

**ИСТОРИЯ ЗАГАДОЧНОЙ АКТИН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ,
КОТОРАЯ ПРЕВРАТИЛАСЬ В ГРИМЕЛИЗИН, ЧЛЕНА РЕСПЕКТАБЕЛЬНОГО СЕМЕЙСТВА
ТЕРМОЛИЗИНОПОДОБНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ**

© С. Ю. Хайтлина

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: skhspb@yahoo.com*

Описывается история открытия и исследования бактериальной металлопротеиназы ECP32, которая ограниченно расщепляет актин в одном сайте между Gly42 и Val43, интенсивно вовлеченном в контакт между мономерами актина в полимере. Расщепление приводит к обратимой потере способности актина к полимеризации. Поэтому актин, расщепленный протеазой ECP32, оказался уникальной моделью для изучения механизмов полимеризации актина, динамики актиновых нитей и влияния на эти процессы актинсвязывающих белков, для выявления аллостерических эффектов, а также для определения пространственной структуры актина, которая до этого была определена только в комплексах актина с лигандами. Кроме того, оказалось, что непатогенные бактерии, синтезирующие протеазу ECP32, способны проникать в эукариотические клетки и вызывать реорганизацию их цитоскелета. Результаты секвенирования гена 16S рРНК и 48 биохимических тестов автоматизированной системы Vitek-2 показали, что бактерии-продуценты протеазы ECP32 — это не *E. coli*, как было определено ранее на основании рутинных микробиологических тестов, а *Serratia grimesii*. В бактериях референтного штамма *S. grimesii* выявлен ген ECP32-подобной металлопротеиназы. Ген клонирован, секвенирован и экспрессирован в *E. coli*. Белок, кодируемый этим геном, был назван гримеллизином. Гримеллизин сходен с ECP32 по молекулярной массе, последовательности N-концевого фрагмента, способности ограниченно расщеплять актин в сайте Gly42—Val43 и чувствительности расщепления к действию хелаторов. Данные указывают на то, что гримеллизин и ECP32 — это один и тот же фрагмент. По данным конфокальной микроскопии, бактерии, синтезирующие природный и рекомбинантный гримеллизин, приобретают инвазивные свойства. Описанные данные позволяют предположить, что актин является белком-мишенью, протеолиз которого способствует проникновению бактерий в клетки.

Ключевые слова: актин, протеолиз актина, металлопротеиназы, протеаза ECP32, гримеллизин, бактериальная инвазия.

Предыстория

Я верю, что в науке «кто ищет, тот всегда найдет». Но вот найдешь ли то, что ищешь, или что-то совсем другое — это вопрос. Описываемая история началась около 30 лет назад на биостанции «Восток» Института биологии моря ДВНЦ РАН, где мы, бывшие аспиранты Лаборатории биохимических основ репродукции клеток, и наши молодые коллеги занимались изучением структурных и регуляторных белков мышц двусторчатых моллюсков. Большая часть работы была посвящена поискам белков, влияющих на скорость и степень полимеризации актина. Поэтому когда в опытах одного из молодых сотрудников актин перестал полимеризоваться, это было ЧП. Проверка с помощью электрофореза показала, что неполимеризующийся препарат актина содержит еще один белковый компонент меньшей молекулярной массы и что этот компонент появляется только тогда, когда актин экстрагируют буфером именно этого сотрудника, взятым из его бутылки. Сейчас это трудно понять, но тогда потребовалось время, чтобы догадаться, что мы имеем дело не с новым белком, а с протеолизом актина, в результате которого он

перестает полимеризоваться. Это предположение было подтверждено экспериментально; более того, оказалось, что продукт протеолиза не подвергается дальнейшему расщеплению, а протеолитическая активность буферного раствора пропадает, если его автоклавировать (Мантуленко и др., 1982). Это было интересно! И все-таки та первая встреча с протеолизом актина могла остаться курьезом, если бы не два обстоятельства.

Во-первых, я начала работать в Отделе клеточных культур и увидела, что растворы можно стерилизовать не только автоклавированием, но и фильтрованием. Фильтрование «протеолитически активного раствора» позволило выделить бактерии, от которых эта активность зависела (Хайтлина и др., 1988). Второе обстоятельство связано с моим главным научным интересом — изучением функциональных различий изоформ актина. В то время пространственной структуры актина еще не существовало, но его первичная структура была известна (Elzinga et al., 1973). Было также известно, что главное различие между изоактинами сосредоточено в их N-концевых сегментах (Vandekerckhove, Weber, 1978). Поэтому можно было ожидать, что после удаления N-концевого фрагмен-

та коровая часть молекулы окажется инвариантной, а введение того или иного N-концевого фрагмента восстановит свойства определенной изоформы.

Недавно эти предположения были частично подтверждены с помощью генно-инженерных подходов (Fyrberg et al., 1998; McKane et al., 2006), а в середине 1980-х годов можно было рассчитывать только на ограниченный протеолиз. Это и определило наш интерес к неожиданно появившейся протеолитической активности. Надо сразу сказать, что последующие исследования конформационных изменений молекулы актина (в том числе и те, о которых речь пойдет ниже) показали, что даже точечное изменение первичной структуры актина приводит к существенным изменениям в отдаленных участках молекулы. Поэтому надежно связать N-концевые и другие различия в аминокислотной последовательности изоактинов с различиями в их свойствах до сих пор не удалось ни с помощью ограниченного протеолиза, ни с помощью других методов. Однако находки и наблюдения, накопленные на этом пути, оказались не менее увлекательными и, возможно, более полезными. Об этих находках и наблюдениях и пойдет речь в настоящей статье. Поскольку статья написана в связи с юбилеем лаборатории В. И. Воробьева, ее задачей является рассказ о логике и результатах экспериментов, а не подробное описание экспериментальных данных. Эти данные можно найти в опубликованных статьях и обзоре (Khaitlina, 2003).

