

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-128-133

УДК 616.932:579.222

Т.А. Полунина, Н.В. Котова, Д.В. Баданин, А.В. Федоров, О.В. Громова, Я.М. Краснов, Н.А. Осина

ПРИМЕНЕНИЕ ЗИМОГРАФИЧЕСКОГО И ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ И ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ ПРОТЕАЗ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Целью работы является применение зимографического и протеомного анализа для изучения состава и функций внутриклеточных и экстрацеллюлярных протеаз производственных штаммов *Vibrio cholerae* 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава. **Материалы и методы.** Образцы внутриклеточных протеаз получали из клеточных лизатов путем обработки бактериальных клеток ультразвуком в 9 М растворе мочевины. Фракцию экстрацеллюлярных протеаз осаждали из культуральной жидкости добавлением 50 % трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 10 % и инкубацией на льду. В качестве контроля протеолитической активности использовали лиофилизированные препараты протеиназы К и ферментного комплекса протеовибрина. Протеазы выявляли методом субстратного гель-электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле, импрегнированном 0,1 % желатином с последующей идентификацией состава белковых фракций лизатов и экзопротеинов обоих штаммов с помощью молекулярного масс-спектрометрического сканирования. **Результаты и обсуждение.** Сравнительное исследование производственных штаммов *V. cholerae* 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава с помощью зимографического и протеомного анализа показало, что наибольшая ферментативная активность выявлена в образце фракции экстрацеллюлярных протеаз штамма *V. cholerae* М41, где идентифицировано пять основных и четыре минорных зоны гидролиза желатина, причем зоны высокой интенсивности с MW 20–23 и 37–40 кДа обнаружены также в препарате протеовибрина, выделенного из культуральной жидкости этого штамма. В результате протеомного анализа исследуемых штаммов достоверно идентифицированы 66 ферментов *V. cholerae* с различной функциональной активностью, среди которых 15 ферментов обладали протеазной активностью. Высокая информативность комплекса современных методов показала возможность выявления качественных и количественных различий состава внутриклеточных и экстрацеллюлярных протеаз производственных штаммов *V. cholerae*, что предлагает эффективное средство скрининга межштаммовых различий протеазного спектра у производственных штаммов.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, зимография, протеомный анализ.

Корреспондирующий автор: Полунина Татьяна Алексеевна, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Для цитирования: Полунина Т.А., Котова Н.В., Баданин Д.В., Федоров А.В., Громова О.В., Краснов Я.М., Осина Н.А. Применение зимографического и протеомного анализа для идентификации внутриклеточных и экстрацеллюлярных протеаз производственных штаммов *Vibrio cholerae*. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 1:128–133. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-128-133

Поступила 10.01.2020. Принята к публ. 31.01.2020.

T.A. Polunina, N.V. Kotova, D.V. Badanin, A.V. Fedorov, O.V. Gromova, Ya.M. Krasnov, N.A. Osina

Application of Zymographic and Proteomic Analysis for Identification of Intracellular and Extracellular Proteases of *Vibrio cholerae* Production Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of this work was to study the composition and functions of intracellular and extracellular proteases of the production *Vibrio cholerae* strains 569B serovar Inaba and M41 serovar Ogawa using zymographic and proteomic analysis. **Materials and methods.** Samples of intracellular proteases were obtained from cell lysates by ultrasonication of bacterial cells in a 9 M urea solution. The extracellular protease fraction was precipitated from the culture liquid by adding 50 % trichloroacetic acid to a final concentration of 10 % and incubating on ice. Lyophilized preparations of proteinase K and proteovibrin enzyme complex were used as a control of proteolytic activity. Proteases were detected by substrate gel electrophoresis in 12.5 % polyacrylamide gel impregnated with 0.1 % gelatin, followed by identification of the composition of protein fractions of lysates and exoproteins of both strains using molecular mass spectrometric scanning. **Results and discussion.** A comparative study of the production strains of *V. cholerae* 569B serovar Inaba and M41 serovar Ogawa using zymographic and proteomic analysis showed that the greatest enzymatic activity was detected in the fraction of extracellular proteases sample of *V. cholerae* M41 strain, where five major and four minor zones of gelatin hydrolysis were identified, and high-intensity zones with MW 20–23 and 37–40 kDa were also found in the preparation of proteovibrin isolated from the culture fluid of that strain. As a result of proteomic analysis of the studied strains, 66 enzymes of *V. cholerae* with different functional activity were reliably identified, among which 15 enzymes had protease activity. The high information content of the complex of modern methods provided for the possibility of identifying qualitative and quantitative differences in the composition of intracellular and extracellular proteases in production strains of *V. cholerae*, which offers an effective means of screening inter-strain differences in the protease spectrum in production strains.

