

На правах рукописи



Марданова Айслу Миркасымовна

**НОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И
ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ: ХАРАКТЕРИСТИКА,
СВОЙСТВА И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

03.02.03 – Микробиология

Автореферат
Диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань – 2020

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан

Научный консультант: **Шарипова Маргарита Рашидовна** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) государственный университет».

Официальные оппоненты: **Мелентьев Александр Иванович** – доктор биологических наук, профессор, научный руководитель Учреждения Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории прикладной микробиологии УИБ УФИЦ РАН.

Исаева Гузель Шавхатовна – доктор медицинских наук (по специальности 03.02.03 – микробиология), заместитель директора по инновационной деятельности ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора РФ, заведующий кафедрой микробиологии имени В.М. Аристовского ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

Дегтярева Ирина Александровна – доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник отдела агроэкологии и микробиологии Татарского НИИАХП – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится 30 апреля 2020 г. в 14.00 на заседании диссертационного Совета КФУ.03.07. при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, ауд. 211

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, 35

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «___» ____ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



О.А. Кравцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Протеолитические ферменты представляют одну из важных групп ферментов, которые обнаружены у всех организмов от вирусов до высших эукариот, и обеспечивают белковый обмен клетки. Первичная роль протеолитических ферментов связана со способностью к гидролизу пептидных связей. Вторичная роль этих ферментов чрезвычайно разнообразна и опосредована активацией или инактивацией функций белков и пептидов.

В результате секвенирования геномов и сравнительного биоинформационического анализа стало известно, что в клетках значительная часть генома представлена генами протеолитических ферментов. Так, в геноме человека предсказано наличие более 500 генов, кодирующих белки с протеолитической активностью [Puente et al., 2005]. В геномах прокариот не менее 2-4% всех генов кодируют протеолитические ферменты [Lindsay et al., 2017; Rawlings et al., 2018]. Такое количество различных протеолитических ферментов в клетках обосновано чрезвычайно важной ролью этих белков для функционирования живых организмов. Высокий интерес к этой группе ферментов обусловил разработку современных Баз Данных по пептидазам, важнейшей среди которых является БД MEROPS, в которой на октябрь 2019 года содержится информация о 1137158 последовательностях (4341 индивидуальных пептидаз) [<https://www.ebi.ac.uk/merops/>]. Возможность использования омиксных технологий и исследований *in silico* открывает перспективы для идентификации новых бактериальных протеиназ.

Наиболее интенсивно изучаемыми и используемыми в практике являются протеиназы микробного происхождения [Razzag et al., 2019; Thapa et al., 2019]. Применение протеиназ с различной субстратной специфичностью является важным этапом современных биотехнологий и позволяет обеспечить эффективность и экологическую безопасность. В настоящее время протеолитические ферменты применяют в пищевой [Suzuki et al., 2017] и кожевенной промышленности [Zaraî Jaouadi et al., 2015], производстве моющих средств [Niyonzima and More, 2015], переработке отходов [Vidmar and Vodovnik, 2018], в медицинских целях [Duarte et al., 2016] и сельском хозяйстве [Olukosi et al., 2015; Erdaw et al., 2018], а также в научных исследованиях [Umeki et al., 2016; Schwebach et al., 2017].

Помимо потенциала практического применения протеиназы привлекают исследователей как ключевые участники всех процессов, протекающих в живых организмах. Протеолитические ферменты принципиально важны для роста, размножения организмов, регуляции различных процессов [Barchinger and Ades, 2013; Konovalova et al., 2014]. Другим аспектом исследования микробных протеиназ является выявление их роли в патогенезе различных заболеваний [Benitez and Silva, 2016; Hodgson and Wan, 2016]. Понимание вклада микробных протеиназ в вирулентный потенциал патогенов и механизма их действия важно для развития новых

подходов в терапии инфекционных болезней [Marshall et al., 2017; Tapader et al., 2019].