Протеаза ECP32 — фермент с уникальной специфичностью по отношению к актину

То, что в экспериментах «актиновой» лаборатории появилась протеолитическая активность, аккуратно вырезающая «коровую» часть молекулы актина, было, конечно, удивительно и чрезвычайно интересно. Но еще более интересными оказались свойства протеазы, которая была выделена из «протеолитически-активного раствора», и свойства актина, расщепленного этой протеазой.

Протеаза ECP32 — новая бактериальная металлопротеиназа. Бактерии, обладающие расщепляющей актин протеолитической активностью, были определены с помощью стандартных микробиологических тестов как атипичный штамм *Escherichia coli* A2 (Усманова, Хайтлина, 1989). Из этих бактерий был выделен фермент (Усманова, Хайтлина, 1989; Matveyev et al., 1996; Морозова и др., 2001, 2009), состоящий из одной полипептидной цепи с мол. массой 32 кДа, названный протеазой ECP32 (*E. coli* protease, 32 kDa). После очистки небольшого количества ECP32 были определены некоторые свойства ферmenta и его N-концевая аминокислотная последовательность — AKTSSAGVVIRDIFL (Matveyev et al., 1996). Любопытно, что начало последовательности (АКТ...) совпадает с началом слова АКТИН. Компьютерный поиск не выявил значимого сходства этой последовательности ни с одной известной последовательностью. Используя в качестве субстрата актин, гистон H5 и мелиттин, мы определили, что оптимум активности ECP32 находится в диапазоне pH 7—8, активность ингибируется o-фенатролином, EDTA и EGTA и специфическим ингибитором Zn-содержащих металлопротеиназ цинконом. Эти свойства позволяли заключить, что протеаза ECP32 — это новая нейтральная металлопротеиназа (Matveyev et al., 1996).

Субстратная специфичность ECP32. Наиболее интересным свойством этой протеазы оказалась ее высокая субстратная специфичность. При соотношении фермента к субстрату от 1 : 25 до 1 : 3000 актин расщепляется протеазой только в одном сайте, между Gly42 и Val43, при этом образуются фрагменты с кажущимися мол. массами 36 и 8 кДа (рис. 1) (Khaitlina et al., 1991; Matveyev et al., 1996; Mirgorodskaya et al., 1996). Этот сайт не расщепляется коммерчески доступными протеазами. При добавлении ECP32 к актину при соотношении 1 : 5 наблюдалось образование фрагмента с мол. массой приблизительно 32—33 кДа.

Среди нескольких десятков проверенных нативных белков протеаза ECP32 расщепляет кроме актина только мелиттин, гистоны (в том числе гистоноподобный белок бактерий HU) и белок теплового шока бактерий DnaK. Протеолиз мелиттина и DnaK ограничен. Однако ни белок теплового шока эукариот HSP70, обладающий сходной с актином третичной структурой АТФ-связывающего домена, ни многие другие белки (альбумин, лизоцим, РНКаза, ДНКаза I, миозин, α-актинин, тропомиозин, тропонин, винкулин, тубулин, гельзолин, профилин, инсулин, проинсулин и др.) протеазой ECP32 не расщепляются (Усманова, Хайтлина, 1989; Казанина и др., 1995; Matveyev et al., 1996; Морозова и др., 2001). Все аминокислотные остатки, которым принадлежит гидроксильная группа пептидной связи, расщепляемой протеазой в актине и мелиттине, содержат гидрофобные боковые цепи. Подобная специфичность характерна для термолизиноподобных металлопротеиназ (Rawlings, Burgett, 1995). Аминогруппа этих связей принадлежит небольшим нейтральным или гидрофобным аминокислотным остаткам, что характерно для эластизы и сигнальных пептидаз (Rawlings, Burgett, 1995). Однако ни в актине, ни в мелиттине аналогичные и близко расположенные сайты не атакуются протеазой ECP32. По-видимому, для протеазы ECP32 конформация субстрата более существенна, чем его первичная структура.

Изменение свойств актина в результате его расщепления ECP32. Сайт расщепления актина протеазой ECP32 находится в так называемой ДНКазной петле (остатки 32—52, рис. 1), которая активно вовлечена в контакты между мономерами в полимере актина (Holmes et al., 1990; Egelman, 2003; Reisler, Egelman, 2007) и является одной из наиболее конформационно-подвижных структурных элементов молекулы (Strzelecka-Gołaszewska, 2001; Reisler, Egelman, 2007). Фрагменты актина с мол. массами 36 и 8 кДа, образующиеся в результате гидролиза пептидной связи Gly42—Val43, остаются нековалентно связанными друг с другом и не подвергаются дальнейшему протеолизу, так что молекула сохраняет нативную конформацию (Khaitlina et al., 1991, 1993). Несмотря на это, расщепленный актин полностью теряет способность к полимеризации и ингибицию ДНКазы I, если он содержит Ca^{2+} в качестве прочно связанного катиона (Khaitlina et al., 1988, 1991). Этот эффект качественно отличает протеолиз актина протеазой ECP32 от действия химотрипсина и (или) субтилизина, которые расщепляют актин в той же ДНКазной петле, что сделало ECP32-расщепленный актин (ECP-актин) уникальной моделью для изучения механизмов полимеризации актина.

