

УДК577.152

© Можина, Руденская

КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Н.В. Можина, Г.Н. Руденская

Химический факультет МГУ им. Ломоносова, 119992, Москва, ГСП-2,
Ленинские горы, МГУ, кафедра химии природных соединений
тел.: (095)939-5541, факс: (095)939-3181. эл. почта: laboratoriahps@hotmail.com

В обзоре рассмотрены свойства коллагенолитических ферментов патогенных микроорганизмов. Коллагеназы, как правило, являются основным фактором вирулентности и служат для проникновения в ткани организма хозяина и обеспечения питания микроорганизма. Изучение этих ферментов представляет собой большой интерес для научных, медицинских и биотехнологических целей.

Ключевые слова: патогенные микроорганизмы, коллагеназы, физико-химические и энзиматические свойства, механизмы действия, применение.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы значительно возрос интерес к коллагенолитическим ферментам (коллагеназам) микроорганизмов. Эти ферменты способны при физиологических значениях pH, температуры и ионной силы гидролизовать тройную спираль молекулы нативного нерастворимого природного белка - коллагена, недоступного действию других протеаз. Известно, что коллагеназы являются основным фактором вирулентности и служат для проникновения микроорганизмов в ткани хозяина. Коллагеназы разных типов были выделены из тканей позвоночных, крабов, личинок мух, экскретов насекомых, а также из культуральной жидкости или клеток микроорганизмов - бактерий, грибов, актиномицетов.

Изучение коллагенолитических ферментов патогенных микроорганизмов представляет большую ценность для более глубокого понимания развития патогенного процесса. Полученные сведения об их биосинтезе, свойствах и структурных особенностях используются в медицине для разработки методов эффективного лечения заболеваний, вызванных продуцентами протеиназ, а также для борьбы с последствиями этих заболеваний. Помимо этого, коллагенолитические протеиназы находят применение в фармакологии для лечения язв, ожогов, рубцов.

1. Структура и свойства коллагена

Коллагены являются компонентами внеклеточного матрикса соединительных тканей животных (сухожилия, ткани кожи, костей, зубов). Они различаются по структуре и свойствам, в зависимости от вида соединительной ткани, а также возраста животного, и классифицируются на 19 типов. Основная единица - молекула тропоколлагена включает три полипептидные цепи, каждая из которых имеет молекулярную массу 95 кДа. Для первичной структуры молекулы коллагена характерно чередование полярных и неполярных участков. Строение неполярных участков однородно и представляет повторяющийся мотив Gly-Pro-

КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Хаа, где Хаа - любая аминокислота, чаще всего пролин и оксипролин. Неполярная область составляет около 95% тропоколлагеновой молекулы (338 повторов в коллагене I типа, образуют трехспиральный домен длиной 300 нм [1]). Полярные области, локализованные на N-терминальных участках каждой цепи, обладают глобулярной конформацией и чувствительны к атаке обычных протеаз. От большинства других белков коллаген отличается значительным содержанием пролина и оксипролина. Полипептидные цепи, образующие молекулу, имеют форму спирали. В эндоплазматическом ретикулуме фибробластов пептиды, из которых потом строится молекула коллагена, гидроксилируются разными пролил- и лизилгидроксилазами, гликозилируются по остаткам гидроксизилина, и пептиды упаковываются в тройную спираль. Трехспиральная структура стабилизируется водородными, а также внутримолекулярными ковалентными связями. У некоторых коллагенов мелкие пептиды связаны в более крупные дисульфидными связями. Как и другие фибриллярные белки, коллаген практически нерастворим в нейтральных растворах солей, слабых кислот и щелочах. Процесс растворения не сопровождается денатурацией коллагена, растворенные молекулы которого при определенных условиях вновь образуют фибриллы [1, 2].

При температуре выше 25°C коллаген начинает терять спирализованную структуру и превращаться в желатин - белок, доступный для гидролиза большинству эндопептидаз. Поэтому эксперименты по определению истинной коллагенолитической активности рекомендуется проводить при 20-30°C, в зависимости от источника коллагена [3].

2. Клостридиальные коллагеназы

2.1 Коллагеназа *Clostridium histolyticum*

Среди коллагеназ микробного происхождения наиболее изученными и хорошо известными являются коллагеназы, синтезируемые патогенным анаэробом *Clostridium histolyticum*, вызывающим газовую гангрену. Культуральная жидкость *Clostridium histolyticum* содержит смесь коллагеназ и других протеиназ, обладающих мощной гидролитической активностью в отношении соединительной ткани. Коллагеназы необходимы для проникновения патогена в организм хозяина и разрушения белков клеток хозяина. Коллагенолитические протеиназы вырабатываются различными штаммами этого микроорганизма, однако их число и количество вырабатываемого фермента зависят от свойств штамма и состава культуральной среды [2].

Все коллагеназы *C. histolyticum* представляют собой одноцепочечные белки с массами от 68 кДа для α -коллагеназы до 130 кДа для η -коллагеназы. Значения pI всех ферментов лежат в интервале 5,35-6,2 [4].

В отличие от эукариотических коллагеназ, осуществляющих расщепление только по специфическим сайтам нативного коллагена, коллагеназы *C. histolyticum* способны расщеплять как нативный так и денатурированный коллаген. По способности в физиологических условиях расщеплять синтетические пептидные субстраты и нативные трехспиральные коллагены на небольшие пептиды, клостридиальные коллагеназы были разделены на два класса [5]. С помощью различных методов было выявлено значительное сходство между ферментами одного класса и отчетливое различие между разными классами коллагеназ как по первичной, так и по вторичной структуре [5, 6]. Определены начальные этапы и измерены кинетические параметры гидролиза I, II, III типов коллагенов ферментами классов I и II [7]. Определены последовательности гиперчувствительных сайтов коллагенов, то есть тех, которые подвергаются первоначальной атаке коллагеназ. Расщепление коллагенов происходит в положении Yaa#Gly, в повторяющихся последовательностях Gly-Хаа-Yaa [8]. Согласно принятой номенклатуре, аминокислотный остаток, карбонильная группа которого принадлежит атакуемой ферментом пептидной связи, обозначают P1, предшествующий ему P2, далее P3 и т.д., следуя к N-концевому аминокислотному остатку субстрата. Остаток, чья аминокислотная группа образует атакуемую связь, обозначают P1', следующий P2', и т.д.

Широко изучена специфичность коллагеназ класса I и II в отношении пептидов с коллагеноподобной последовательностью [9, 10]. Определено влияние длины пептида и природа остатков в положениях P3-P3'. Для коллагеназ обоих классов необходимо наличие Gly в положениях P1' и P3, и ароматического остатка в P1. Коллагеназы класса II предпочитают Leu в P1'. Оба класса ферментов предпочитают Pro или Ala в положениях P2 и P2', и Nur, Ala или Arg в P3'. Ферменты класса II характеризуются более широкой специфичностью, однако они менее активны в отношении субстратов, содержащих Nur в P3-P3'. Все же гиперчувствительность этих сайтов расщепления связана более с локальной конформационной структурой белка, нежели с окружающей последовательностью аминокислотных остатков. Все клостридиальные коллагеназы являются истинными эндопептидазами и наилучшими субстратами для них являются наиболее длинные пептиды, имеющие сайты P3-P3', однако более предпочтительны субстраты со свободной карбоксильной группой, в случае которых коллагеназы действуют как пептидил-трипептидазы.