Key words: *Vibrio cholerae*, zymography, proteomic analysis.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Tat'yana A. Polunina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Polunina T.A., Kotova N.V., Badanin D.V., Fedorov A.V., Gromova O.V., Krasnov Ya.M., Osina N.A. Application of Zymographic and Proteomic Analysis for Identification of Intracellular and Extracellular Proteases of *Vibrio cholerae* Production Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; 1:128–133. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-128-133

Received 10.01.2020. Accepted 31.01.2020.

Polunina T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2234-2760>

Kotova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9270-523X>

Badanin D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9662-8438>

Fedorov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>.

Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Протеазы – ферменты бактерий, способные гидролизовать пептидные связи в молекулах белков, инактивировать антимикробные пептиды [1], участвовать в развитии инфекционного процесса [2], проявлять протективную и иммуномодулирующую активность [3]. В зависимости от строения активного центра протеазы подразделяются на четыре основных класса: сериновые – S, цистеиновые – C, аспартатные – A и металлопротеиназы – M. Также существует класс U для неизвестных пока протеиназ. Металлопротеазы являются наиболее разнообразным классом протеаз, их классифицируют по функциональным группам активного центра: кланы MA, MB, MC, MD и ME содержат один атом цинка, кланы MF и MH – два атома цинка, клан MG – два атома кобальта [4, 5].

К настоящему времени у *Vibrio cholerae* охарактеризовано несколько протеаз. Известно, что за основную протеолитическую активность *V. cholerae* ответственна гемагглютинин/протеаза (HA/P) с молекулярным весом (MW) 65,8 кДа. Она относится к цинковым металлопротеазам, участвует в активации А-субъединицы холерного токсина и откреплении холерных вибрионов от слизистой кишечника, что способствует их выведению и распространению инфекции [2]. Исследование аминокислотидазы (PerA) *V. cholerae* показало, что она является металлоэкзопептидазой (MW 54,617 кДа, pI 6,0) и относится к семейству лейцинаминопептидаз (LAP), т.к. катализирует гидролиз аминокислот-терминальных остатков лейцина в белках или пептидных субстратах. Показано, что кроме протеолитической активности PerA функционирует как транскрипционный репрессор в регуляторном каскаде, контролирующем экспрессию генов вирулентности *V. cholerae* [6]. Идентифицирована цинкзависимая металлопротеиназа PrtV (MW 102 кДа), обладающая цитопатическим эффектом, а также принимающая участие в активации фибринолиза и инициации иммунного ответа при кишечных инфекциях [7]. Относительно недавно у холерного вибриона обнаружена YaeL-протеаза, локализованная во внутренней мембране и ответственная за деградацию регуляторного белка вирулентности TsrP [8]. Определена роль в патогенезе развития инфекции новой трипсиноподобной кальций-зависимой сериновой протеазы с MW 59 кДа, вызывающей накопление геморрагической жидкости в кишечнике экспериментальных животных, а также развитие некротического поражения всех слоев слизистой оболочки ворсинок [9]. К числу дополнительных факторов с ферментативной активностью могут быть отнесены белки экс-

трактов наружных мембран (НМ) нетоксигенного штамма *V. cholerae* И-638 с MW 38 и 40 кДа, токсигенного штамма *V. cholerae* И-1263 с MW 120 кДа, а также ompT+ штаммов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп [10]. Кроме того, изучен протеазный спектр препаратов внутриклеточных водорастворимых протеаз вирулентных и авирулентных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп [11], а также культуральных экстрактов; рядом авторов рассматривается возможность применения протеаз холерного вибриона в качестве компонентов бесклеточных холерных вакцин [3].

В настоящее время в РосНИПЧИ «Микроб» для производства коммерческой вакцины холерной бивалентной химической таблетированной используют штаммы *V. cholerae* 569В серовара Инаба и M41 серовара Огава. Характерными особенностями этих штаммов является то, что первый из них эффективно секретирует в культуральную жидкость холерный токсин и обладает слабой протеолитической активностью, а второй – источник O1 антигена Огава, отличается высокой активностью протеаз. Компоненты вакцины, получаемые из концентрата их культуральной жидкости путем осаждения серноокислым аммонием, содержат биологически активные вещества, в том числе различные ферменты. Для характеристики их ферментативной активности используется диффузионный тест на плотных тест-средах с соответствующими субстратами [12], где протеазную активность оценивают по ширине зон гидролиза от края лунки в миллиметрах. Однако использование традиционных биохимических и спектрофотометрических методов изучения ферментов не дает полного представления о межштаммовых различиях протеазного спектра.