Важной характеристикой протеиназ, определяющей потенциал их использования, является субстратная специфичность. Протеиназы с узкой специфичностью – это удобный инструмент в исследовании структуры, свойств и функциональной активности многофункциональных белков. Примером такого белка является скелетно-мышечный актин, в структуре которого идентифицировано несколько активных центров и который существует в клетках в фибриллярной и глобулярной формах [Dominguez and Holmes, 2011; De La Cruz and Gardel, 2015]. Протеиназы с узкой специфичностью позволяют проводить ограниченный протеолиз белковых субстратов с формированием крупных фрагментов, сохраняющих пространственную структуру и активность, что важно для исследования тонких механизмов функционирования мультифункциональных белков [Cassady-Cain et al., 2016]. Например, для исследования свойств актина ранее использовали такие протеиназы, как субтилизин, трипсин и химотрипсин [Kudryashov et al., 2008; Umeki et al., 2016]. Однако эти протеиназы обладают широкой субстратной специфичностью, что затрудняет проведение ограниченного протеолиза актина и получения стабильных фрагментов. С другой стороны, протеиназы с высокой активностью и широкой специфичностью эффективны в деструкции белковых компонентов биопленок, что позволяет использовать их для борьбы с последними.

Наиболее широко в клетках представлены металлопептидазы и сериновые пептидазы – белки, чрезвычайно различающиеся по свойствам и функциям. Однако выделена и охарактеризована только небольшая доля аннотированных протеиназ. Энтеробактерии и бациллы являются важнейшими группами микроорганизмов с точки зрения инфекционной патологии человека и биотехнологии, в связи с чем систематизация знаний о протеолитических ферментах этих бактерий, характеристика новых протеиназ, оценка практического потенциала остаются актуальной проблемой современной микробиологии.

Таким образом, высокий интерес к протеолитическим ферментам обусловлен фундаментальной ролью этих белков в физиологии всех живых клеток и возможностью практического применения. Поиск и характеристика новых протеиназ необходимы для понимания конкретной роли в физиологических процессах клеток и увеличения арсенала практически ценных белков.

Целью работы является структурная и функциональная характеристика новых металлопротеиназ энтеробактерий и сериновых протеиназ бацилл, анализ их генетических детерминант и оценка потенциала практического применения.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Выделить и охарактеризовать физико-химические и энзиматические свойства новой внутриклеточной металлопротеиназы *Serratia grimesii* A2,

ограниченно расщепляющей скелетно-мышечный актин с образованием стабильного комплекса из N- и C-концевого фрагментов. Провести анализ данных полногеномного секвенирования штамма *S. grimesii* A2 для выявления всех металлопептидаз.

2. Охарактеризовать свойства скелетно-мышечного актина с использованием метода ограниченного протеолиза гримелизином и выявить молекулярные особенности взаимодействия актина с актин-связывающими белками.

3. Выявить и охарактеризовать гены гримелизиноподобных металлопротеаз в геноме энтеробактерий родов *Morganella* и *Providencia*. Провести сравнительную характеристику гримелизина *S. grimesii* и гомологичных металлопротеиназ энтеробактерий родов *Morganella* и *Providencia*. Охарактеризовать влияние фазы роста бактерий, инфицирующей дозы, времени инкубации и внеклеточной протеолитической активности на инвазивный потенциал *Morganella morganii* ZM, *Providencia stuartii* NK и *Proteus mirabilis* 5127-1.

4. Идентифицировать актиноподобные белки цианобактерий *Spirulina* и *Synechocystis* по антигенным детерминантам, присущим эпитопам актина.

5. Выделить и охарактеризовать внеклеточные протеиназы бацилл, подобрать условия для оптимальной продукции и выявить регуляторную сеть для контроля их биосинтеза. Оценить потенциал использования внеклеточных сериновых протеиназ бацилл в качестве тромболитиков, агентов деструкции биопленок и энзиматического синтеза пептидов.

Научная новизна полученных результатов. В работе впервые выделены и охарактеризованы новые бактериальные протеиназы грамотрицательных и грамположительных бактерий. Получена в гомогенном состоянии и детально охарактеризована внутриклеточная металлопротеиназа *S. grimesii* A2. Впервые дана биохимическая характеристика гримелизина, и показано, что особым свойством фермента является способность к ограниченному протеолизу скелетно-мышечного актина с образованием стабильного комплекса из двух фрагментов с молекулярными массами 8 и 36 кДа. Впервые секвенирован геном штамма *S. grimesii* A2 и проведен анализ всех генов гипотетических протеолитических ферментов бактерии. В геноме идентифицировано более 40 генов металлопротеиназ. Биоинформационный анализ показал, что протеиназы, гомологичные гримелизину, встречаются только у некоторых родов энтеробактерий, но обнаруживаются у филогенетически отдаленных бактерий (например, актинобактерий). В геномах клинических изолятов *M. morganii* ZM и *P. stuartii* NK нами идентифицированы последовательности генов гомологичных гримелизину. Впервые выделен препарат новой внутриклеточной металлопротеиназы *M. morganii* с молекулярной массой 35 кДа.