Клостридиальные коллагеназы ингибируются ЭДТА, 1,10-фенантролином, дипиридил-дисульфидом, 8-гидроксихинолином [2]. На основании данных о субстратной специфичности коллагеназ I и II классов, был синтезирован ряд ингибиторов, представляющих собой аналоги субстратов. Селективного ингибирования ферментов класса II удалось добиться выбором аминокислотных остатков в положениях P1 и P3' [11, 12].

Были клонированы два гена, кодирующих коллагеназы. Авторами [13] был клонирован ген коллагеназы *colH*, кодирующий белок массой 116 кДа, из штамма *S. hystolyticum* JCM 1403 (ATCC 19401). Данный полипептид на N-конце содержит сигнальную последовательность. Согласно результатам данного исследования, экспрессируемый белок является коллагеназой класса II. Помимо этого, из культуральной жидкости штамма *S. hystolyticum* JCM 1403 (ATCC 19401) была выделена коллагеназа I типа ColG массой 116 кДа, к тому же обладающая еще и желатинолитической способностью [14]. Кроме уже названных белков были обнаружены еще несколько белков с желатинолитической активностью. Одни из них имели ту же N-концевую последовательность, что и ColG, другие - ту же, что и ColH. В работе [14] показано, что более "мелкие" ферменты образуются путем протеолитического отщепления C-концевых участков разной длины.

В работах [6, 15] из комплексного препарата коллагеназы были выделены шесть коллагеназ и отнесены к двум разным классам. По результатам сравнения данных об аминокислотном составе, полученных авторами [6] и [14] можно предположить, что описанные в публикации [15] коллагеназы β (класс I) и ξ (класс II) кодируются генами *colG* и *colH* соответственно. Авторы предполагают [6], что обнаруженные ферменты с меньшей молекулярной массой являются укороченными с C-конца продуктами соответствующих генов.

2.2 Коллагеназа *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens - широко распространенный в природе микроорганизм, обитающий в почве и загрязненной воде, а также может присутствовать в кишечном тракте человека и животных и в некоторых случаях вызывать инфекцию в качестве гистотоксического патогена. Из *S. perfringens* штамма С NCIB 10662 выделена и охарактеризована коллагеназа массой 120 кДа [16]. Каталитическая активность проявляется в широком интервале pH от 4,5 до 9. Максимальная активность наблюдается в боратном буфере при pH 7,2, в фосфатном при pH 7, причем в случае боратного буфера ее значение в 1,7 раз выше, чем в случае фосфатного. Оптимальная температура для гидролиза азоколлы 42°C. Коллагеназа 120 кДа *S. perfringens* является Zn²⁺-зависимой металлопротеиназой, т.к. ингибируется 1,10-фенантролином даже в присутствии избытка Ca²⁺.

Ген коллагеназы был клонирован и секвенирован. На N-конце фермента имеется типичный сигнальный пептид. Между сигнальным пептидом и первым N-концевым остатком Ala расположена специфическая последовательность PLGP,

КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

которая является подобием синтетических субстратов бактериальных коллагеназ, из чего можно предположить, что коллагеназа *C. perfringens* подвергается самопроцессингу. Коллагеназа *C. perfringens* [16] гомологична коллагеназе ColH из *C. histolyticum* [13] и коллагеназе *Vibrio alginolyticus* [17].

По данным работы [1], С-концевые коллаген-связывающие домены (КСД) кластридиальных коллагеназ обладают сродством к нерастворимому ателоколлагену, обладающему трехспиральной структурой, и не связываются с телопептидами и дисахаридами Glc-Gal, которые могут быть присоединены к боковым цепям гидроксизлизиновых остатков коллагена. Связывание носит кооперативный характер. Следует отметить, что с желатином или пептидами с подобной аминокислотной последовательностью, но не образующими трехспиральной конформации, связывания не происходит.

В настоящее время зарубежными фирмами выпускаются очищенные препараты коллагеназ *C. histolyticum*, в том числе и рекомбинантные коллагеназы. Эти ферменты входят в состав мази Ируксол для лечения ожогов.

3. Коллагеназы микроорганизмов рода *Vibrio*

3.1 Коллагеназа *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus - грам-отрицательный микроорганизм, вызывающий отравление морепродуктами в Японии, Тайвани и других прибрежных районах. В отличие от протеиназ других членов семейства *Vibrio*, протеиназы *Vibrio parahaemolyticus* изучены мало, и их роль в развитии патогенного процесса пока неясна. Авторами [18] расшифрован геном штамма *V. parahaemolyticus* и идентифицированы гены секреторной системы III, являющейся главным фактором, обуславливающим вирулентность таких микроорганизмов, как *Shigella*, *Salmonella*, энтеропатогенная *Escherichia coli*. Перечисленные возбудители вызывают гастроэнтерит путем инвазии или тесного взаимодействия с клетками кишечного эпителия, обуславливая таким образом воспалительный характер диареи и в некоторых случаях септицемию. В работе [19] был клонирован и секвенирован ген протеиназы *prtV*, кодирующий полипептид, который включает в себя сигнальную последовательность и зрелый белок массой 63 кДа.

Протеиназа PrtV способна гидролизовать коллагены I, II, III и IV типов; коллаген V типа этой протеиназой не гидролизуется [20, 21].

По результатам исследования [21], изоэлектрическая точка белка равна 8,52. Фермент имеет оптимум pH при 7,5, оптимальная температура для проявления протеиназной активности PrtV составляет 40°C. При прединкубации в течение часа при pH 3,6-10,4 фермент сохранял 80% активности, при pH > 5 - 90% активности [21]. Протеолитическую активность ингибируют ЭДТА и 1,10-фенантролином, из чего следует, что данный фермент является металлопротеиназой. Содержание металла составляет 1 моль ионов Zn^{2+} на 1 моль нативного фермента [20]. Активность частично восстанавливается при добавлении ионов Co^{2+} и Mn^{2+} . PMSF, апротинин, пепстатин А не оказывают ингибирующего действия на фермент. Неионный детергент тритон X-100 не ингибирует протеолитическую активность и даже обнаруживает стимулирующее действие на фермент. Ингибирующее действие на фермент оказывают высокие концентрации DTT и β -меркаптоэтанола [21]. Сравнение с другими известными последовательностями белков показало, что данная протеиназа в высокой степени гомологична коллагеназе из *Vibrio alginolyticus*.

3.2 Эластинолитическая металлопротеиназа *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus - оппортунистический патоген, вызывающий серьезное инфицирование ран при контакте с зараженной водой или употреблении зараженных морепродуктов. Возникновение инфекции у лиц с предрасположенностью к подобным заболеваниям может привести к смерти в течение нескольких дней в результате сепсиса. Вирулентность *Vibrio vulnificus* обусловлена многими факторами, как секретруемыми во внешнюю среду, так и ассоциированными с бактериальной клеткой. Авторами [22] была выделена, клонирована и

охарактеризована внеклеточная Zn^{2+} -зависимая металлопротеиназа массой 44,3 кДа, рI 5,86. Аминокислотная последовательность этого фермента в высокой степени гомологична таковой у металлопротеиназы *V. angularium*, НА/протеазе *V. cholerae*, вибриолизина *V. proteolyticus*. Протеиназа состоит из двух функциональных доменов: N-концевого домена, катализирующего протеолитическую реакцию, и С-концевого домена, способствующего ассоциации фермента с субстратом или поверхностью клетки [24]. Внутривенные инъекции мышам экстракта металлопротеиназы приводили к различным повреждениям соединительной ткани, в том числе и коллагеновых волокон (коллаген IV типа), разрушению капиллярных сосудов и элементов крови, включая эритроциты, что вызывает сильную геморрагическую реакцию [23]. Однако инактивация гена эластинолитической протеиназы несколько не снижает вирулентности мутантного штамма *V. vulnificus*, дефектного по данной протеиназе [25]. Очевидно, что инактивация металлопротеиназы компенсируется другими вирулентными факторами

