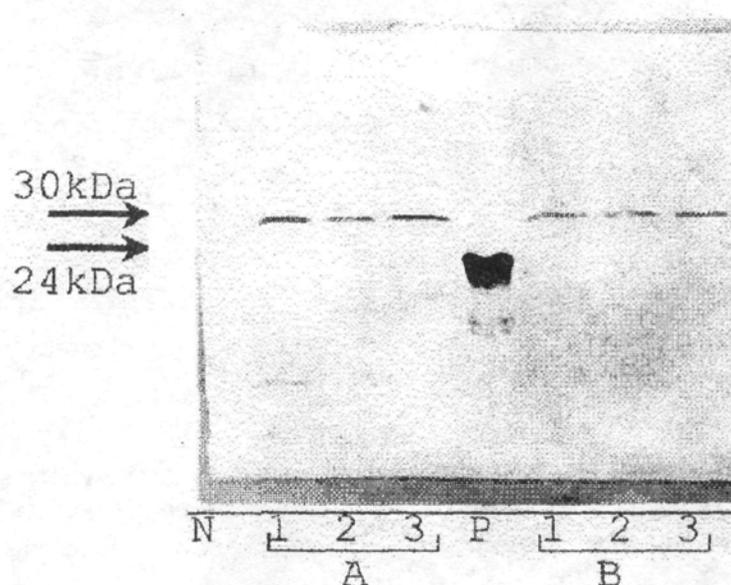


Рисунок 2.

Кинетика накопления про-GseBL в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов L-форм *P. mirabilis*. Белки перенесены на фильтры PVDF после денатурирующего электрофореза в ПААГ и окрашены антисывороткой против зрелой GseBL и антивидовым конъюгатом со щелочной фосфатазой. На дорожки нанесены образцы культуральной жидкости: (N) отрицательный контроль - бесплазмидный штамм *P. mirabilis* LVI; (A) - LVI (pSPS1); (B) - LVI (pFPS1), полученные после ферментации в течение (1) - 24 часов; (2) - 48 часов и (3) - 72 часов; (P) положительный контроль - зрелая GseBL из рекомбинантного продуцента на основе *B. subtilis*.

Для доказательства нативности пространственной структуры полученного предшественника GseBL были проведены эксперименты по его активации различными протеазами. Было установлено, что профермент GseBL эффективно процессируется с образованием иммуноспецифического продукта с $M_r \sim 24$ кДа, соответствующего зрелому ферменту GseBL, под действием субтилизина, термолизина, металлопротеазы *B. megaterium* (рис. 3). В то же время трипсин и глутамилэндопептидаза *B. intermedius* (GseBI), сходная с GseBL по своим энзиматическим характеристикам и первичной структуре, оставляют предшественник интактным (рис. 3). Тот факт, что трипсин, единственный из всех использованных для активации ферментов, чья субстратная специфичность точно соответствовала сайту процессинга профермента GseBL, не способствует образованию зрелой формы, позволяет предположить, что ковалентная связь Lys-Ser, разрыв которой обуславливает активацию предшественника, не является легко доступной в молекуле профермента GseBL и (или) процессинг происходит ступенчато, через промежуточные формы (интермедиаты), образование которых требует более широкой специфичности, чем у трипсина. Образование подобных интермедиатов с молекулярной массой, промежуточной между про-GseBL и ее зрелой формой, можно наблюдать при активации про-GseBL субтилизином (рис. 3).