Одним из наиболее чувствительных и наглядных методов, позволяющих определить наличие, состав и свойства ферментов в биологических образцах, является зимография. Зимография – электрофоретическая технология, основанная на SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле), которая включает сополимеризацию полиакриламидного геля с различными белковыми субстратами, последующую реактивацию ферментов и окрашивание геля раствором Кумасси. На зимограмме зоны ферментативной активности проявляются в виде отчетливых полос лизиса субстрата на синем фоне. Информативность и универсальность зимографического анализа для широкого спектра ферментов, а также возможность его комбинации с масс-спектрометрией позволяют применять комплексный подход для выявления и характеристики индивидуальных особенностей метаболизма исследуемых штаммов.

Целью работы является применение зимографического и протеомного анализа для изучения состава и функций внутриклеточных и экстрацеллюлярных протеаз производственных штаммов *V. cholerae*.

Материалы и методы

Зимограммы внутриклеточных и экстрацеллюлярных протеаз получали на модели штаммов *V. cholerae* серовара Инаба 569В и *V. cholerae* М41 серовара Огава (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», Саратов), используемых для производства коммерческой бивалентной химической таблетированной холерной вакцины.

В качестве контроля протеолитической активности использовали лиофилизированные препараты протеиназы К (Serva, USA, MW 28,0 кДа) и ферментного комплекса протеовибрина. Протеовибрин получен из ультрафильтрата детоксицированной культуральной жидкости производственного штамма *V. cholerae* М41 серовара Огава и представляет собой хорошо растворимый в воде порошок темно-коричневого цвета с содержанием белка (55 ± 7) % и высокой протеолитической активностью, гидролизующей белки в диапазоне pH 5,6–8,5 с активностью 8000–20000 усл. ед. на 1 мг белка [13].

Культуры штаммов *V. cholerae* серовара Инаба 569В и *V. cholerae* М41 серовара Огава выращивали в бульоне LB (pH 7,6) в шейкере-инкубаторе с аэрацией в течение 18 ч при 30 и 37 °C соответственно.

Для получения внутриклеточных протеаз к осадку клеток добавляли 9 М раствор мочевины в соотношении 1 мл на 100 мг осадка клеток. Клетки ресуспендировали и обрабатывали на ультразвуковом гомогенизаторе Bioruptor UCD – 200 (Diagenode, USA) циклом озвучивания 30 с ON, 30 с OFF в течение 10 мин при частоте 60 кГц на ледяной бане. После обработки ультразвуком образцы оставляли в растворе мочевины на 2 ч при комнатной температуре, периодически встряхивая на вортексе. Для удаления клеточных оболочек образцы центрифугировали при 12 тыс. об./мин в течение 10 мин (миницентрифуга MiniSpin, Eppendorf, Germany) и диализовали против дистиллированной воды. Затем центрифугированием освобождались от осадка и отбирали супернатант, содержащий внутриклеточные протеазы.

Фракцию экстрацеллюлярных протеаз осаждали из культуральной жидкости добавлением 50 % трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 10 % и инкубацией на льду в течение 30 мин. Осадок подщелачивали суспендированием в 2 мкл 1,5 М Tris-HCl буфера pH 8,8 и растворяли в буфере для образцов или регидратации.

Концентрацию белка в пробах измеряли по методу М.М. Бредфорда на сканирующем спектрофотометре Biowave II (Biochrom, UK) при длине волны 595 нм.

Протеазы выявляли методом субстратного гель-электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле,

импрегнированном желатином (конечная концентрация 0,1 %) [14]. Пробы растворяли в буфере для образцов (10 мг Bromphenol blue в 4 мл 2 М Tris-HCl pH 8,8, 25 мл 60 % глицерина, 17,5 мл 20 % SDS, дистиллированная вода до 50 мл) в соотношении 1:3. Субстратный гель-электрофорез проводили при 4 °C, 50 В – 1 ч, 150 В – до конца прохождения красителя. Затем гели отмывали в течение 1 ч в 2,5 % водном растворе Тритона X-100 и инкубировали в 0,1 М глицин-NaOH буфере pH 8,3 при 37 °C в течение 2 ч. Зимограммы окрашивали раствором Кумасси G-250, а о наличии протеаз в образцах судили по появлению неокрашенных зон гидролиза на синем фоне.