3.3 Вибриолизин

Vibrio proteolyticus (первоначально *Aeromonas proteolytica*) - солеустойчивый, грам-отрицательный морской микроорганизм. Вибриолизин - высокоактивная нейтральная металлопротеаза, продуцируемая в культуральную среду, - впервые была очищена и охарактеризована в 1976г. [26]. Вибриолизин секретируется в культуральную среду в виде одной полипептидной цепи массой 44,8 кДа. Во время очистки фермент подвергается автокаталитическому процессингу, давая в результате отщепления С-концевого участка белок массой 34,8 кДа. Фермент содержит 1 моль ионов Zn^{2+} на 1 моль белка. Изoeлектрическая точка фермента находится в районе 3,5 [26].

Вибриолизин является эндопептидазой, предпочитающей субстраты, в которых объемистые, гидрофобные аминокислотные остатки занимают сайты P1' и P2. Остатки, расположенные в положении P1', значительно более важны для каталитической активности, чем расположенные в положении P1. Наиболее предпочтительным остатком в положении P1 является Phe, из алифатических остатков - Leu. Исследования субстратной специфичности [27] показали, что каталитическая активность вибриолизина определяется тремя остатками с С-стороны и двумя остатками с N-стороны гидролизуемой связи. Вибриолизин проявляет также эстеразную активность с предпочтением гидрофобных остатков рядом с местом расщепления.

Оптимальная протеолитическая активность вибриолизина проявляется при нейтральном pH и температуре 50-60°C. Протеолиз под воздействием вибриолизина в значительной степени также подвергаются казеин, гемоглобин, коллаген, эластин, фибрин.

Следует особо отметить, что вибриолизин проявляет необычную для металлопротеаз стабильность в щелочных условиях [28]. Фермент инактивируется при низких значениях pH в присутствии хелатирующих соединений: ЭДТА, ДТТ, цистеина, восстановленной формы глутатиона, 1,10-фенантролина и фосфорамидона [29]. Также необратимая инактивация осуществляется аналогами субстратов и соединениями, содержащими аминоксил-, гидроксамидо- или хлорацетильные группы, например, хлорацетил-N-гидрокси-Phe-Ala-Ala. Обратимого ингибирования авторам [30] удалось достичь с помощью β -фенилпропионил-фенилаланина.

Биохимические исследования, описанные в работах [27, 29], показали, что протеаза структурно и каталитически подобна термолизину из *Bacillus thermoproteolyticus*. Ген вибриолизина был клонирован и секвенирован в нескольких системах [31].

4. Псевдолизин

Основной биологической функцией псевдолизина является обеспечение питания бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Вследствие своей способности расщеплять множество белков клетки хозяина, псевдолизин является основным

КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

фактором вирулентности *P. aeruginosa*, разрушающим ткани и нарушающим многие жизненно важные функции клетки [32, 33]. Псевдолизин может оказывать прямое влияние на развитие болезни путем непосредственного расщепления тканей и нарушения клеточных функций, кроме того, имеет место косвенное воздействие на болезнетворный процесс в результате влияния фермента на защитные механизмы клеток хозяина. Возможно, что псевдолизин вызывает разрушение эластичной стенки артерий при васкулите, наблюдаемое при септицемии, вызванной *Pseudomonas*. Как показывают результаты недавних исследований [34], это разрушение происходит в основном вследствие расщепления эластина, при совместном действии псевдолизина и стафилолизина. При септицемии, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, псевдолизин может вызвать септический шок посредством активации кининовой системы, зависимой от фактора Хагемана [35]. Активация кининового каскада клеток хозяина также может быть вовлечена в патогенез ожогов кожи. В случае инфекции *P. aeruginosa* ожоговых ран эта протеиназа облегчает инвазивную способность микроорганизма [36]. Путем быстрого расщепления протеогликанов роговой оболочки глаза фермент вызывает серьезные повреждения роговицы при кератите, вызванном *Pseudomonas* [37, 38]; кроме того, псевдолизин может оказывать косвенное воздействие на роговицу, активируя в ней эндогенные протеиназы [39]. При пневмонии, вызванной *Pseudomonas*, псевдолизин вызывает разрушение легочных тканей, кровотечение и некроз клеток альвеолярных стенок [40], повреждение соединений альвеолярных эпителиальных клеток, что усиливает проницаемость эпителия для макромолекул [41, 42]. Псевдолизин осуществляет деградацию иммуноглобулинов, компонентов комплемента и ингибитора α_1 -протеиназы, тем самым ослабляя защитные механизмы организма хозяина и повреждая нормальный контроль над физиологическими функциями плазматических протеаз. Предполагается также, что у больных муковисцидозом фермент оказывает влияние на хроническое заболевание, вызванное *P. aeruginosa* [43]. Псевдолизин имеет молекулярную массу 33 кДа и изоэлектрическую точку 5,9 [44, 45]. Он синтезируется в виде препрофермента, имеющего молекулярную массу 53,6 кДа.

Псевдолизин хорошо расщепляет такие денатурированные белковые субстраты как казеин, гемоглобин, овальбумин, фибрин и окисленную форму В-цепи инсулина [44, 46]. Его специфическая активность против казеина примерно в пять раз выше, чем у трипсина, α -химотрипсина, или субтилизина ВРН'. В результате инфекции *Pseudomonas aeruginosa* в организме хозяина расщеплению подвергаются как эластин, коллагены III и IV типов [47], ламинин [48], протеогликаны, [37, 49], иммуноглобулины G и A [50], фибрин и фибриноген [42], цитокины, так и другие биологически важные белки [51]. Следует отметить, что псевдолизин способен разрушить пептидогликан клеточной стенки *S. aureus*, т.е. обладает ярко выраженным стафилолитическим действием [37, 49]. Согласно опубликованным в работах [46, 52] данным, фермент предпочитает гидрофобные или ароматические аминокислотные остатки в положении P1'. В исследованиях, проведенных с серией субстратов Z-Phe#Xaa-Ala, выявлен следующий порядок предпочтения для Xaa: Phe>Leu>Tyr>Val>Ile, то есть ароматические остатки более предпочтительны, чем алифатические. Наилучшим вариантом в положениях P1 и P2' является остаток Ala, кроме того, значительно увеличивает скорость гидролиза элонгация субстрата до P2 и P2'. Псевдолизин имеет рН-оптимум 7-8, для стабильности фермента требуются ионы Ca^{2+} . Активность ингибируют ЭДТА, ЭГТА, 1,10-фенантролин и тетраэтиленпентамин. Ионы Zn^{2+} в концентрации > 0,01 мМ также действуют в качестве ингибиторов [46]. Фосфорамидон, фосфорилдипептиды, такие как HSAc-Phe-Leu, HSC₂H₄-(CH₂C₆H₅)CO-Ala-Gly-NH₂ или HONHCOH-(CH₂C₆H₅)CO-Ala-Gly-NH₂, являются сильными обратимыми ингибиторами [49, 53]. Необратимым ингибитором для псевдолизина является ClCH₂-CO-HOLeu-Ala-Gly-NH₂ [53].