Использование иммунологических методов и антител к различным локусам молекулы мышечного актина позволило идентифицировать в

клетках цианобактерий *Spirulina* и *Synechocystis* прокариотические актиноподобные белки, а также актин-связывающие белки.

В работе охарактеризованы новые внеклеточные сериновые протеиназы, субтилизиноподобные и глутамилэндопептидазы, из двух видов бацилл – *B. amyloliquefaciens* и *B. rutilus*. Установлено, что биосинтез внеклеточных субтилизиноподобных протеиназ *B. rutilus* контролируется сложной регуляторной сетью в зависимости от стадии роста: 1) двухкомпонентной системой DegS-DegU, 2) катаболитной репрессией, 3) плейотропным регуляторным белком AbrB, а также 4) транскрипционным фактором Spo0A.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследований вносят вклад в расширение представления о разнообразии протеиназ в клетках грамотрицательных и грамположительных бактерий. Систематизация знаний, выделение и характеристика новых протеолитических ферментов с различной субстратной специфичностью являются фундаментом для практического использования ферментов.

Продуктивность штаммов по синтезу внеклеточных сериновых протеиназ была повышена до 10 раз за счет оптимизации состава питательной среды для культивирования бацилл. Данные по молекулярным механизмам контроля биосинтеза протеиназ и подходы по оптимизации состава среды культивирования могут быть полезны при разработке стратегии синтеза ферментов промышленными штаммами бактерий. Разработаны методы выделения и очистки гомогенных препаратов гримелизина, субтилизиноподобных протеиназ и глутамилэндопептидаз, что увеличивает арсенал белков, используемых в научных исследованиях и практических целях. Изучаемые ферменты обладают практически ценными свойствами. Новая металлопротеиназа *Serratia grimesii* может быть использована для исследования свойств скелетно-мышечного актина и других мультифункциональных белков. «Расщепленный» актин, полученный с помощью гримелизина, позволил изучить молекулярные механизмы взаимодействия актина с различными белками. Выявление способности бактерий трибы *Proteaceae* инвазировать эукариотические клетки важно для расшифровки механизмов патогенеза уропатогенных инфекций, поиска новых мишеней и разработки новых стратегий для терапии инфекций, вызванных этими возбудителями. Наличие тромболитической и антикоагулянтной активностей у субтилизиноподобных протеиназ *B. amyloliquefaciens* и *B. rutilus* делает эти ферменты перспективными для лечения заболеваний, связанных с возникновением тромбов. Установлено, что субтилизиноподобные протеиназы могут быть использованы для разрушения биопленок, образованных различными патогенными бактериями.

Положения, выносимые на защиту:

1. В геноме бактерий *S. grimesii* A2 идентифицированы 47 генов, кодирующих металлопептидазы, в том числе гримелизин – металлопротеиназа семейства M4, обладающая узкой субстратной

специфичностью и участвующая в инвазии бактерий. Гримелизин выделен в гомогенном состоянии, протеаза расщепляет скелетно-мышечный актин по связи Gly42-Val43 с образованием стабильного комплекса из 36- и 8 кДа фрагментов, частично утерявшего способность к полимеризации, но способного к взаимодействию с актин-связывающими белками. Гримелизин является удобным инструментом для исследования свойств актина.

2. Бактерии *M. morganii* ZM и *P. stuartii* NK способны к инвазии эукариотических клеток. В геномах бактерий идентифицированы гомологи гримелизина. Металлопротеиназа *M. morganii* ZM выделена в высокоочищенном виде, имеет молекулярную массу 35 кДа и неспецифически расщепляет актин.

3. Инвазия *P. mirabilis* 5127-1 клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека М HeLa, в отличие от *M. morganii* ZM и *P. stuartii* NK, сопровождается выраженным цитопатическим действием, обусловленным активностью секретируемой металлопротеиназы. Внеклеточная металлопротеиназа *P. mirabilis* 5127-1 способна образовывать две изоформы; изоформа с молекулярной массой 52 кДа более стабильна и не подвергается процессингу при культивировании бактерий на среде с мочой.