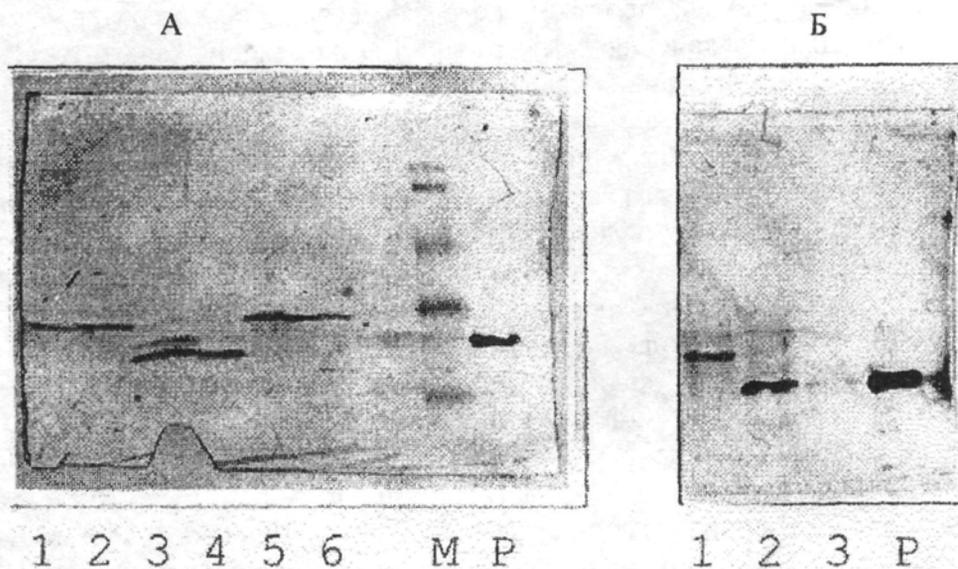


Рисунок 3

Активация про-GseBL экзогенными протеазами

Белки перенесены на фильтры PVDF после денатурирующего электрофореза в ПААГ и окрашены антисывороткой против зрелой GseBL и антивидовым конъюгатом со щелочной фосфатазой. На дорожки нанесены препараты культуральной жидкости LVI (pFPS1) после обработки в течение 1,5 часов при 37°C следующими протеазами:

А. (1) исходный препарат (2) препарат, инкубированный при 37°C без протеазы; (3) субтилизин; (4) термолизин; (5) трипсин; (6) GseBI; (M) стандарт молекулярной массы 102, 78, 49,5, 34,2, 28,3 и 19,9 кДа (BioRad prestained kit); (P) положительный контроль - зрелая GseBL из рекомбинантного продуцента на основе *B. subtilis*.

Б. (1) исходный препарат про-GseBL (лиофилизованная культуральная жидкость pFPS1); (2) препарат про-GseBL (pFPS1) после инкубации при 37°C в присутствии 0,4 мкг металлопротеазы *B. megaterium*; (3) препарат про-GseBL после инкубации при 37°C с 4 мкг металлопротеазы *B. megaterium*; (P) положительный контроль - зрелая GseBL из рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

Очистка активированной GseBL

Наличие протеолитической активности у зрелой формы GseBL, образующейся в результате процессинга *in vitro*, может расцениваться в качестве строгого доказательства как нативности третичной структуры полученного предшественника, так и его правильной активации экзогенными протеазами. Поскольку эксперименты по активации предшественника GseBL проводились либо непосредственно с культуральной жидкостью L-форм, либо с ее лиофилизованным препаратом, процедура измерения активности сильно усложнялась вследствие интенсивной окраски исходного препарата. Кроме того, использованные для активации ферменты способны повреждать синтетический пептидный субстрат Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNA, который применялся для измерения активности GseBL. Поэтому продукты активации предшественника GseBL одним из апробированных ферментов, мегатерином, выделяли на бацитрацин-сефарозе (рис. 3Б) - аффинном сорбенте, широко применяемом для очистки протеаз, в частности, глутамилэндопептидаз [21]. Это позволило, во-первых, избавиться от примесей пигментов и неспецифических белков, содержащихся в культуральной

жидкости L-форм *P. mirabilis*, а во-вторых, отделить активированный зрелый GseBL от активирующей протеазы, которая могла препятствовать измерению активности. Для увеличения эффективности разделения зрелого GseBL и мегатерина хроматографию проводили в присутствии специфического ингибитора металлопротеаз - фосфорамидона, который препятствовал связыванию мегатерина с аффинным сорбентом. Фракция GseBL, элюированная с бацитрацин-сефарозы обнаруживала единственную иммуноположительную полосу (~24 кДа), соответствующую зрелой форме, и проявляла специфическую активность к синтетическому субстрату Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNA, сравнимую с активностью GseBL из природного продуцента.