5. Коллагеназы *Porphyromonas gingivalis*

Гингипаин R и гингипаин K

Porphyromonas gingivalis - хорошо изученный оральный патоген - продуцирует существенные количества тиол-зависимых ферментов, расщепляющих синтетические субстраты с аргинином и/или лизином в P1-позиции [54]. Множественные формы аргинин-специфичных протеиназ (гингипаин R) с различной молекулярной массой кодируются двумя очень близкими генами, (*rgp-1* и *rgp-2*) [55, 56], в то время как лизин-специфичный фермент (гингипаин K) кодируется одним геном [57, 58]. Существование нескольких молекулярных форм гингипаинов и возможная взаимная загрязненность плохо очищенных протеиназ, использованных в исследованиях, осложняют обобщение их свойств.

Гингипаины являются основным фактором вирулентности *P. gingivalis*. Гингипаины R являются мощными факторами, способствующими увеличению проницаемости сосудов [59], путем активации плазматического прекалликреина и последующего образования брадикинина [60, 61]. Гингипаин K сам по себе не способен индуцировать увеличение сосудистой проницаемости. Однако, действуя одновременно, гингипаины R и K напрямую гидролизуют H-кининоген с образованием брадикинина [62]. Гингипаин R осуществляет образование мощного хемотактического фактора C5a путем прямого протеолитического расщепления C5 [63]. Гингипаин K проявляет такую же активность в отношении окисленной формы C5 [64]. Эти процессы ведут к аккумуляции нейтрофилов в пораженных пародонтозом участках ротовой полости. В то же время гингипаины R гидролизуют C3 и таким образом препятствуют образованию производных от C3 опсонинов. Гингипаин K способен гидролизовать рецепторы C5a на поверхности нейтрофилов, что позволяет *P. gingivalis* избежать фагоцитоза [65]. Гингипаины R и K осуществляют протеолиз рецептора интерлейкина-6 [66].

Гингипаин K является мощным антикоагулянтом, проявляя сильную активность по гидролизу фибриногена и H-кининогена [67-69]. Также гингипаин K обладает значительной активностью по гидролизу гемоглобина [70]. Установлено, что гингипаин R активирует систему негативной регуляции коагуляции крови [71], участвует в процессинге и транспорте гингипаина K и нескольких других белков [72], кроме того, он осуществляет автопроцессинг. Помимо этого, возможно, что гингипаины инактивируют бактерицидную активность человеческой сыворотки [73], активируют матриксные металлопротеиназы [74], разрушают иммуноглобулины, бактерицидные белки и пептиды [75, 76], ингибиторы протеиназ [77] и белки, осуществляющие транспорт ионов железа [78].

Гингипаин R представляет собой нековалентный, но прочный комплекс каталитического домена массой 50 кДа с одной или несколькими [79] некаталитическими полипептидными цепями, обладающими гемагглютинационно-адгезионными свойствами [68]. Что касается гингипаина K, то он также существует в виде нескольких форм с массами от 48 кДа (pI 7,3 [75]) до 105 кДа [57, 80].

Активность всех форм гингипаина R по отношению к синтетическим субстратам определяется нахождением в положении P1 остатка аргинина. Эта узкая специфичность была подтверждена изучением продуктов расщепления после инкубации фермента с В-цепью инсулина или с меллитинном, когда было обнаружено, что расщепление происходит специфически после остатков аргинина, но не после лизиновых или других остатков [81]. Напротив, гингипаин K расщепляет исключительно связи с С-конца лизиновых остатков в разных пептидах и *n*-нитроанилидных субстратах. На превращение субстратов влияет аминокислотный остаток в положении P2, связи Arg-Lys-Xaa и Lys-Lys-Xaa не расщепляются, однако эффективно расщепляется связь Lys#Pro [79], очень устойчивая для гидролиза большинством сериновых и цистеиновых протеиназ. Отличительная особенность гингипаина R заключается в том, что его амидазная активность возрастает в присутствии глицин-содержащих соединений [82], исходя из чего был разработан специальный способ определения активности гингипаина R.

КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Помимо такого широко применяемого субстрата как азоказеин, оба гингипаина могут гидролизовать много белковых составляющих соединительной ткани и плазмы, включая иммуноглобулины, ингибиторы протеиназы и коллагены I и IV типов [83- 85] (коллаген I типа гидролизуется гингипаином R эффективнее, чем коллаген IV типа [84]). В работе [85] представлены данные о гидролизе коллагенов III и V типов, однако полученные результаты нуждаются в подтверждении, т.к. опыты по гидролизу коллагенов проводились при 37°C. Коллаген типа II остается устойчивым к гидролизу гингипаином R даже при 37°C, что происходит, возможно, вследствие того, что остатки лизина, входящие в его состав, в высокой степени гликозилированы и гидроксильны.

Гингипаин K имеет рН-оптимум около рН 8 в случае гидролиза небольших синтетических субстратов и рН 8,5 в случае белковых субстратов. У гингипаина R рН-оптимум несколько ниже (около 7,5) как для синтетических, так и для белковых субстратов [86].

Активность гингипаинов необратимо ингибируют тиол-блокирующие реагенты, такие как йодацетамид, йодуксусная кислота и N-этилмалеинимид. Оба фермента ингибируются также ПМХБ, TLCK, *транс*-эпокси-сукциниллейциламидо-(4-гуанидино)бутаном [87]. E-64 ингибирует только гингипаин R и только при концентрации, в несколько тысяч раз превышающей концентрацию фермента [79]. Гингипаин R (но не гингипаин K) также чувствителен к ингибированию Zn^{2+} , ЭДТА и бактериальными ингибиторами лейпептином и антипаином. В работе [88] описано применение в качестве ингибиторов различных пептидилхлорметанов, таких как D -Phe-Pro-Arg- CH_2Cl , D -Phe-Phe-Arg- CH_2Cl и алкоксиметанов, например, Z-Phe-Lys- CH_2OCO -2,4,6-Me-3-Ph. В работе [89] описано ингибирование гингипаинов тетрациклином и его аналогами.

Среди природных ингибиторов, только α_2 -макроглобулин ингибирует гингипаин R, но не ингибирует гингипаин K [90]. Человеческий α_2 -макроглобулин не содержит лизиновых остатков в зоне связывания. Другие ингибиторы, такие как серпины, цистатины и N-кининоген неэффективны в отношении гингипаинов и гидролизуются под их воздействием.

Наличие разных форм гингипаина R в разных штаммах и разных клеточных фракциях *P. gingivalis* было подтверждено различными методами. Разные формы гингипаина R с массами от 50 до 110 кДа, образовавшиеся в результате альтернативного протеолитического процессинга первичного транскрипта генов *rgp-1* и *rgp-2*, могут быть выделены в разных условиях выращивания из разных штаммов. Все формы гингипаина R стабилизируются ионами Ca^{2+} , не влияющими на ферментативную активность фермента [79, 68].

Доменная организация гингипаина K очень схожа с таковой у гингипаина R1. Каталитическому домену предшествует N-концевой препропептид, с C-конца каталитический домен фланкируется большим гемагглютинационно-адгезионным доменом. Ген *kgp* был клонирован и секвенирован [57, 80]. Все формы лизин-специфичного фермента происходят от одного первичного транскрипта гена *kgp*.

У большинства штаммов *P. gingivalis* гингипаины ассоциированы с внешней клеточной мембраной или везикулами на этой мембране и секретируются через закрепленный на внешней мембране интермедиат [91]. C-концевой пептид предшественника фермента содержит участок, определяющий пропускание пептида через внешнюю мембрану, на которой он остается закрепленным благодаря части C-концевого пептида.