4. Сериновые протеиназы бацилл активируются в период их клеточной дифференцировки. Выделены и охарактеризованы сериновые протеиназы *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus*, установлены оптимальные условия для их биосинтеза и сеть сигнальной трансдукции (катализитическая репрессия, системы DegU и Spo0A), участвующая в экспрессии соответствующих генов, установлены практически значимые характеристики протеиназ: фибринолитическая, тромболитическая, антикоагулянтная активности; пептидсинтетическая активность; способность к деструкции биопленок патогенных грамотрицательных бактерий.

Апробация работы и публикации. По материалам работы опубликовано 50 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базе РИНЦ и рекомендованных ВАК РФ, из которых 44 в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, 6 – в отечественных журналах, 47 тезисов, получено 3 патента. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров РФ. Работа поддержана грантами: РНФ №16-16-04062 2016-2020 гг. «Разработка новых подходов с применением бактериальных ферментов и пробиотиков для повышения усвояемости корма сельскохозяйственной птицы на основе изучения физиологии ее пищеварения»; Госзадание 14-83 2014-2016 гг. «Микробные ферменты и метаболиты как основа новых технологий в сельском хозяйстве»; РФФИ №13-04-97130-р_поволжье_а 2012-2014 гг. «Гидролазы энтеробактерий как факторы вирулентности»; РФФИ №09-04-99044-р_офи 2009-2010 гг. «Сериновые протеиназы бацилл как потенциальные лекарственные препараты микробного происхождения»; РФФИ №05-04-48182а 2005-2007 гг.

«Роль сигнальной трансдукции в регуляции синтеза внеклеточных гидролаз бацилл»; РФФИ №01-04-48037-а «Внеклеточные ферменты спорообразующих бактерий и их участие в процессе спорообразования»; ФЦП Соглашение № 14.А18.21.1516 «Регуляторная роль гидролаз энтеробактерий в патогенезе оппортунистических инфекций» 20.09.2012-15.11.2013 гг.; Федеральной целевой программой (ФЦП) Соглашение № 14.А18.21.1118 «Выяснение механизмов инвазии оппортунистических патогенов рода *Morganella* и *Providencia*» 14.09.2012-15.11.2013 гг.; ФЦП ГК № П815 от 24 мая 2010 г. «Новые агробиопрепараты на основе бактериальных гидролаз»; ФЦП ГК № П1053 от 31 мая 2010 г «Современные технологии создания биопрепаратов на основе моделирования бактериальных генов»; ФЦП ГК № П406 от 12 мая 2010 г. «Микробные гидролазы как основа новых агробиотехнологий».

Материалы диссертации представлены и обсуждены на IV Международной научной конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» (Ялта, 2019); на Международной конференции «Трансляционная медицина 2016» (Казань, 2016); на XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005); на VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2018); на III и IV Международных научно-практических конференциях «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012, 2014); на 41-м Конгрессе FEBS «Molecular and Systems Biology for a Better Life» (Ephesus/Kuşadası, Turkey, 2016); на 8 Европейском конгрессе по Биотехнологии (Будапешт, 1997); на I и II Международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003); на конгрессе FEMS of European Microbiologist «Bacillus-2003» (Ljubljana, Slovenia, 2003); на VII Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» (Петрозаводск, 2014); на IV, V и VI Российских симпозиумах «Белки и пептиды» (Казань, 2009; Петрозаводск, 2011, Уфа, 2013); на III, V и VI симпозиумах «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 1993, 2002, 2007); на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008).

Личный вклад автора. Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку и анализ полученных результатов, оформление и публикацию статей. Планирование экспериментов по выделению гримелизина проведено совместно с д.б.н. С.Ю. Хайтлиной (Институт Цитологии РАН, РФ), экспериментов по выделению и идентификации актиноподобного белка и актин-связывающих белков цианобактерий осуществлено совместно с профессором Ив Беньямином (Институт белка, Монпелье, Франция). Секвенирование генома *S. grimesii* A2 проведено в

Геномном центре Междисциплинарного центра Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ) КФУ. Сканирующая микроскопия проведена на сканирующем электронном микроскопе Merlin в Междисциплинарном центре микроскопии КФУ с участием к.б.н. В.Г. Евтюгина. Конфокальная микроскопия проведена на микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss) в Междисциплинарном центре микроскопии КФУ с участием С.В. Кузнецовой и Leica TCS SL в Институте цитологии РАН с участием к.б.н. Т.Н. Ефремовой и к.б.н. Е.О. Божокиной.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Текст изложен на 263 страницах, проиллюстрирован 98 рисунками, включает 30 таблиц; список литературы содержит 474 (в том числе англоязычных 443) библиографических источников и 17 ссылок на электронные ресурсы. Приложение включает данные по идентифицированным в геноме *S. grimesii* генам с протеолитической активностью (таблица П1), данные по гипотетическим металлопротеиназам *S. grimesii* (таблица П2), данные о гомологах гримелизина в различных бактериях (таблица П3).