Таким образом, в ходе экспериментов по экспрессии модифицированных вариантов гена *gseBL*, кодирующего профермент глутамилэндопептидазы *B. licheniformis* в клетках L-форм *P. mirabilis*, было обнаружено, что данный хозяин позволяет успешно решить проблему получения непротессированного предшественника в нативной растворимой форме. Предполагается, что реализация поставленной задачи обусловлена уникальной способностью L-форм, лишенных внешней мембраны и клеточной стенки, сочетать разработанные для *E. coli* системы транскрипции и трансляции с возможностью секреции гетерологичного продукта непосредственно во внешнюю среду. Одновременно необходимо отметить, что получение растворимого предшественника GseBL было бы невозможно в случае его немедленной аутоактивации подобно предшественникам субтилизина, термолизина и α -литической протеазы *L. enzymogenes* [23-26]. Несоответствие между сайтом процессинга пропептида и типом первичной субстратной специфичности глутамилэндопептидазы *B. licheniformis* также не позволяет настаивать на аутокаталитическом механизме активации ее предшественника.

Разработанная система дает возможность получать препаративные количества про-GseBL, что создает необходимые предпосылки для проведения дальнейших исследований в области изучения функциональной роли предшественника этой протеазы и предшественников секреторных белков бацилл в целом.

Авторы признательны д-ру Г. Ниакатуре за секвенирование генных конструкций, полученных в данной работе, д-ру Ш. Зибену за предоставленные конструкции pSIS2 и pSIS2sak, д-ру Н.М. Ивановой за предоставленные препараты металлопротеазы *B. megaterium* и GseBL. Мы благодарим также Г. Эльске за помощь в работе с L-формами.

Работа была частично поддержана грантами РФФИ №00-04-320, №99-04-48812 и № 00-04-280 и грантом Немецкого Министерства Образования, Науки, Исследований и Технологии ВСТ 0552.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hu Z., Haghjoo K., Jordan F. (1996) J.Biol.Chem., 271, 3375-3384.
2. Serkina A.V., Gorozhankina T.F., Shevelev A.B., Chestukhina, G.G. (1999) FEBS Lett., 456, 215-219.