Для протеомного анализа параллельно с зимографией проводили SDS-PAGE электрофорез в 12,5 % полиакриламидном геле по W.K. Laemmli, с последующей инвентаризацией состава белковых фракций лизатов и экзопротеинов обоих штаммов с помощью молекулярного масс-спектрометрического сканирования. Для этого из окрашенного Кумасси G-250 геля вырезали белковые полосы, соответствующие зонам гидролиза на зимограммах, нарезали на мелкие кусочки и обрабатывали методом гидролиза трипсином в геле [15]. Смеси триптических пептидов перед масс-спектрометрическим анализом разделяли с помощью системы высокоэффективной жидкостной нано-хроматографии Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, USA) на хроматографической колонке AcclaimPepMapTM100 75 μ m x 25 cm, nanoViper C18, 3 μ m, 100 Å (Thermo Fisher Scientific, USA). Масс-спектры полученных образцов определяли на tandemном масс-спектрометре класса ESI-QTOF с разрешением более 50000 FWHM на базе ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России. Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot в режиме поиска MS/MS Ion search относительно базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2016) с таксономическим ограничением для исследуемого вида микроорганизмов. В качестве варибельных модификаций выбраны карбамидометилирование цистеина, окисление метионина и ацетилирование лизина. Допустимое отклонение для масс пептидных ионов устанавливали равным 20 ppm, для фрагментарных ионов – 0,1 Da, минимальное число уникальных пептидов одного белка ≥ 2 . Белки, имеющие критерии достоверности score > 18 , считались идентифицированными надежно ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Успешное применение зимографического анализа имеет некоторые ограничения, связанные со сдвигом определения MW вследствие сополимеризации с субстратом, снижением количества протеаз в геле за счет деградации субстрата, недостаточной реактивацией фермента после субстратного гель-электрофореза и необратимой ферментативной инактивации мочевиной.

Учитывая, что многие протеазы холерного ви-

бриона термолабильны, инактивируются под действием таких денатурирующих агентов, как мочевины (>2 М) и детергент додецилсульфат натрия (SDS), на этапах приготовления образцов и проведения зимографического анализа кипячение и редуцирующие агенты были исключены. Необходимо отметить, что внутриклеточные протеазы, извлекаемые из бактерий 9 М раствором мочевины, восстанавливали ферментативную активность после освобождения от мочевины в процессе диализа. Для удаления SDS и ренатурации протеаз после субстратного электрофореза гели отмывали при комнатной температуре в течение 1 ч в 2,5 % водном растворе Тритона X-100, затем инкубировали в 0,1 М глицин-NaOH буфере pH 8,3 при 37 °C в течение 2 ч.

Зимографический анализ производственных штаммов *V. cholerae* 569B серовара Инаба и M41 серовара Огава показал присутствие в образцах лизатов этих штаммов по три полипептида, обладающих наибольшей протеолитической активностью, с MW от 34 до 75 кДа, причем наличие протеаз с MW 48–55 и 42–43 кДа отмечено во всех образцах лизатов и фракции экстрацеллюлярных протеаз (ФЭП) штамма *V. cholerae* M41. Наибольшая ферментативная активность выявлена в образце ФЭП штамма *V. cholerae* M41, где идентифицировано пять основных зон гидролиза желатина в пределах 82–110; 65–75; 48–55; 37–40; 34–36 кДа, а также четыре минорных с MW в пределах 58–60; 42–43; 30–32; 20–23 кДа. Необходимо отметить, что зоны высокой интенсивности с MW 20–23 и 37–40 кДа также обнаружены в препарате протеовибрина, выделенного из культуральной жидкости этого штамма (рисунок).

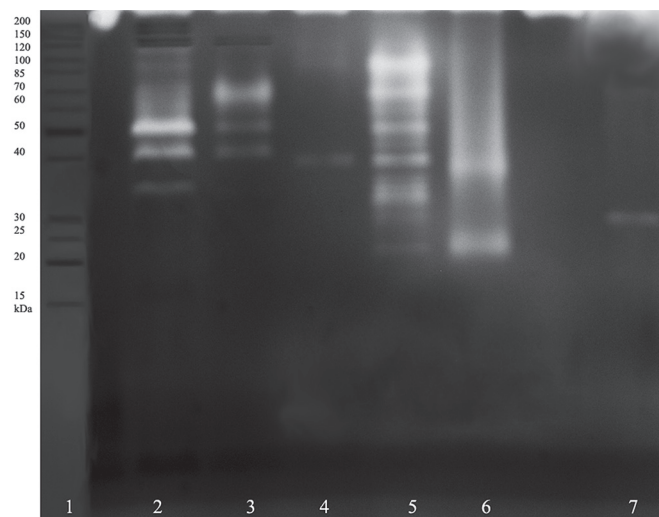
На следующем этапе в результате протеомного анализа исследуемых штаммов идентифицирован ряд ферментов *V. cholerae* с различной функциональной активностью, среди которых основную группу составляли ферменты клеточного метаболизма, участвующие в обмене жиров, белков, углеводов и нуклеиновых кислот, а также в процессах дыхания и регуляторно-генетической системы. Особый интерес вызывали 15 ферментов, обладающих протеазной активностью (таблица).