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность научному консультанту профессору д.б.н. М.Р. Шариповой и д.б.н. С.Ю. Хайтлиной за неоценимую помощь и моральную поддержку при подготовке диссертационной работы, профессору И. Беньямину (г. Монпелье, Франция) за предоставленную возможность проведения экспериментов, к.б.н. Т.Н. Ефремовой, к.б.н. Е.О. Божокиной (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) и сотрудникам Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия», К(П)ФУ к.б.н. В.Г. Евтюгину, С.В. Кузнецовой за помощь в проведении сканирующей и конфокальной микроскопии, к.б.н. Е.И. Шагимардановой за помощь в секвенировании генома *S. grimesii* A2.

Автор благодарит всех сотрудников кафедры микробиологии и лаборатории «Микробные биотехнологии», а также своих аспирантов и студентов за помощь и поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были штаммы *Serratia grimesii* A2, *Morganella morganii* ZM, *Providencia stuartii* NK, *Proteus mirabilis* 5127-1, *Bacillus pumilus* 3-19 и KMM62, *Bacillus amyloliquefaciens* H2, штаммы *Bacillus subtilis*, мутантные по генам разных регуляторных белков.

В работе использовали современные методы микробиологии, биохимии, молекулярной биологии и биоинформационического анализа среди которых секвенирование, сборка и аннотация бактериального генома, методы выделения гомогенных белков и характеристики их физико-химических и

энзиматических свойств, методы иммуноферментного и иммунохимического анализа, методы микроскопии и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. НОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

У грамотрицательных бактерий *S. grimesii* A2, ранее идентифицированных как штамм *E. coli* A2, нами обнаружена новая протеиназа, названная ECP32, а затем гримелизином [Bozhokina et al., 2008]. Интересным свойством протеиназы является способность расщеплять молекулу скелетно-мышечного актина ограниченно с образованием стабильного комплекса из двух фрагментов с молекулярными массами 36 и 8 кДа. ECP32/гримелизин на основании ингибиторного анализа и специфичности идентифицирован как металлоэндопептидаза с оптимумом активности в нейтральной области рН и в интервале температур 20-40 °С. Гримелизин расщеплял нативный актин ограниченно в широком диапазоне соотношений фермент:субстрат (рис. 1 А). В структуре актина идентифицирована связь Gly42-Val43, чувствительная к действию протеиназы, которая локализована на ДНКаза-І-связывающей петле молекулы актина (рис. 1 Б). Расщепляемая связь отличается от сайта гидролиза актина коммерческими протеиназами: субтилизином (Met47-Gly48) [Schwyter et al., 1989] и химотрипсином (Met44-Val45) [Konno, 1988].

Отметим, что в денатурированном прогреванием актине протеиназа расщепляет другие связи: Ala29-Val30 и Ser33-Ile34. Это приводит к образованию фрагментов с молекулярными массами 39 и 40 кДа. Установлено, что протеиназа не расщепляет многие нативные белки, но способна гидролизовать такие белки как гистоны и гистоноподобный белок HU, а также частично денатурированные тропонин Т и кальдесмон. Способность гримелизина к ограниченному гидролизу молекулы актина поднимает вопрос о функциональной роли этого фермента и его практическом использовании в исследованиях свойств актина.

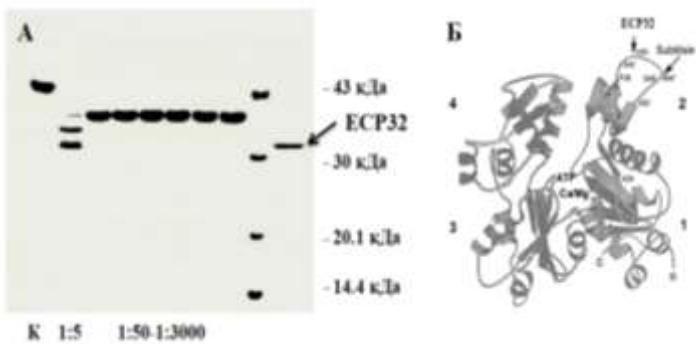


Рисунок 1 – (А) Протеолиз нативного актина ECP32. Время инкубации 60 мин при 20 °С. К – Актин. (Б) – Локализация сайтов расщепления в трехмерной структуре мономера актина [Kabsch et al., 1990]. Номерами указаны субдомены актина. Стрелками указаны сайты расщепления для ECP 32/гримелизина (Gly42-Val42) и субтилизина (Met47-Gly48).