Способность ECP-актина к полимеризации и ингибированию ДНКазы I частично восстанавливается при замещении прочно связанного Ca^{2+} на Mg^{2+} (рис. 2, a). Однако расщепление повышает критическую концентрацию по-

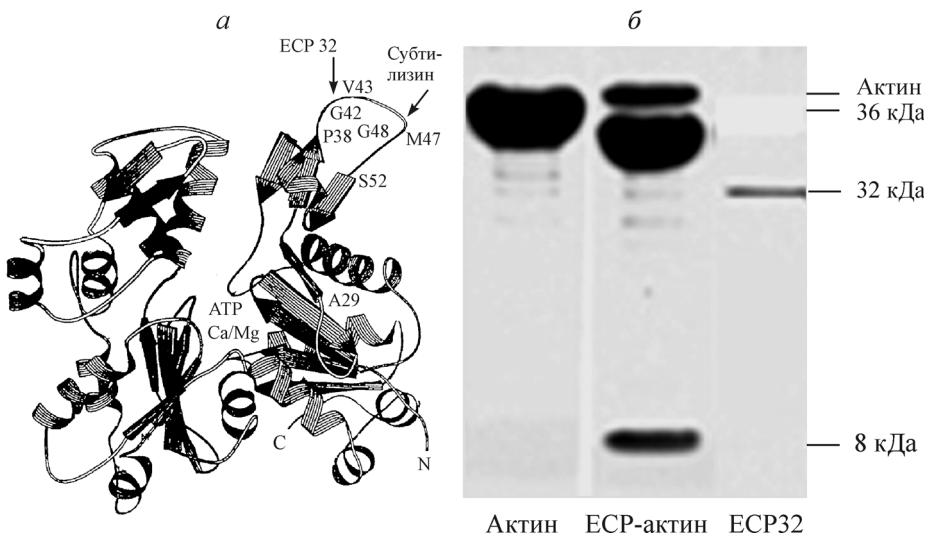


Рис. 1. Протеолиз актина протеазой ECP32.

Открытая нами бактериальная протеаза ECP32 расщепляет в молекуле актина только одну полипептидную связь Gly42—Val43 (*а*), которая не расщепляется другими известными протеазами, например субтилизином. На схематическом изображении трехмерной структуры актина (по: Holmes et al., 1990) обозначены аминокислотные остатки, образующие ДНКазную петлю и сайты расщепления протеазой ECP32 и субтилизином. В результате протеолиза образуются два фрагмента, подвижность которых при SDS-электрофорезе соответствует мол. массам 36 и 8 кДа (*б*). На электрофорограмме обозначены актин, фрагменты расщепленного актина (ECP-актин) и протеаза ECP32 (ECP32). По: Khaitlina et al., 1991; Matveyev et al., 1996, с модификациями.

лимеризации ECP-Mg-актина в 30 раз и увеличивает стационарную АТФазную активность полимера, отражающую обмен его субъединиц, в 20—30 раз (Khaitlina et al., 1993; Khaitlina, Strzelecka-Gołaszewska, 2002). Этот эффект обусловлен увеличением скорости ассоциации и диссоциации мономеров на концах нитей актина, что в свою очередь связано с тем, что в результате гидролиза связи Gly42—Val43 актин приобретает более открытую конформацию (открытую междоменную щель) (Khaitlina, Strzelecka-Gołaszewska, 2002). Интересно, что кристаллическая структура ECP-актина не отличается от структуры немодифицированного актина и является закрытой (Klenchin et al., 2006). По-видимому, соль и преципитанты, необходимые для кристаллизации, стабилизируют актин только в одной из возможных конформаций, и эта закры-

тая конформация может отличаться от той, которую глобулярный актин имеет в растворе (Klenchin et al., 2006). Конформация мономеров ECP-актина в составе полимера также остается открытой (Khaitlina, Strzelecka-Gołaszewska, 2002). Кроме того, в полимерах ECP-актина вследствие аллостерических эффектов (Khaitlina, Hinssen, 1997; Kuznetsova et al., 1997) нарушены мономер-мономерные контакты, включающие в себя C-конец молекулы (Khaitlina et al., 1993).

Таким образом, расщепление протеазой ECP32 единственной пептидной связи вызывает локальные конформационные изменения мономеров актина, в результате которых взаимодействие между мономерами становится недостаточным для образования полимеров или образуются полимеры с повышенной динамичностью. Эти ре-

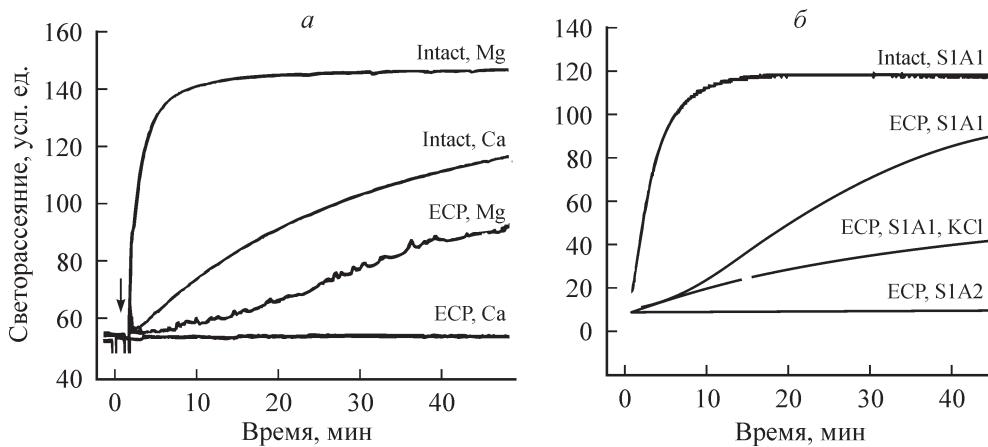


Рис. 2. Полимеризация актина, расщепленного протеазой ECP32.