6. Коллагенолитические ферменты семейства субтилизинов

Сериновые протеиназы семейства субтилизина в настоящее время очень хорошо изучены и обнаружены не только у микроорганизмов, но и у растений, животных и человека. Известна способность сериновых протеаз из семейства субтилизинов, источником которых являются некоторые штаммы *Bacillus subtilis* и др. расщеплять нативный и денатурированный коллагены [92, 93]. Субтилизины могут гидролизовать связи как в главных цепях, так и поперечные внутри- и

межмолекулярные, отщепляя свободные аминокислоты. С наибольшей скоростью гидролизуются связи, образованные карбоксильными группами аминокислот с гидрофобными боковыми связями лейцина, фенилаланина и тирозина. Оптимум действия этих ферментов находится в пределах pH 8,0-10,0.

Работами Кулаева с соавторами [92] установлено, что по механизму действия на коллаген I типа сериновые протеазы субтилизинового типа существенно отличаются от классической клостридиальной коллагеназы, в результате действия которой происходит гидролиз спирализованной части молекулы коллагена с разрывом 150-200 связей на молекулу коллагена. При этом на электрофореграмме наблюдается одновременное исчезновение α , β и γ -компонентов. При действии субтилизиновых ферментов на молекулу коллагена на первой стадии реакции исчезают оба β -компонента (происходит разрыв ковалентных связей и разрушение димеров, образованных α -цепями коллагена) при существенном возрастании количества α -цепей и появления высокомолекулярных продуктов их гидролиза, а при более длительной инкубации - более низкомолекулярных компонентов. Таким образом, в первую очередь субтилизины гидролизуют связи между полипептидными цепями в молекуле коллагена или телепептидные участки цепей

7. Коллагеназы спирохет

7.1 Треполизин

При исследовании протеолитической активности спирохеты *Treponema denticola*, вызывающей ряд заболеваний полости рта, была обнаружена мощная протеиназа, названная треполизин. Треполизин локализован на внешней мембране микроорганизма. Он играет важную роль при проникновении спирохеты через основную мембрану клетки хозяина [94]. *T. denticola* оказывает множественное влияние на эпителиальные клетки, например, нарушение межклеточных контактов, разрушение фибронектина, коллапс цитоскелета, образование пузырьков на поверхности клеток и вакуолей внутри клетки, смерть клеток [95]. Возможно также, что треполизин участвует во всех этих процессах в сопровождении другого внешне-мембранного белка [96]. Эти белки могут отпочковываться от бактериальной клетки в виде мембранных везикул и проникать в клетку эпителия. [95]. Треполизин способен инициировать выброс полиморфноядерных лейкоцитарных гранул и активировать скрытые матриксные металлопротеиназы [74, 97]. Кроме того, возможно, что треполизин осуществляет адгезионные функции бактерии [98, 99]. В любом случае эта протеиназа является основным фактором вирулентности *T. denticola*.

Треполизин представляет собой комплекс, состоящий из белка с массой 72 кДа и двух вспомогательных белков, с массами, по разным данным, около 40 и 30 кДа. Нагревание его до 100°C ведет к образованию трех перечисленных полипептидов [100-102]. Химические модификации с помощью диизопропилфторфосфата, N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина или диэтилпиокарбоната инактивируют фермент, что говорит о том, что в активный центр входят остаток серина, карбоксильная и имидазольная группы. Треполизин ингибируется такими ингибиторами сериновых протеиназ как PMSF; соевый ингибитор трипсина Боумана-Берка и Tos-Phe-CH₂Cl, Tos-Lys-CH₂Cl и пепстатин не оказывают ингибирующего действия на фермент [100, 101]. В ранней работе [100] отмечалось, что цистеин и DTT усиливают энзиматическую активность, в то время как тиол-блокирующие соединения ее ингибируют; однако в исследованиях последнего времени [101] при использовании более очищенного препарата это подтверждено не было. Кальций-хелатирующие соединения либо незначительно усиливают активность [100], либо не оказывают на нее никакого влияния [101]. Оптимум pH для треполизина 7,5-8,0 [100].

Гидролитическому действию треполизина подвергаются многие белки: фибриноген, трансферрин, сывороточный альбумин, коллаген типа IV, желатин, казеин, фибронектин, ламинин, IgA, IgG [100]. Нативный коллаген класса I треполизином не гидролизуются. Фермент также расщепляет такие пептиды как

КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

вещество Р и ангиотензин [101]. Обычно белки гидролизуются на фрагменты размерами менее 12 кДа, однако в случае коллагена имеет место ограниченное расщепление [100, 94]. Наиболее предпочтительно расщепляются связи, образованные карбоксильной группой остатка Phe, с меньшей скоростью идет гидролиз связей, образованных Leu, Pro и Tyr. Скорость гидролиза возрастает также, если в положении P2 находится остаток Pro [100-102]. Протеиназа 72-кДа *T. denticola*, богатая пролином, продукт гена *ptrP*, была клонирована и секвенирована. Она представляет собой гомолог субтилизина [102]. Ген кодирует белок с массой 77,5 кДа, содержащий сигнальный пептид и пропоследовательность.

8. Коллагенолитические ферменты микроскопических грибов.

8.1 Оризин

В *Aspergillus oryzae* была обнаружена, очищена и охарактеризована сериновая протеиназа из семейства субтилизинов массой 33 кДа. Те виды *A. flavus* и *A. fumigatus*, которые проявляют высокую вирулентность на иммуноослабленных животных, также обнаруживают высокий уровень секреции оризина [103]; фермент секретруется в ткань хозяина во время инвазии. Мощные ингибиторы оризина способны защитить иммуноослабленных животных от инфицирования. Разрушение гена, кодирующего оризин, не ведет к снижению вирулентности [104, 105], что, вероятно, связано с увеличением синтеза других протеиназ [106]. Возможно, что продуцирование оризина и всех остальных протеиназ находится под контролем гена, подобного *areA*. Разрушение таких генов ведет к уменьшению выработки всех протеиназ и снижению вирулентности [107]. Мутантный штамм *A. fumigatus*, дефектный по оризину, также дефектен по фунгализину и кислой грибной протеиназе [103].

Оризин состоит из одной полипептидной цепи массой 33 кДа. Фермент катализирует гидролиз эластина и коллагена. Данная протеиназа также гидролизует другие субстраты, общие для субтилизино- и химотрипсиноподобных ферментов. рН-оптимум находится в пределах 8,0-9,0; при рН менее 7,0 активность очень мала. Оризин количественно ингибируется диизопропилфтор-фосфатом, PMSK, диэтилпирукарбонатом и совсем не ингибируется хелатирующими или тиол-блокирующими соединениями. Активность фермента также подавляют картофельные ингибиторы химотрипсина 1 и 2, эглин С ингибитор α -амилазы/субтилизина ячменя и ингибитор субтилизина из *Streptomyces* (SSI) [108]. Интересно, что пропептид фермента из *A. fumigatus*, экспрессированный в *E. coli*, селективно и конкурентно ингибирует зрелую протеиназу [109]. Ингибирование очень селективно, пропептид гораздо слабее ингибирует фермент из *A. oryzae* (83% гомологии) и вообще не ингибирует субтилизин.