Высокая ферментативная активность производственного штамма *V. cholerae* M41 подтверждена и масс-спектрометрическим анализом. Показано, что образец ФЭП этого штамма содержал практически все идентифицированные протеазы в отличие от препарата ФЭП штамма *V. cholerae* 569B, где выявили только два фермента. В препарате протеовибрина идентифицировано шесть протеаз.

Холерный вибрион продуцирует различные протеолитические ферменты, большая часть которых относится к цинковым металлопротеазам. В таблице показано, что в результате масс-спектрометрического сканирования идентифицированы гемагглютинин/протеаза (НА/Р), группа аминопептидаз (MW 98,3; 54,5; 46,7 кДа), катализирующих отщепление единичных аминокислот от N-конца полипептидной

цепи и играющих важную роль в метаболизме биологически активных пептидов, а также лейцинаминопептидаза (LAP) с MW 54,6 кДа.

Кроме того, с помощью масс-спектрометрии нами определены еще несколько цинковых металлопротеиназ разных кланов. Так, металлопротеаза (MW 102 кДа) клана M6 по базе данных NCBI показала гомологию на 99,5 % с протеазой PrtV. Идентифицирована пептидаза клана M66 (MW 140 кДа), которая до настоящего времени изучена мало, однако известно, что она вместе с протеазой TagA (MW~115 кДа) *V. cholerae* и муциназой StcE (MW~100 кДа) *Escherichia coli* O157:H7, имеющей сходную многодоменную структуру, входит в семейство металлопротеаз клана M66 [16]. В этой группе также определена пептидаза семейства M9 (MW 92,6 кДа) клана MA, которая является микробной коллагеназой и способна расщеплять пептидные связи в определенных участках спирализованных областей коллагена, разрушая соединительнотканые барьеры организма хозяина и способствуя проникновению патогена [17]. Идентифицирована карбоксипептидаза – металлопротеаза семейства M32 (MW 55,5 кДа), отщепляющая аминокислоты с C-конца пептидов, она также относится к клану MA, типичным представителем которого является термо-стабильный термолизин [8]. Кроме того, выявлена олигопептидаза A (MW 77,0 кДа) семейства M3 с широкой специфичностью, которая играет специфическую роль в деградации сигнальных пептидов, обеспечивающих посттрансляционный транспорт



Применение 1D-зимографии для изучения спектра внутриклеточных и экстрацеллюлярных протеаз производственных штаммов *V. cholerae*:

1 – маркеры MW белков 15,0–200,0 кДа; 2 – образец лизата штамма *V. cholerae* 569B; 3 – образец лизата штамма *V. cholerae* M41; 4 – образец фракции экстрацеллюлярных протеаз (ФЭП) штамма *V. cholerae* 569B; 5 – образец ФЭП штамма *V. cholerae* M41; 6 – протеовибрин; 7 – протеиназа К

The use of 1D-zymography to explore the spectrum of intracellular and extracellular proteases of *V. cholerae* production strains:

1 – MW markers of proteins 15,0–200,0 kDa; 2 – sample of lysate of the *V. cholerae* 569B strain; 3 – a sample of lysate of the *V. cholerae* M41 strain; 4 – sample of the extracellular proteases fraction (EPF) of the *V. cholerae* 569B strain; 5 – EPF sample of the *V. cholerae* M41 strain; 6 – proteovibrin; 7 – proteinase K

Ферменты *V. cholerae* с протеазной активностью, идентифицированные масс-спектрометрическим анализом
V. cholerae enzymes with protease activity, identified with the help of mass spectrometer analysis