а — протеолитически модифицированный актин не полимеризуется, если он содержит прочно связанный Ca^{2+} , но частично восстанавливает способность к полимеризации при замещении Ca^{2+} на Mg^{2+} ; ECP, Ca и ECP, Mg — ECP-актин, содержащий прочно связанный Ca^{2+} или Mg^{2+} соответственно, Intact, Ca и Intact, Mg — то же самое для немодифицированного актина. *б* — субфрагменты S1 миозина способствуют полимеризации ECP Ca^{2+} -актина. ECP, S1A1 и ECP, S1A2 — комплексы ECP-актина с изовариантами субфрагмента S1 миозина, отличающиеся друг от друга составом легких цепей. По: Khaitlina et al., 1993; Wawro et al., 2005, с модификациями.

зультаты впервые выявили ключевую роль N-концевой части ДНКазной петли, включающей в себя сайт Gly42—Val43, в актин-актиновом взаимодействии в полимере.

Актинсвязывающие белки стабилизируют полимеры ECP-актина. Известно, что динамика актиновых филаментов регулируется множеством актинсвязывающих белков (Pantalone et al., 2001; Chhabra, Higgs, 2007). Механизм этой регуляции может быть основан на влиянии актинсвязывающего белка на конформацию мономерного актина или субъединиц в полимере, и обратимость потери способности ECP-актина к полимеризации чрезвычайно удобна для изучения таких влияний. Оказалось, что гельзолин восстанавливает способность ECP-актина взаимодействовать с другим мономером и, следовательно, включаться в полимер, что коррелирует с аллостерическим эффектом изменения конформации ДНКазной петли актина в его комплексах с гельзолином (Khaitlina, Hinszen, 1997). Более эффективную стабилизацию полимеров ECP-актина вызывают субфрагмент 1 миозина (рис. 2, *б*) (Wawro et al., 2005) и тропомиозин (Khaitlina, Strzelecka-Gołaszewska, 2003). Эти результаты показали, что актинсвязывающие белки могут восстанавливать полимеризацию актина, нарушенную протеолитической модификацией.

Зачем бактериям нужна протеаза ECP32?

Является ли актин природным субстратом протеазы ECP32? Долгое время считали, что бактерии не содержат актина ни в глобуллярной форме, ни в виде филаментов. Оказалось, однако, что кристаллическая структура белка MreB, который образует подмембранные филаменты в *Bacillus subtilis* и некоторых других бактериях, сходна со структурой актина (Van den Ent et al., 2001). Хотя гомология аминокислотной последовательности MreB с актином составляет всего 15 %, молекула MreB содержит все элементы вторичной и пространственной структуры актина, за исключением нескольких вставок, содержащихся только в актине. Одной из этих вставок является аминокислотная последовательность, образующая ДНКазную петлю. Предполагают, что из-за отсутствия

ДНКазной петли, петли 262—274 и С-концевого сегмента, которые образуют контакт между двумя тяжами спирального полимера актина (Holmes et al., 1990), мономеры MreB образуют двумерные нити, соответствующие одному из тяжей актина (Egelman, 2001, 2003; Van den Ent et al., 2001). Отсутствие в MreB ДНКазной петли указывает на то, что бактериальный актиноподобный белок MreB вряд ли является природным субстратом протеазы ECP32. То же самое относится к другому бактериальному гомологу актина — белку ParM, который участвует в сегрегации плазмид. Этот белок также не содержит ДНКазной петли с сайтом, который ECP32 расщепляет в актине (Van den Ent et al., 2002; Egelman, 2003).

С другой стороны, протеаза ECP32 не расщепляет другие участки ДНКазной петли, аминокислотные последовательности которых соответствуют первичной специфичности металлопротеиназ. По-видимому, специфичность протеолиза определяется стерическим соответствием фермента и N-концевого сегмента петли. Это соответствие указывает на то, что функции протеазы ECP32 могут лежать вне бактериальной клетки.

Бактерии-продуценты ECP32 способны к инвазии. Микробиологическая идентификация штамма-продуцента протеазы ECP32 неожиданно выявила удивительное сходство этого штамма с мутантом *Shigella flexneri*, полученным в результате обработки патогенных бактерий фуразолидоном *in vitro*. При этом в дополнение к сходству морфологических и биохимических особенностей мутант синтезировал металлопротеиназу, которая расщепляла актин так же, как протеаза ECP32 (Федорова, Хайтлина, 1990). Известно, что *Sh. flexneri* может инвазировать в эукариотические клетки и что в этом процессе интенсивно используется их цитоскелет (Theriot, 1995; Sansonetti, 2001; Cossart, Sansonetti, 2004). Поэтому мы решили проверить, способны ли к инвазии бактерии-продуценты протеазы ECP32.

Поиски ответа на этот вопрос привели нас к открытию инвазивной способности непатогенных бактерий-продуцентов протеазы. Методами электронной и флуоресцентной микроскопии мы показали, что бактерии штамма *E. coli* A2 способны проникать в клетки карциномы Нер-2 и вызывать реорганизацию их цитоскелета (Еф-