В литературе имеются сведения о результатах клонирования кДНК и генов оризина из разных источников [105, 110-112]. Согласно полученной аминокислотной последовательности сериновой протеазы *A. oryzae* [111], оризин имеет препоследовательность, которая предшествует зрелой протеазе. Аминокислотная последовательность зрелого фермента из *A. oryzae* на 83 и 82% идентична ферментам из *A. fumigatus*, *A. flavus* соответственно [110]. Исследования каталитических свойств и гомологичных последовательностей вокруг активных остатков Ser, His и Asp, проведенные авторами [108, 113], показывают, что эти сериновые протеиназы принадлежат к семейству субтилизинов.

8.2 Фунгализин

При выращивании на белковых субстратах или нерастворимом материале из легочной ткани *Aspergillus fumigatus* вырабатывает фунгализин, металлопротеиназу-42-кДа. Фунгализин секретруется в ткань хозяина при инвазии легких иммуноослабленных животных [114]. Вероятно, данная протеиназа облегчает преодоление структурного белкового барьера в процессе проникновения в ткань хозяина.

Фунгализин с высокой скоростью гидролизует ламинины, эластин, коллаген. Субстратная специфичность подобна таковой у термолизина. С аминоконцевой

части расщепляемой связи предпочтение отдается остаткам с объемными гидрофобными боковыми цепями. рН-Оптимум фунгализина составляет 7,5-8,0. Максимальная ферментативная активность наблюдается при 60°C, уменьшение активности при инкубации при данной температуре становится заметным через 20 минут. Активность фунгализина ингибируют ЭДТА, 1,10-фенантролин, фосфорамидон, но не PMSF, антипаин, лейпептин, химостатин и лепстатин. Инактивированный с помощью металлхелатирующих соединений фермент полностью восстанавливает свою активность при добавлении Zn^{2+} и частично при добавлении Co^{2+} [114]

Ген и кДНК фунгализина были клонированы и секвенированы [113, 115]. Продукт трансляции содержит полипептид, включающий в себя зрелый белок из 389 остатков с массой 42,1 кДа, которому предшествует препропоследовательность. Рекомбинантный пропептид способен связываться со зрелым фунгализином и селективно ингибировать его. Скорее всего, пропептид поддерживает протеиназу в неактивном состоянии до тех пор, пока не произошла ее секреция. Присутствие Zn^{2+} в культуральной среде стимулирует выработку фунгализина *A. fumigatus*.

8.3 Коллагенолитическая протеиназа *Entomophthora coronata*

Одним из микроорганизмов, синтезирующих сериновую протеазу с широкой субстратной специфичностью, в том числе с коллагенолитическим действием, является патогенный гриб *Entomophthora coronata*, вызывающий образование назальных полипов. Как и бактериальные металлсодержащие коллагеназы, этот фермент способен расщеплять нативный коллаген из кожи человека, а также синтетический полипептид Pz-Pro-Leu#Gly-Pro-Arg. В отличие от бактериальных металлсодержащих протеаз, сериновая протеаза из *E. coronata* способна атаковать В-цепь инсулина. С коллагеназой из *E. coronata* сходна по действию на коллаген сериновая протеаза с более низкой активностью из гриба *Malbranchea pulchella* var *sulfuria*. Первая атака этого фермента осуществляется на связь Leu#Tyr, а дальнейшее расщепление молекулы коллагена происходит после продолжительного периода инкубации путем действия на связи Phe#Phe и Tyr#Tyr [116].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Коллагеназы, выделенные из различных микроорганизмов, различаются по свойствам и способности действовать на коллагеновые волокна различных типов, поэтому они могут быть использованы для полного или частичного гидролиза соответствующих коллагенов, в частности, для изучения химической природы коллагенов. В биологии клеток коллагенолитические ферменты используются для разрушения внеклеточного матрикса тканей с целью получения суспензии клеток или клеточных образований без повреждения поверхности живых клеток. Например, они применяются для получения гепатоцитов, адипоцитов и других клеток в исследовательских целях [117], в медицине для приготовления клеток сосудистого эндотелия, необходимых для протезирования сосудов [118], для выделения клеток островковой ткани поджелудочной железы для трансплантации [119]. Использование препаратов клостридиальных коллагеназ в указанных целях осложняется проблемой недостаточной воспроизводимости экспериментов, очевидно, связанной с непостоянством состава используемых препаратов. Исследуется применение клостридиальных коллагеназ для лечения грыжи интервертебральных дисков позвоночника [120]. Коллагенолитические ферменты могут быть использованы в медицине: при терапии некоторых заболеваний печени, ожоговых ран, обморожений, для ускорения отторжения некротических тканей, трофических язв, для очищения гнойно-некротических налетов. Они входят в состав некоторых косметических средств [2]. Вибриолизин может найти медицинское применение как эффективный ферментативный препарат для удаления некротической ткани из ран, благодаря своей способности распознавать живую и омертвевшую ткань и гидролизовать денатурированные компоненты (коллаген, эластин, фибрин) омертвевшей ткани, действуя при физиологических значениях рН и температуры [121]. Фермент остается стабильным в составе лекарственного крема и сохраняет протеолитическую активность в течение нескольких лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Matsushita O., Koide T., Kobaiashi R., Nagata K., Okabe A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 8761-8770.
2. *Демина Н.С., Лысенко С.В.* (1996) *Микробиология*, **65**, 293-304.
3. *Руденская, Г. Н.* (2003) *Биоорг.хим.*, **29**, 117-128.
4. *Mandl I., MacLennan J.D., Howes E.L.* (1953) *J. Clin. Invest.* **32**, 1323-1329.
5. *Bond M.D., Van Wart H.* (1984) *Biochemistry*, **23**, 3092-3099.
6. *Bond M. D., Van Wart H.* (1984) *Biochemistry*, **23**, 3085-3091.
7. *Mallya S.K., Mookhtiar K.A., Van Wart H.* (1992) *J. Protein. Chem.*, **11**, 99-107.
8. *French M.F., Bhowan A., Van Wart H.E.* (1992) *J. Protein. Chem.*, **1**, 83-97.
9. *Steinbrink D.R., Bond M.D., Van Wart H.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 2771-2776.
10. *Van Wart H., Steinbrink D. R.* (1985) *Biochemistry*, **24**, 6520-6526.
11. *Mookhtiar K.A., Grobelny D., Galardy R.E., Van Wart H.* (1988) *Biochemistry*, **27**, 4299-4304.
12. *Schwartz M.A., Van Wart H.E.* (1992) *Prog. Med. Chem.*, **29**, 271-334.
13. *Yoshihara K., Matsushita O., Minami J., Okabe A.* (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 6489-6496.
14. *Matsushita O., Jung Ch-M., Katayama S., Minami J., Takahashi Y., Okabe A.* (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 923-933.
15. *Bond M.D., Van Wart H.* (1984) *Biochemistry*, **23**, 3077-3085.
16. *Matsushita O., Yoshihara K., Katayama S.-I., Minami J., Okabe A.* (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 149-156.
17. *Takeuchi H., Shibano Y., Morihara K., Fukushima J., Inami S., Keil B., Gilles A. M., Kawamoto S. and Okuda K.* (1992) *Biochem. J.*, **281**, 703-708.
18. *Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M. et al.* (2003) *Lancet*, **361**, 743-749.
19. *Lee Ch.-Y., Su, Sh.-Ch., Liaw R.-B.* (1995) *Microbiology*, **141**, 2569-2576.
20. *Yu M.S., Yap M.N., Lee C.Y.* (2000) *Microbiol. Immunol.*, **44**, 805-813.
21. *Yu M.-Sh., Lee Ch.-Y.* (1999) *Microbiology*, **145**, 143-150.
22. *Chuang Y.C., Chang T.M Chang M.C.* (1997) *Gene*, **189**, 163-168.
23. *Chuang Y.C., Sheu H.M., Ko, W.C., Chang T.M., Huang K.Y.* (1997) *J. Formos. Med. Assoc.*, **96**, 677-684.
24. *Miyoshi S., Kawata K., Hosokawa M., Tomochika K., Shinoda S.* (2003) *Life Sci.*, **72**, 2235-2242.
25. *Jeong K.C., Jeong H.S., Rhee J.H., Lee S.E., Chung S.S., Starks A.M., Escuder G.M., Gulig P.A., Choi S.H.* (2000) *Infect. Immun.*, **68**, 5096-5106.
26. *Griffin T. B. and Prescott J. M.* (1976) *J. Biol. Chem.*, **245**, 1348-1356.
27. *Bayliss, M.E., Wilkes, S.H., Prescott, J.M.* (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 214-219.
28. *Durham, D. R.* (1989) *US Patent*, **4**, 856,983.
29. *Wilkes, S.H., Prescott, J.M.* (1976) *Methods Enzymol.*, **45**, 404-415.
30. *Wilkes, S.H., Bayliss, M.E., Prescott, J.M.* (1980) *J. Biol. Chem.*, **263**, 1821-1825.
31. *David, V.A., Deutch, A.H., Sloma, A., Pawlyk, D., Ally, A., Durham, D.R.* (1992) *Gene*, **112**, 107-112.
32. *Wretlind, B., Wadstrom, T.* (1997) *J. Gen Microbiol.*, **103**, 319-327.
33. *Morihara, K., Homma, J.Y.* (1985) In *Bacterial Enzymes and Virulence*, (Holder, I.A., Ed.), Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 41-79.
34. *Galloway, D.R.* (1991) *Mol. Microbiol.*, **5**, 2315-2321.
35. *Maeda, H., Yamamoto.* (1996) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **377**, 217-226.
36. *Holder, I.A.* (1985) *Can. J. Microbiol.*, **4**, 393-402.
37. *Kessler, E., Kennah, H.E., Brown, S.I.* (1977) *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.*, **16**, 488-497.