Номер доступа в базе данных NCBI (<i>V. cholerae</i>) Accession No in NCBI (<i>V. cholerae</i>)	Коэффициент достоверности (score) Confidence coefficient (score)	MW (Da)	pI	Кол-во уникальных пептидов Number of unique peptides	Название белка Protein	Локализация в образце штамма <i>V. cholerae</i> Localization in <i>V. cholerae</i> strain sample		
						Протеовибрин Proteovibrin	ФЭП М41 EPF M41	ФЭП 569В EPF 569B
OLZ29003.1	90	139992	5.19	7	Peptidase M66	-	+	-
OLZ26715.1	3008	101807	5.06	62	Protease PrtV	+	+	+
OLZ28540.1	257	98342	5.35	10	Aminopeptidase N	-	+	-
OLZ28128.1	98	92619	5.19	2	Peptidase M9	-	+	-
OLZ28072.1	96	88004	5.52	4	Endopeptidase La	-	+	-
OLZ28375.1	88	76932	5.12	7	Oligopeptidase A	-	+	-
OLZ29083.1	5884	65834	5.20	107	Hemagglutinin protease	+	+	-
OLZ28127.1	110	59141	5.82	8	Serine protease	-	+	-
OLZ26381.1	123	57275	5.94	2	Alkaline serine protease	+	-	-
OLZ27125.1	90	55532	5.77	3	Carboxypeptidase M32	-	+	-
OLZ27623.1	154	54583	6.36	9	Leucyl aminopeptidase	-	+	-
OLZ28934.1	4517	54523	5.24	75	Aminopeptidase	+	+	-
OLZ28935.1	3157	51763	5.36	61	Peptidase	+	+	-
OLZ27145.1	77	48179	5.74	5	Serine endoprotease DegQ	-	+	-
OLZ27073.1	179	46729	5.58	4	Aminopeptidase PepB	+	+	+

белка в соответствующую органеллу клетки [18].

В результате масс-спектрометрического анализа идентифицирована группа сериновых протеаз, в том числе трипсиноподобные протеаза с MW 59,0 кДа и пептидаза с MW 51,8 кДа, относящаяся к семейству пептидаз S1 клана PA. Они отличаются содержанием в активном центре молекулы серина и потерей активности под действием фенилметилсульфонил фторида (PMSF). В этой группе также определены две внутриклеточные сериновые протеазы, которые играют важную регуляторную роль и отвечают за деградацию денатурированных или аномальных белков с нарушенной конформационной структурой, накапливающихся в периплазматическом пространстве бактерий в результате воздействия теплового шока или других стрессовых условий. Это эндопротеаза DegQ с MW 48,2 кДа (подсемейство протеаз Do клана PS), которая изучена мало, однако известно, что типичным представителем этого подсемейства является периплазматическая протеаза DegP, известная как протеаза Do *E. coli*. Протеазы DegQ и DegP имеют субклеточную локализацию, одинаковый размер, сходную аминокислотную последовательность (до 60 %) и субстратную специфичность. Оба фермента имеют MW около 50 кДа, однако в растворе могут существовать в виде крупных олигомерных комплексов с MW примерно 300 и 500 кДа, вероятно, образующихся в результате димеризации и тетрамеризации тримеров [19]. Кроме того, АТФ-зависимая сериновая Lon или La эндопептидаза (MW 88 кДа), которая кодируется геном *lon*. По литературным данным, фермент имеет три домена: N-концевой домен, участвующий в связывании и олигомеризации бел-

кового субстрата; центральный домен АТФазы (A), содержащий мотивы АТФ-связывания; и С-концевой (P) домен, содержащий протеолитический активный сайт, образованный диадой Ser-Lys [20].

Следовательно, протеолитические ферменты холерного вибриона, помимо выполнения жизненно важной трофической функции, играют ключевую роль в процессах клеточной дифференциации, катализируют множество реакций, участвуя в различных деструктивных процессах, связанных с инвазией и утилизацией аномальных белков, а также осуществляют селективный протеолиз, связанный с изменением метаболизма клетки.

Таким образом, сравнительное исследование производственных штаммов *V. cholerae* 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава с помощью зимографического анализа в сочетании с молекулярным масс-спектрометрическим сканированием показало возможность выявления качественных и количественных различий состава внутриклеточных и экстрацеллюлярных протеаз, наглядно подтверждая их фенотипическую характеристику. Высокая информативность комплекса современных методов предлагает эффективное средство скрининга межштаммовых различий протеазного спектра у производственных штаммов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Козлов С.Н., Николаев В.Б., Марков Е.Ю., Миронова Л.В., Урбанович Л.Я. Протеолитическое расщепление иммуно-

глобулинов G субклеточными фракциями *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. *Acta Biomedica Scientifica*. 2013; 6:145–8.