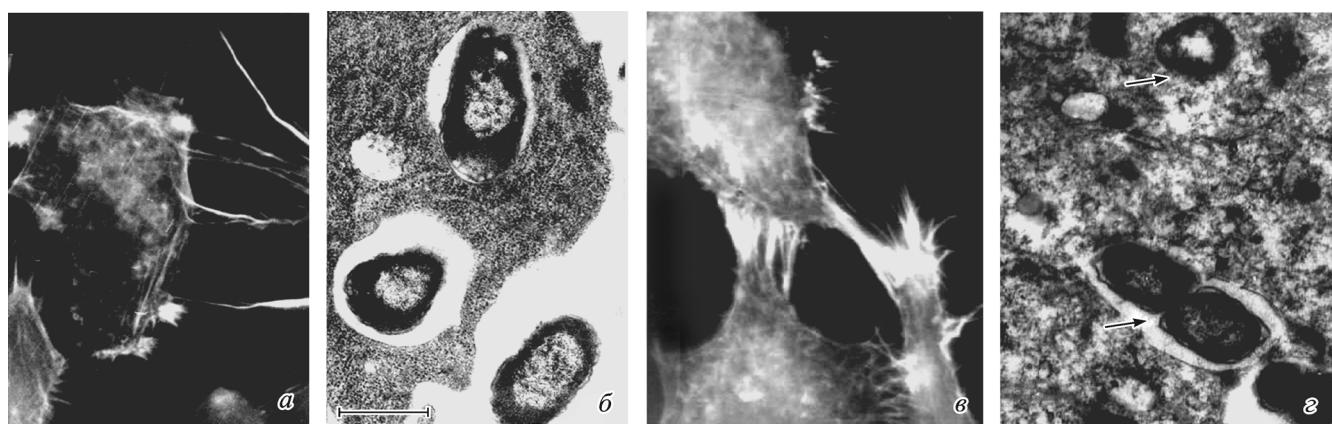


Рис. 3. Инвазия бактерий в эукариотические клетки.

Непатогенные бактерии, синтезирующие протеазу ECP32, способны проникать в трансформированные клетки *in vitro* и вызывать реорганизацию их цитоскелета. *а, б* — клетки эпидермоидной карциномы горлана человека Нер-2 после инкубации с бактериями *Serratia grimesii* A2 (ранее *E. coli* A2). *в, г* — клетки Нер-2 после инкубации с бактериями мутантного штамма *Shigella flexneri* 5a2c, полученного под действием фуразолидона. *а, в* — флуоресцентная микроскопия, актиновые структуры окрашены родамин-фalloидином; *б, г* — электронная микроскопия. По: Efremova et al., 2001; Ефремова и др., 2004, с модификациями.



Рис. 4. Схема, иллюстрирующая сходство и различия первичной структуры гримелизина и протеализина.

Гримелизин (*Gri*) и протеализин (*Ptl*) содержат одинаковое количество аминокислотных остатков, идентичный пропептид (остатки 1—50) и идентичный Zn-связывающий мотив HELAH. Однако гримелизин отличается от протеализина 8 остатками, 3 из которых образуют кластер в N-концевом сегменте молекулы. По: Bozhkina et al., 2008.

ремова и др., 1998; Efremova et al., 2001). Кроме того, оказалось, что бактерии проникали в трансформированные эпителиальные клетки и фибробласты (A431, HeLa и 3T3-SV40), но не обнаруживались в первичных эмбриональных фибробластах, первичных кератиноцитах человека и в клетках слабо трансформированной клеточной линии 3T3. Эти данные указывают на то, что чувствительность клеток к инвазии зависит от степени их трансформированности (рис. 3, а, б) (Efremova et al., 2001). Такие же выводы были сделаны ранее в связи с инвазией бактерий *Listeria monocytogenes* (Velge et al., 1995), механизм инвазии которых отличается от механизма инвазии энте-роактерий.

Корреляция между синтезом протеазы ECP32 и способностью бактерий, синтезирующих протеазу, проникать в эукариотические клетки была также обнаружена в бактериях мутантного штамма *Sh. flexneri*, полученного под действием фуразолидона (рис. 3, в, г) (Ефремова и др., 2004), и в бактериях, выделенных из клинических изолятов пациентов, длительно принимавших фуразолидон. Совокупность этих результатов позволяет предположить, что протеаза ECP32 играет роль в бактериальной инвазии. Однако для доказательства участия ECP32 в инвазии были необходимы прямые эксперименты. В частности, нужно было проверить, теряется ли способность к инвазии после нокаута соответствующего гена и появляется ли она при введении гена в неинвазионные бактерии. Клонирование гена протеазы ECP32 позволило бы также получить рекомбинантный вариант протеазы для более детального исследования свойств фермента. Выполнение этих планов стало началом нового этапа нашей работы.

Как протеаза ECP32 превратилась в гримелезин

Клонирование гена протеазы ECP32 и выявление гримелизина. Для определения нуклеотидной последовательности гена протеазы ECP32 были предприняты попытки получения фрагментов гена с помощью ПЦР с вырожденным праймером к известному N-концевому сегменту ECP32. Однако синтезированные фрагменты не обнаруживались в геноме *E. coli*, хотя он полностью секвенирован. Этот факт и возможность использования современных автоматизированных биохимических и молекулярно-биологических методов идентификации бактерий, появившаяся на базе современной работы в Институте микробиологии и гигиены Charite в Берлине, привели нас к дополнительному исследованию систематического положения штамма-продуцента протеазы ECP32. Проведенные эксперименты показали, что по набору из 48 биохимических характеристик автоматизированной системы биохимических тестов Vitek-2 (BioMérieux) и нуклеотидной последовательности гена 16S-рРНК штамм-про-

дущент протеазы ECP32 практически идентичен энтеробактериям *Serratia grimesii* (Bozhokina et al., 2008).

Поскольку видовая принадлежность бактерий-продуцентов протеазы ECP32 изменилась, нужно было выяснить, описаны ли металлопротеиназы бактерий семейства *Serratia* и содержит ли ECP32-подобная протеаза в бактериях референтного штамма *S. grimesii*. Поиск литературы, предпринятый для ответа на первый вопрос, выявил работу, описывающую протеализин из *S. proteamucilans* — термолизиноподобную металлопротеиназу семейства MEROPS M4 (Demidyuk et al., 2006). N-концевая последовательность и некоторые свойства активной формы протеализина оказались сходными с таковыми ECP32. Эта находка огорчила нас, но в то же время оказалась очень удачной. Последовательность гена протеализина (Demidyuk et al., 2006) была использована для обнаружения гена протеазы ECP32 в референтном штамме *S. grimesii* DSMZ 30063 и в штамме-продуценте ECP32 *S. grimesii* A2 (бывшем ранее *E. coli* A2). Обнаруженный ген был клонирован, секвенирован и экспрессирован в *E. coli* K12 (Bozhokina et al., 2008).