3. *Kakudo S., Yoshikawa K., Tamaki M., Nakamura E., Teraoka H.* (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 226-233.
4. *Мосолова О.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М., Ходова О.М., Цаплина И.А.* (1987) *Биохимия*, **52**, 414-422.
5. *Demidyuk I.V., Nosovskaya E.A., Tsaplina I.A., Karavaiko G.I., Kostrov S.V.* (1997) *Биохимия*, **62**, 171-175.
6. *Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н., Ревина Л.П., Степанов В.М., Егоров Н.С.* (1989) *Биохимия*, **54**, 46-53.
7. *Svendsen I., Jensen M.R., Breddam K.* (1991) *FEBS Lett.*, **292**, 165-167.
8. *Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovich E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M.* (1997) *FEBS Lett.*, **404**, 241-244.
9. *Svendsen I., Breddam K.* (1992) *Eur. J. Biochem.*, **204**, 165-171.
10. *Kakudo S., Kikuchi N., Kitadokoro K., Fujiwara T., Nakamura E., Okamoto H., Shin M., Tamaki M., Teraoka H., Tsuzuki H., Yoshida N.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23782-23788.
11. *Gumpert J., Hoischen C.* (1998) *Curr. Opinion Biotechnol.*, **9**, 506-509.
12. *Gumpert J., Cron H., Plapp R., Niersbach H., Hoischen C.* (1996) *J. Basic Microbiol.*, **36**, 89-98.
13. *Klessen C., Schmidt K.-H., Gumpert J., Grosse H.-H., Malke H.* (1989) *Appl. Environment. Microbiol.*, **55**, 1009-1015.
14. *Trachuk L., Revina L.P., Shemyakina T.M., Chestukhina G.G., Stepanov V.M.* (1996) *Canad. J. Microbiol.*, **42**, 171-183.
15. *Bushueva A.M., Shevelev A.B., Gumpert J., Chestukhina G.G., Serkina A.V., Hoischen Ch., Matz M.V., Kuryatova M.V., Stepanov V.M.* (1998) *FEMS Microbiol. Lett.*, **159**, 145-150.
16. *Sieben S.* (1997) thesis of the PhD dissertation, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany.
17. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
18. *Shevelev A.B., Aleoshin V.V., Trachuk L.A., Granovsky F.T., Kogan Ya.N., Rumer L.M., Serkina A.V., Semenova E.V., Bushueva A.M., Livshits V.A., Kostrov S.V., Shcheglov A.S., Novikova S.I., Chestukhina G.G.* (2000) *Plasmid*, **43**, 190-199.
19. *Morozova I.P., Yusupova M.P., Gololobov M.Yu., Korolkova N.V., Khodova O.M., Stepanov V.M.* (1993) *Биохимия*, **85**, 1420-1429.
20. *Donohue M.J., Beaumont A.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 25477-26481.
21. *Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Gaida A.V., Osterman A.L.* (1981) *J. Biochem. Biophys. Methods*, **5**, 177-186.
22. *Breddam K., Meldal M.* (1992) *Eur. J. Biochem.*, **206**, 103-107.
23. *Iketura H., Takagi H., Inouye M.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 7859-7864.
24. *Ohta Y., Inouye M.* (1990) *Mol. Microbiol.*, **4**, 295-304.
25. *Marie-Claire C., Roques B.P., Beaumont A.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 5697-5701.
26. *Sidhu S.S., Borgford T.J.* (1996) *J. Mol. Biol.*, **257**, 233-245.

Поступила 16.10.2000.

**ISOLATION OF *B. LICHENIFORMIS* GLUTAMYLENDOPEPTIDASE PRECURSOR
AND STUDY OF ITS *IN VITRO* PROCESSING**

A.V. SERKINA¹, A.M. BUSHUEVA¹, G.G. CHESTUKHINA¹, J. GUMPERT²,
CH. HOISCHEN², M. KUJAU² AND A.B. SHEVELEV¹

¹Stepanov Laboratory of Protein Chemistry, Federal Research Center GNIIGenetika, , 1st
Dorozhny pr., 1, 113545 Moscow RUSSIA tel. (095) 315-37-38, fax (095) 315-05-01,
e-mail: serkina@rocketmail.com

²Research Group of Prokaryotic Cell Biology, Institute for Molecular Biotechnology,
Beutenbergstr. 11, D-07745 Postfach 100813, D-07708 Jena GERMANY tel: 49 (03641)
656305/06, fax: 49 (03641) 656310, e-mail: hoischen@imb-jena.de

A secretory system based on L-form cells of *Proteus mirabilis* was developed for production of native *Bacillus licheniformis* glutamylendopeptidase precursor never formerly available. The produced precursor was stable *per se* under physiological conditions and in presence of trypsin and glutamylendopeptidase from *B. intermedius*. Complete conversion of the precursor to the mature glutamylendopeptidase was performed by bacillar metalloproteases and subtilisin. The artificially processed glutamylendopeptidase was purified by affinity chromatography on bacitracin-sepharose. Native tertiary structure in the purified glutamylendopeptidase was confirmed by demonstrating its activity towards a specific chromogenous peptide substrate.

Key words prepeptide, propeptide, secretion, subtilisin, L-form, *Proteus mirabilis*