2. Shinoda S. Proteases produced by *Vibrio cholerae* and other pathogenic vibrios: pathogenic roles and expression. In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., editors. *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholerae*. New York: Springer; 2011. P. 245–58. DOI: 10.1007/978-1-60327-265-0_14.

3. Stewart-Tull D.E., Bleakley C.R., Galloway T.S. Characteristics of *Vibrio cholerae* proteinases: potential, candidate vaccine antigens. *Vaccine*. 2004; 22(23–24):3026–34. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.02.012.

4. Балабан Н.П. Металлопротеазы бактерий. Классификация, структурные особенности и термостабильность белков. *Ученые записки Казанского государственного университета. Серия: Естественные науки*. 2007; 149(2):6–23.

5. Балабан Н.П., Рудакова Н.Л., Сабирова А.Р., Ильинская О.Н., Шарипова М.Р. Металлоэндопептидазы клана метцинкинов: классификация, свойства, структурные особенности. *Ученые записки Казанского государственного университета. Серия: Естественные науки*. 2010; 152(2):57–77.

6. Lutfullah G., Azhar N., Amin F., Khan Z., Azim M.K., Shouqat K., Noor S., Ali R. Structural bioinformatics of *Vibrio cholerae* aminopeptidase A (PepA) monomer. *Protein Pept. Lett.* 2009; 16:36–45. DOI: 10.2174/092986609787049484.

7. Vaitkevicius K., Rompikuntal P.K., Lindmark B., Vaitkevicius R., Song T., Wai S. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae* – purification and properties. *FEBS J.* 2008; 275(12):3167–77. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06470.x.

8. Козлов С.Н. Протеолитические ферменты *Vibrio cholerae* и близкородственных бактерий рода *Vibrio*. Иркутск; 2011. 27 с.

9. Syngkon A., Elluri S., Koley H., Rompikuntal P., Saha D., Chakrabarti M. Studies on a novel serine protease of a Δ hapA Δ prtV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PLoS One*. 2010; 5(9):e13122. DOI: 10.1371/journal.pone.0013122.

10. Козлов С.Н., Николаев В.Б., Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В. Мембраносвязанные протеазы ompT+ и ompT- штаммов холерного вибриона. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2013; 2:3–12.

11. Козлов С.Н., Николаев В.Б., Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я. Зимографический анализ водорастворимых протеаз *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. *Acta Biomedica Scientifica*. 2013; 2(2):139–43.

12. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Киреев М.Н., Белякова Н.И., Клокова О.Д. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2002; 1(83):148–53.

13. Громова О.В., Кузьмиченко И.А., Нижегородцев С.А., Киреев М.Н., Корсуков В.Н. Новый способ получения комплекса ферментов холерного вибриона-протеовибрина с помощью ультрафильтрации. *Бюллетень ВНИИ СО РАМН*. 2012; 5(87):201–5.

14. Lantz M.S., Ciborowski P. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods Enzymol.* 1994; 235:563–94. DOI: 10.1016/0076-6879(94)35171-6.

15. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteome. *Nature protocols*. 2006; 1(6):2856–60. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.

16. Yu A.C.Y., Worrall L.J., Strynadka N.C.J. Structural insight into the bacterial mucinase StcE essential to adhesion and immune evasion during enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Structure*. 2012; 20(4):707–17. DOI: 10.1016/j.str.2012.02.015.

17. Rawlings N.D., Barrett A.J. Evolutionary families of metalloproteases. *Methods Enzymol.* 1995; 248:183–228. DOI: 10.1016/0076-6879(95)48015-3.

18. Conlin C.A., Miller C.G. Dipeptidyl carboxypeptidase and oligopeptidase A from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol.* 1995; 248:567–79. DOI: 10.1016/0076-6879(95)48036-6.

19. Kolmar H., Waller P.R., Sauer R.T. The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J. Bacteriol.* 1996; 178(20):5925–9. DOI: 10.1128/jb.178.20.5925-5929.1996.

20. Chung C.H., Goldberg A.L. Lon-Apeptidase, Endopeptidase La. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2013; 3:3527–33. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00781-X.

3. Stewart-Tull D.E., Bleakley C.R., Galloway T.S. Characteristics of *Vibrio cholerae* proteinases: potential, candidate vaccine antigens. *Vaccine*. 2004; 22(23–24):3026–34. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.02.012.

4. Balaban N.P. [Metalloproteases of bacilli. Classification, structural features and thermal stability of proteins]. *Uchenyye Zapiski Kazanskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Yestestvennyye Nauki [Scientific Notes of Kazan State University. Series: Natural Sciences]*. 2007; 149(2):6–23.