Белок, кодируемый обнаруженным геном, гомологичен протеализину по аминокислотной последовательности и особенностям первичной структуры. Полноразмерный фермент содержит 50-аминокислотный пропептид, идентичный пропептиду протеализина, Zn-связывающий мотив HELAH, характерный для металлопротеаз, и четыре Ca-связывающих сайта (Bozhokina et al., 2008). Однако этот белок отличается от протеализина восемью аминокислотными заменами, расположенными на поверхности молекулы. Часть этих замен образует кластер в N-концевом сегменте активной формы фермента (рис. 4). Эти различия указывают на то, что металлопротеиназа *S. grimesii* не является протеализином.

Лизаты бактерий, в которых экспрессировался ген, расщепляли актин с образованием фрагмента с мол. массой 36 кДа, N-концевая последовательность которого Val—Met—Val—Gly—Met—Gln соответствует сайту расщепления актина Gly42—Val43 протеазой ECP32 (Khaitlin et al., 1991). Аналогично расщепляют актин лизаты бактерий референтного штамма *S. grimesii* DSMZ 30063. Протеолиз актина ингибируется ЭДТА и *o*-фенантролином, что в сочетании со сходством протеазы из *S. grimesii* с протеализином позволяет отнести фермент к классу термолизиноподобных металлопротеиназ MEROPS M4. По аналогии с протеализином металлопротеиназа *S. grimesii* была названа гримеллизином (Bozhokina et al., 2008).

Гримелизин, обнаруженный нами в *S. grimesii*, сходен с ECP32 по молекулярной массе, последовательности N-концевого фрагмента, способности ограниченно расщеплять актин в сайте Gly42—Val43 и чувствительности расщепления к действию хелаторов. Эти данные указывают на то, что гримелизин и ECP32 — это один и тот же фермент.

Является ли ECP32 (гримелизин) участником процесса инвазии?

Для изучения инвазивных свойств бактерий, синтезирующих природный и рекомбинантный гримелизин, клетки эпидермоидной карциномы гортани Нер-2 инкубировали с бактериями референтного штамма *S. grimesii* или рекомбинантного штамма *E. coli* K12, экспрессирующего ген гримелизина, и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. При этом в двух сериях независимых экспериментов бактерии обоих штаммов обнаруживались в цитоплазме клеток. Бактерии контрольного штамма *E. coli* K12 с плазмидой, не содержащей гена гримелизина, в клетки Нер-2 не проникали (Божокина и др., 2007). Инвазия бактерий, которые приобрели способность проникать в эукариотические клетки в результате трансформации геном протеазы ECP32 (гримелизина), указывает на то, что ECP32 (гримелизин) является участником, а не маркером процесса инвазии.

Заключение

Клонирование гена гримелизина и синтез рекомбинантного белка поставили точку в истории, начавшейся с появления в пробирке с актином неизвестной протеолитической активности. Протеаза ECP32, превратившаяся в гримелизин, стала полноправным членом семейства термолизиноподобных металлопротеиназ M4 компьютерной базы данных MEROPS (Rawlings, Burgett, 1995). Однако в этой базе данных гримелизин рассматривается как вариант протеализина, и только детальное сравнение очищенного гримелизина с протеализином может показать, являются ли эти белки изоформами одного фермента или одним и тем же белком. Кроме того, важно выяснить, присуща ли протеализину и сохраняется ли в гримелизине высокая субстратная специфичность, описанная ранее для ECP32. И наконец, необходим более детальный анализ результатов инвазии с помощью электронной микроскопии и количественных подходов, чтобы сделать по-настоящему достоверным вывод об участии ECP32 (гримелизина) в инвазии эукариотических клеток.

Каким может быть механизм участия расщепляющей актин протеазы в процессе инвазии? Известно, что проникновение бактерий в эукариотические клетки связано с перестройками актинового цитоскелета (Lasa et al., 1998; Sansonetti, 2001; Cossart, Sansonetti, 2004). Первым этапом этого процесса является деполимеризация актина под местом контакта бактерии с клеткой, индуцируемая взаимодействием бактериального фактора с рецептором или актингвязывающим белком (Bourdet-Sicard et al., 1999). Затем происходят полимеризация актина в выростах на поверхности клетки и образование фагосомы, захватывающей бактерию. Расщепление связи Gly42—Val43 смещает динамику полимеров актина в сторону деполимеризации (Khaitlina, Strzelecka-Gołasewska, 2002), а эффективность полимеризации расщепленного актина значительно усиливается актингвязывающими белками (Khaitlina, Strzelecka-Gołasewska, 2003; Wawro et al., 2005). Кроме того, модельные эксперименты показали, что микроинъекция протеазы ECP32 в клетки амебы *Amoeba proteus* приводит к обратимой остановке двигательной активности амеб и локальным разрушениям цитоскелета, что указывает на способность ECP32 расщеплять актин *in vivo* (Морозова и др., 2001). Все эти данные

позволяют предположить, что актин является белком-мишенью, протеолиз которого способствует проникновению бактерий в клетки.