38. Kreger, A.S., Gray, L.D. (1978) *Infect. Immun.*, **19**, 630-648.
39. Twinning, S.S., Kirschner, S.E., Mahnke, L.A., Frank, D.W. (1993) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **34**, 2699-2712.
40. Gray, L.D., Kreger, A. (1979) *Infect. Immun.*, **23**, 150-159.
41. Azghani, A.O. (1996) *Am. J. Cell Mol. Biol.*, **15**, 132-140.
42. Komori Y., Nonogaki T., Nikai T. (2001) *Toxicon.*, **39**, 1327- 1332.
43. Fick, R.B., Jr. (1989) *Chest*, **92**, 158-164.
44. Morihara, K., Tsuzuki, H., Oka, T., Inoue, H., Ebata, M. *Pseudomonas*. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 3295-3304.
45. Bever R.A., Iglewski B.H. (1988) *J. Bacteriol.*, **170**, 4309-4314.
46. Morihara K. (1995) *Methods Enzymol.*, **248**, 242-253.
47. Heck L.W., Morihara K., McRae W.B., Miller E.J. (1986) *Infect. Immun.*, **51**, 115-118.
48. Heck L.W., Morihara K., Abrahamson D.R. (1986) *Infect. Immun.*, **54**, 149-153.
49. Kessler E., Israel M., Landshman N., Chechick A., Blumberg S. (1982) *Infect. Immun.*, **38**, 716-723.
50. Doring G., Obernesser J., Botzenhart K. (1981) *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyd. Abt. 1 Orig. Reihe A*, **249**, 89-98.
51. Parmely M., Gale A., Clabaugh M., Horvat R., Zhou W.-W. (1990) *Infect. Immun.*, **58**, 3009-3014.
52. Morihara K. (1974) *Adv. Enzymol.*, **41**, 179-242.
53. Nishino N., Powers J.C. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 3482-3486.
54. Mayrand D., Holt S.C. (1988) *Microbiol. Rev.*, **52**, 134-152.
55. Pavloff N., Potempa J., Pike R.N., Prochazka V., Kiefer S., Travis J., Barr Ph.J. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 1007-1010.
56. Okamoto K., Misumi Y., Kadowaki T., Yoneda M., Yamamoto K., Ikehara Y. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **316**, 917-925.
57. Barkocy-Gallagher G.A., Han N., Patti J.M., Whitlock J., Progulske-Fox A., Lantz, M.S. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 2734-2741.
58. Okamoto K., Kadowaki T., Nakayama K., Yamamoto K. (1996) *J. Biochem.*, **120**, 398-406.
59. Hinode D., Nagata A., Ichimiya S., Hayashi H., Morioka M., Nakamura R. (1992) *Arch. Oral Biol.*, **37**, 859-861.
60. Kaminishi H., Cho T., Itoh T., Iwata A., Kawasaki K., Hagihara Y., Maeda H. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.*, **114**, 109-114.
61. Imamura T., Pike R.N., Potempa J., Travis J. (1994) *J. Clin. Invest.*, **94**, 361-369.
62. Imamura T., Pike R.N., Potempa J., Travis J. (1995) *Infect. Immun.*, **95**, 1999-2003.
63. Wingrove J.A., DiScipio R.G., Hugli T.E., Chen Z., Potempa J., Travis J. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 18902-18907.
64. DiScipio R.G., Daffern P.J., Kawahara M., Pike R., Travis J., Hugli T.E. (1996) *Immunology*, **87**, 660-667.
65. Jagels M.A., Travis J., Potempa J., Pike R., Hugli T.E. (1996) *Infect. Immun.*, **64**, 1984-1991.
66. Oleksy A., Banbula A., Bugno M., Potempa J., Travis J. (2002) *Microb. Pathog.*, **32**, 173-181.
67. Imamura T., Potempa J., Pike R.N., Moor J.N., Barton M.H., Travis J. (1995) *Infect. Immun.*, **63**, 4877-4882.
68. Pike R. N., Potempa J., McGraw W., Coetzer T. H. T., Travis J. (1996), *J. Bacteriol.*, **178**, 2876-2882.
69. Scott C.F., Whitaker E.J., Hammond B.F., Colman R.W. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 7935-7942.
70. Lewis J.P., Dawson J.A., Hannis J.S., Muddiman D., Macrina F.L. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 4905-4913.
71. Hosotaki K., Imamura T., Potempa J., Kitamura N., Travis J. (2002) *Microb. Pathog.*, **32**, 173-181.

КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

- 72 Okamoto K., Kadowaki T., Nakayama K., Yamamoto K. (1996) *J Biochem*, **120**, 398-406
- 73 Grenier D. (1992) *Infect Immun*, **60**, 1854-1857
- 74 Sorsa T., Ingman T., Suomalainen K., Haapsalo M., Kontinen Y., Lindy O., Saari H., Uitto V.-J. (1992) *Infect Immun*, **60**, 4491-4495
- 75 Fujimura S., Shibata Y., Nakamura T. (1993) *FEMS Microbiol Lett*, **113**, 133-138
- 76 Otsuka M., Endo J., Hinode D., Nagata A., Maehara R., Sato M., Nakamura R. (1987) *J Periodont Res*, **22**, 491-498
- 77 Carlsson J., Herrmann B.F., Hofling J.F., Sundqvist G.K. (1984) *Infect Immun*, **43**, 644-648
- 78 Carlsson J., Hoffling J.F., Sundqvist G.K. (1984) *J Med Microbiol*, **18**, 39-46
- 79 Pike R. N., Potempa J., Travis J. (1994) *J Biol Chem*, **269**, 406-411
- 80 Pavloff N., Pemberton P.A., Potempa J., Chen W.-Ch. A., Pike R.N., Prochazka V., Kiefer S., Travis J., Barr Ph.J. (1997) *J Biol Chem*, **272**, 1595-1600
- 81 Chen Z., Potempa J., Polanovski A., Wikstrom M., Travis J. (1992) *J Biol Chem*, **267**, 18896-18901
- 82 Chen Z., Potempa J., Renvert S., Polanovski A., Wikstrom M., Travis J. (1991) *Infect Immun*, **59**, 2846-2850
- 83 Hinode D., Hayashi H., Nakamura R. (1991) *Infect Immun*, **59**, 3060-3068
- 84 Kadowaki T., Yoneda M., Okamoto K., Maeda K., Yamamoto, K. (1994) *J Biol Chem*, **269**, 21371-21378
- 85 Bedi G.S., Williams T. (1994) *J Biol Chem*, **269**, 599-606
- 86 Potempa J., Travis J. (1998) *Handbok of Proteolytic Enzymes*, Barrett, A. J., Rawlings N.D., Woessner J. F. (Eds), London, Academic Press
- 87 Fujimura S., Hirai K., Shibata Y., Nakayama K., Nakamura T. (1998) *FEMS Microbiol Lett*, **163**, 173-179
- 88 Potempa J., Pike R., Travis J. (1997) *Biol Chem*, **378**, 223-230
- 89 Imamura T., Matsushita K., Travis J., Potempa J. (2001) *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 2871-2876
- 90 Gron H., Pike R., Potempa J., Travis J., Thogersen I.B., Enghild J.J., Pizzo S.V. (1997) *J Periodontol Res*, **32**, 61-68
- 91 Klauser T., Polhner J., Meyer T.F.N. (1993) *BioEssays*, **15**, 799-805
- 92 Кулаев И.С., Соловьева Н.И., Калелина Т.С., Нурминская М.В. (1988) *ДАН*, **303**, 499-502
- 93 Слабоспицкая А.Т., Крымовская С.С., Резник С.Р. (1989) *Микробиол журн*, 54-56
- 94 Grenier D., Uitto V.-J., McBride B.C. (1990) *Infect Immun*, **58**, 347-351
- 95 Uitto V.-J., Pan Y.-M., Leung W.K., Larjava H., Ellen R., Finlay B.B., McBride B.C. (1995) *Infect Immun*, **63**, 3401-3410
- 96 Rosen G., Naor R., Rahamin E., Yishai R., Sela M.N. (1995) *Infect Immun*, **63**, 3973-3979
- 97 Ding Y., Uitto V.-J., Haapsalo M., Lounatmaa K., Kontinen Y.T., Salo T., Grenier D., Sorsa T. (1996) *J Dent Res*, **75**, 1986-1993
- 98 Haapsalo M., Hannam P., McBride B.C., Uitto V.-J. (1996) *Oral Microbiol Immunol*, **11**, 156-160
- 99 Leung W.K., Haapsalo M., Uitto V.-J., Hannam P., McBride B.C. (1996) *Anaerobe*, **2**, 39-46
- 100 Uitto V.-J., Grenier D., Chan E. C. S., McBride B.C. (1988) *Infect Immun*, **56**, 2717-2722
- 101 Makinen P.-L., Makinen K. and Syed S. (1995) *Infect Immun*, **58**, 3567-3575
- 102 Ishihara K., Miura T., Kuramitsu H.K., Okuda H. (1996) *Infect Immun*, **64**, 5178-5186
- 103 Kolattukudy P.E., Lee J.D., Rogers L.M., Zimmerman P., Ceselski S., Fox B., Stein, B., Copelan E.A. (1993) *Infect Immun*, **61**, 2357-2368

104. *Monod M., Togni G., Rahalison L., Frenk E.* (1991) *J. Med. Microbiol.*, **35**, 23-28.
105. *Tang C.M., Cohen J., Krausz T., Van Noorden S., Holden D.W.* (1993) *Infect. Immun.*, **61**, 1650-1656.
106. *Ramesh M.V., Kollattukudy P.E.* (1996) *Gene*, **173**, 3899-3907.
107. *Hensel M., Tang C.M., Arst Jr.H.N., Holden D.W.* (1995) *Can. J. Bot.*, **73**, 1065-1070.
108. *Makaryan A., Beall C.J., Kollattukudy P.E.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**, 372-376.
109. *Makaryan A., Lee J.D., Sirakova T.D., Kollattukudy P.E.* (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 2211-2215.
110. *Ramesh M.V., Sirakova T., Kollattukudy P.E.* (1994) *Infect. Immun.*, **62**, 79-85.
111. *Tatsumi H., Ogawa Y., Murakami S., Ichida Y., Murakami K., Masaki A., Kawabe H., Arimura H., Nakano E., Motai H.* (1989) *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 33-38
112. *Monod M., Paris S., Sanglard D., Jatton-Ogay K., Bille, J., Latge, J.P.* (1993) *Infect. Immun.*, **61**, 4099-4101.
113. *Jatton-Ogay K., Suter M., Cramer R., Falchetto R., Faith A., Monod M.* (1992) *FEMS Microbiol. Lett.*, **92**, 163-168.
114. *Markaryan A., Morozova I., Hongshi Y., Kollattukudy P.E.* (1994) *Infect. Immun.*, **62**, 2149-2157.
115. *Sirakova T.D., Makaryan A., Kollattukudy P.E.* (1994) *Infect. Immun.*, **62**, 4208-4218.
116. *Hurion N., Tromentin H., Keil S.* (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 438-445.
117. *Seglen P.* (1976) *Methods Cell Biol.*, **13**, 29-83.
118. *Sharefkin J.B., Van Wart H.E., Williams S.K.* (1987) *Endothelial Seeding in Vascular Surgery*. Herring, M.D Glover, J.L. (Eds), Philadelphia, Grune & Stratton, pp. 79 -101.
119. *Wolters G.H., Vos-Scheperkeuter G.H., Lin H.-C., van Schilfgaarde R.* (1995) *Diabetes*, **44**, 227-233.
120. *Hedtmann A., Fett H., Steffen R., Kramer J.* (1992) *Z. Orthop. Grenz.*, **130**, 36-44.
121. *Durham D. R., Fortney D. Z., Nanney L. B.* (1993) *J. Burn Care Rehabil.*, **14**, 544-551.

Поступила 27.10.2003

COLLAGENOLYTIC ENZYMES OF PATHOGENIC MICROORGANISMS

N.V. Mozhina, G.N. Rudenskaya

Department of Chemistry of Natural Compounds, School of Chemistry.
Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia;
tel.: (095)939-5541, fax. (095)939-3181; e-mail: GNRuden@genebee.msu.ru

The review summarizes characteristics of pathogenic microbial collagenolytic enzymes. The collagenases usually represent the main factors of virulence; they provide microbe penetration into host tissues and supply microorganisms with nutrients. The study of these enzymes is of great value for scientific, medical and biochemical purposes.

Key words: pathogenic microorganisms, collagenase, physico-chemical and enzymatic properties, action mechanisms.