5. Balaban N.P., Rudakova N.L., Sabirova A.R., Il'inskaya O.N., Sharipova M.R. [Metalloendopeptidases of the metzincin clan: classification, properties, structural features]. *Uchenyye Zapiski Kazanskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Yestestvennyye Nauki [Scientific Notes of Kazan State University. Series: Natural Sciences]*. 2010; 152(2):57–77.

6. Lutfullah G., Azhar N., Amin F., Khan Z., Azim M.K., Shouqat K., Noor S., Ali R. Structural bioinformatics of *Vibrio cholerae* aminopeptidase A (PepA) monomer. *Protein Pept. Lett.* 2009; 16:36–45. DOI: 10.2174/092986609787049484.

7. Vaitkevicius K., Rompikuntal P.K., Lindmark B., Vaitkevicius R., Song T., Wai S. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae* – purification and properties. *FEBS J.* 2008; 275(12):3167–77. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06470.x.

8. Kozlov S.N. [Proteolytic enzymes of *Vibrio cholerae* and closely related bacteria of the genus *Vibrio*]. Иркутск; 2011. 27 p.

9. Syngkon A., Elluri S., Koley H., Rompikuntal P., Saha D., Chakrabarti M. Studies on a novel serine protease of a Δ hapA Δ prtV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PLoS One*. 2010; 5(9):e13122. DOI: 10.1371/journal.pone.0013122.

10. Kozlov S.N., Nikolaev V.B., Markov E.Yu., Urbanovich L.Ya., Mironova L.V. [Membrane-bound proteases of ompT+ and ompT- strains of cholera vibrio]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2013; 2:3–12.

11. Kozlov S.N., Nikolaev V.B., Markov E.Yu., Urbanovich L.Ya. [Demographic analysis of water-soluble proteases of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups]. *Acta Biomedica Scientifica*. 2013; 2(2):139–43.

12. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Dzheparidze M.N., Kireev M.N., Belyakova N.I., Klokova O.D. [Test media for determining the activity of trypsin, protease and phospholipase in cholera chemical vaccine and its components]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2002; 1(83):148–53.

13. Gromova O.V., Kuz'michenko I.A., Nizhegorodtsev S.A., Kireev M.N., Korsakov V.N. [A new method for the production of a complex of cholera vibrio proteovibrin enzymes using ultrafiltration]. *[Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the RAMS Siberian Branch]*. 2012; 5(87):201–5.

14. Lantz M.S., Ciborowski P. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods Enzymol.* 1994; 235:563–94. DOI: 10.1016/0076-6879(94)35171-6.

15. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteome. *Nature protocols*. 2006; 1(6):2856–60. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.

16. Yu A.C.Y., Worrall L.J., Strynadka N.C.J. Structural insight into the bacterial mucinase StcE essential to adhesion and immune evasion during enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Structure*. 2012; 20(4):707–17. DOI: 10.1016/j.str.2012.02.015.

17. Rawlings N.D., Barrett A.J. Evolutionary families of metalloproteases. *Methods Enzymol.* 1995; 248:183–228. DOI: 10.1016/0076-6879(95)48015-3.

18. Conlin C.A., Miller C.G. Dipeptidyl carboxypeptidase and oligopeptidase A from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol.* 1995; 248:567–79. DOI: 10.1016/0076-6879(95)48036-6.

19. Kolmar H., Waller P.R., Sauer R.T. The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J. Bacteriol.* 1996; 178(20):5925–9. DOI: 10.1128/jb.178.20.5925-5929.1996.

20. Chung C.H., Goldberg A.L. Lon-Apeptidase, Endopeptidase La. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2013; 3:3527–33. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00781-X.

Authors:

Polunina T.A., Kotova N.V., Badanin D.V., Fedorov A.V., Gromova O.V., Krasnov Ya.M., Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Полунина Т.А., Котова Н.В., Баданин Д.В., Федоров А.В., Громова О.В., Краснов Я.М., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

References

1. Kozlov S.N., Nikolaev V.B., Markov E.Yu., Mironova L.V., Urbanovich L.Ya. [Proteolytic fermentation of immunoglobulins G by sub-cellular fractions of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups]. *Acta Biomedica Scientifica*. 2013; 6:145–8.

2. Shinoda S. Proteases produced by *Vibrio cholerae* and other pathogenic vibrios: pathogenic roles and expression. In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., editors. *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholerae*. New York: Springer; 2011. P. 245–58. DOI: 10.1007/978-1-60327-265-0_14.