В работах, которые легли в основу этого обзора, в разные периоды времени принимали участие многие сотрудники Института цитологии РАН (А. М. Усманова, В. В. Матвеев, Т. Д. Смирнова, Т. Н. Ефремова, О. А. Миргородская, Г. А. Казанина, А. В. Морозова, А. Ю. Малинин, Н. А. Эндер, Я. Ю. Комиссарчик, М. С. Брудная, Л. В. Кевер, И. В. Матвеев и Е. С. Божокина) и других институтов, в том числе зарубежных: З. Ф. Федорова (Санкт-Петербург), John Collins (Maryland, USA), Hanna Strzelecka-Gołasewska (Warsaw, Poland), Horst Hinssen (Bielefeld, Germany), Vadim Klenchin and Ivan Rayment (Madison, USA), Thomas Adam (Berlin, Germany). Я благодарна всем коллегам за энтузиазм, профессиональное сотрудничество и за то, что я у них многому научилась. Мне хочется верить, что описание нашей работы попадется на глаза Виктору Мантуленко, в пробирке которого впервые появилась загадочная протеолитическая активность, которую мы долго называли «мантулином».

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 02-04-48253, 05-04-49604 и 08-04-00408).

Список литературы

- Ефремова Т. Н., Груздева И. Г., Матвеев И. В., Божокина Е. С., Комиссарчик Я. Ю., Федорова З. Ф., Хайтлина С. Ю. 2004. Инвазивные свойства непатогенного мутанта *Shigella flexneri* 5a2c, полученного под действием фуразолидона. Биол. эксперим. биол. мед. 137 (5) : 546—550.
- Ефремова Т. Н., Эндер Н. А., Брудная М. С., Комиссарчик Я. Ю., Хайтлина С. Ю. 1998. Реорганизация актиновых микрофиламентов в клетках НЕР-2 в результате инвазии бактерий *Escherichia coli* A2. Цитология. 40 (6) : 524—528.
- Казанина Г. А., Миргородская О. А., Миргородская Е. А., Хайтлина С. Ю. 1995. Протеиназа УСР32. Характеристика фермента, исследование специфичности. Биоорганич. химия. 21 (10) : 761—766.
- Мантуленко В. Б., Хайтлина С. Ю., Шелудько Н. С. 1982. Высокомолекулярный устойчивый к протеолизу фрагмент актина. Биохимия. 48 (1) : 69—74.
- Морозова А. В., Сковородкин И. Н., Хайтлина С. Ю., Малинин А. Ю. 2001. Бактериальная протеаза ECP32, специфически расщепляющая актин, и ее воздействие на цитоскелет *in vivo*. Биохимия. 66 (1) : 105—113.
- Усманова А. М., Хайтлина С. Ю. 1989. Протеаза из штамма бактерий *E. coli* A2, специфически расщепляющая актин. Биохимия. 54 (8) : 1308—1314.
- Федорова З. Ф., Хайтлина С. Ю. 1990. Обнаружение протеазы, специфически расщепляющей актин, у ревертантов L-формы *Shigella flexneri*. Биол. эксперим. биол. мед. 110 (7) : 46—48.
- Хайтлина С. Ю., Усманова А. М., Смирнова Т. Д., Федорова З. Ф. 1988. Штамм бактерий *Escherichia coli* A2 — продуцент нейтральной протеиназы. Авт. свид. № 1390241.
- Bourdet-Sicard R., Rudiger M., Jockusch B. M., Gounon P., Sansonetti P. J., Tvan Van Nhuem G. 1999. Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. EMBO J. 18 : 5853—5862.
- Bozhokina E. S., Khaitlina S. Yu., Adam T. 2008. Grimelysin, a novel metalloprotease from *Serratia grimesii*, is similar to ECP32. Biochem. Biophys. Res. Commun. 367 : 888—892.
- Chabra E. S., Higgs H. N. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. Nature Structural Biol. 9 : 1110—1121.

- Cossart P., Sansonetti P. J.* 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*. 304 : 242—248.
- Demiduk I. V., Kalashnikov A. E., Gromova T. Y., Gasanov E. V., Safina D. R., Zabolotskaya M. V., Rudenskaya G. N., Kostrov S. V.* 2006. Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia* proteamulans representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor. *Protein Exp. Purif.* 47 : 551—561.
- Efremova T., Ender N., Brudnaja M., Komissarchik Y., Khaitlina S.* 2001. Specific invasion of transformed cells by *Escherichia coli* A2 strain. *Cell Biol. Intern.* 25 : 557—561.
- Egelman E. H.* 2001. Molecular evolution: actin's long lost relative found. *Curr. Biol.* 11 : R1022—R1024.
- Egelman E. H.* 2003. Actin's prokaryotic homologs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 : 244—248.
- Elzinga M., Collins J. H., Kuehl W. M., Adelstein R. S.* 1973. Complete amino-acid sequence of actin from rabbit skeletal muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 70 : 2687—2691.
- Fyrberg E. A., Fyrberg C. C., Biggs J. R., Saville D., Beall C. J., Ketchum A.* 1998. Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. *Biochem. Genet.* 36 : 271—287.
- Holmes K. C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W.* 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature*. 347 : 44—49.
- Khaitlina S. Yu.* 2003. A novel actin-specific bacterial protease ECP32 — enzyme with an intriguing function. In: Protein structures: kaleidoscope of structural properties and functions. Kerala, India: Transworld Res. Network. 239—253.
- Khaitlina S. Yu., Collins J. H., Kuznetsova I. M., Pershina V. P., Synakevich I. G., Turoverov K. K., Usmanova A. M.* 1991. Physico-chemical properties of actin cleaved with bacterial protease from *E. coli* A2 strain. *FEBS Lett.* 279 : 49—51.
- Khaitlina S. Yu., Hinssen H.* 1997. Conformational changes in actin induced by its interaction with gelsolin. *Biophys. J.* 73 : 929—937.
- Khaitlina S. Yu., Moraczewska J., Strzelecka-Gołaszewska H.* 1993. The actin-actin interactions involving the N-terminal portion of the DNase I-binding loop are crucial for stabilisation of the actin filament. *Eur. J. Biochem.* 218 : 911—920.
- Khaitlina S. Yu., Smirnova T. D., Usmanova A. M.* 1988. Limited proteolysis of actin by a specific bacterial protease. *FEBS Lett.* 228 : 172—174.
- Khaitlina S. Yu., Strzelecka-Gołaszewska H.* 2002. Role of the DNase I-binding loop in dynamic properties of actin filament. *Bioophys. J.* 82 : 321—334.
- Khaitlina S. Yu., Strzelecka-Gołaszewska H.* 2003. Effects of tropomyosin on dynamics of actin filaments. *Biophys. J.* 84 (Pt 2) : 480a.
- Klenchin V. A., Khaitlina S. Yu., Rayment I.* 2006. Crystal structure of polymerization-competent actin. *J. Mol. Biol.* 362 : 140—150.
- Kuznetsova I., Antropova O., Turoverov K., Khaitlina S.* 1996. Conformational changes in subdomain 1 of actin induced by proteolytic cleavage within the DNase I-binding loop; energy transfer from tryptophan to AEDANS. *FEBS Lett.* 383 : 105—108.
- Kuznetsova I. M., Biktshev A. G., Khaitlina S. Yu., Vassilenko K. S., Turoverov K. K., Uversky V. N.* 1999. Effect of self-association on the structural organization of partially folded proteins: inactivated actin. *Biophys. J.* 77 : 2788—2800.
- Lasa I., Dehoux P., Cossart P.* 1998. Actin polymerization and bacterial movement. *Biochim. biophys. acta*. 1402 : 217—228.
- Matveyev V. V., Usmanova A. M., Morozova A. B., Khaitlina S. Yu.* 1996. Purification and characterization of the proteinase ECP32 from *Escherichia coli* A2 strain. *Biochim. biophys. acta*. 1296 : 55—62.
- McKane M., Wen K. K., Meyer A., Rubenstein P. A.* 2006. Effect of the substitution of muscle actin-specific subdomain 1 and 2 residues in yeast actin on actin function. *J. Biol. Chem.* 281 : 29 916—29 928.
- Mirgorodskaya O., Kazanina G., Mirgorodskaya E., Matveyev V., Thiede B., Khaitlina S.* 1996. Proteolytic cleavage of melittin with the actin-digesting protease. *Protein and Peptide Letters*. 3 : 81—88.
- Pantaloni D., Clainche C. L., Carlier M.-F.* 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science*. 292 : 1502—1506.
- Rawlings N. D., Burrett A. J.* 1995. Evolutionary families of metalloproteinases. *Methods Enzymol.* 248 : 183—228.
- Reisler E., Egelman E. H.* 2007. Actin structure and function: what we still do not understand. *J. Biol. Chem.* 282 : 36 133—36 137.
- Sansonetti P. J.* 2001. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 : 3—14.
- Strzelecka-Gołaszewska H.* 2001. Divalent cations, nucleotides, and actin structure. In: Molecular interactions of actin. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag. 23—41.
- Van den Ent M., Amos L. A., Lowe J.* 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*. 413 : 39—44.
- Van den Ent M., Moller-Jensen J., Amos L. A., Gerdes K., Lowe J.* 2002. F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* 21 : 6935—6943.
- Vandekerckhove J., Weber K.* 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126 : 783—802.
- Velge P., Kaeffer B., Bottreau E., Van-Langendonck N.* 1995. The loss of contact inhibition and anchorage-dependent growth are key steps in the acquisition of *Listeria monocytogenes* susceptibility phenotype by non-pathogenic cells. *Biol. Cell.* 85 : 55—66.
- Wawro B., Khaitlina S. Yu., Galinska-Rakoczy A., Strzelecka-Gołaszewska H.* 2005. Role of DNase I-binding loop in myosin subfragment 1-induced actin polymerization. Implications to the polymerization mechanism. *Biophys. J.* 88 : 2883—2896.

Поступила 8 IX 2008

THE STORY ON AN INTRIGUING ACTIN-SPECIFIC PROTEASE THAT TURNED OUT TO BE GRIMELYSIN, A MEMBER OF A RESPECTABLE FAMILY OF THERMOLYSIN-LIKE METALLOPROTEINASES

S. Yu. Khaitlina

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: skhspb@yahoo.com

The article describes a story of the discovery and properties of bacterial metalloproteinase ECP32 that cleaves actin at the only site between Gly42 and Val43. This site is intensively involved in the monomer-monomer contacts within actin filament. Cleavage with ECP32 results in a reversible loss of actin polymerizability. Therefore ECP cleaved actin has been a unique model to study mechanisms of actin polymerization and the filament dynamics, and the effects of actin-binding proteins on these processes, as well as to reveal allosteric effects in actin molecule and to determine three-dimensional actin structure that was previously determined only for the

actin-ligand complexes. Furthermore, the non-pathogenic bacteria synthesizing ECP32 were shown to penetrate in eukaryotic cells rearranging their cytoskeleton. Biochemical analysis using the Vitek-2 system and sequencing of the 16S rRNA gene reidentified the ECP32-producing strain, previously identified as *E. coli*, as *Serratia grimesii*. Bacteria of a reference strain *S. grimesii* were found to express the gene of metalloprotease that cleaves actin similarly to ECP32. The gene was cloned, sequenced and expressed in *E. coli*. The protein encoded by this gene was named grimelysin. Grimelysin shared essential characteristics of ECP32: molecular weight, limited actin proteolysis, inhibition by chelating agents, cleavage site, and the N-terminal amino acids of the active enzyme published for ECP32. These data show that grimelysin and ECP32 seem to be the same protein. As it was demonstrated by confocal microscopy the bacteria capable of synthesizing natural or recombinant grimelysin acquire invasive phenotype. The data described here allow us to suggest that actin may be a target protein which proteolysis promotes bacterial invasion.

Key words: actin, actin proteolysis, metalloproteinases, protease ECP32, grimelysin, bacterial invasion.