Использование гримелизина в исследованиях актина

Протеолитические ферменты часто используются в качестве молекулярных инструментов при исследовании свойств многих белков и в первую очередь мультифункциональных белков [Cassady-Cain et al., 2016;

Cheng et al., 2019]. Для ограниченного протеолиза актина используют протеиназы с широкой специфичностью, такие как субтилизин, химотрипсин и трипсин, или такие специфические протеиназы, как глутамилэндопептидазы (S8 *S. aureus*) [Schwyter et al., 1989; Ooi and Mihashi, 1996; Kudryashov et al., 2008; Umeki et al., 2016]. Однако протеолиз актина этими протеазами требует строго контролируемых условий (концентрация фермента, температура и время инкубации) [Kudryashov et al., 2008; Kubota et al., 2009]. Использование узкоспецифичных протеиназ для ограниченного протеолиза позволяет получать стабильные фрагменты исследуемого белка. Выделенная нами металлопротеиназа гримелизин/ECP32 проявляет строгую специфичность при гидролизе молекулы актина, что делает этот фермент удобным при исследовании различных свойств скелетно-мышечного актина.

Расщепление актина с помощью гримелизина приводит к образованию двух фрагментов с молекулярными массами 36 и 8 кДа, которые устойчивы к протеолитическому разрушению (рис. 2) и остаются нековалентно связанными, так что нативная конформация глобулярного актина сохраняется.

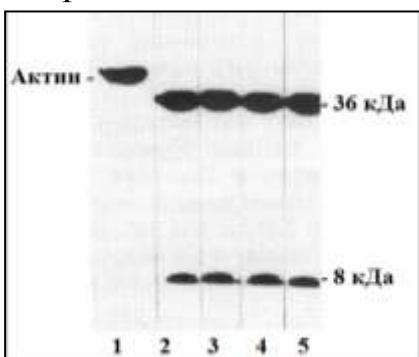


Рисунок 2 – Динамика протеолиза нативного актина ECP32/гримелизином. Электрофорез в 15.0% ПААГ в денатурирующих условиях. 1 – Контроль (актин). Время инкубации актина с протеиназой 30 мин (2), 60 мин (3), 120 мин (4), 300 мин (5).

Одним из способов оценки нативности структуры актина является определение спектра его флуоресценции, которое определяется как параметр A. Установили, что параметр A для расщепленного актина (2.40-2.47) близок к значению нативного актина (2.50-2.51) и отличается от параметра A для инактивированного актина (1.23). Это свидетельствует о том, что расщепленный актин сохраняет структуру, близкую к нативному актину. Однако расщепленный актин в концентрации 1.0-3.6 мг/мл не полимеризовался в присутствии 0.1 М KCl и терял способность к ингибиованию активности ДНКазы I, если молекула содержит в качестве связанного катиона ион Ca^{2+} (G-актин) (рис. 3). Таким образом, локальные изменения структуры молекулы актина, вызванные гидролизом связи Gly42-Val43, приводят к нарушению способности расщепленного актина к полимеризации и ингибиованию ДНКазы I.

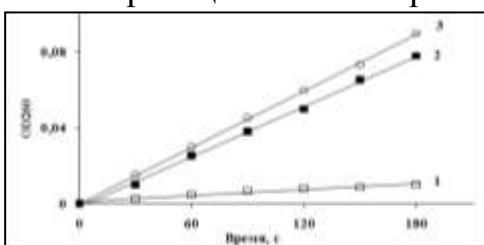


Рисунок 3 – Способность расщепленного актина ингибировать ферментативную активность ДНКазы I. К раствору ДНКазы I (2.5 мкг) добавляли 1 мкг актина (1) или 2.0 мкг расщепленного актина (2). ДНКаза I – контроль (3).

Полученные данные демонстрируют сильное отличие актина, расщепленного гримеллизином, от актина, гидролизованного другими протеиназами. Ранее показано, что актин, расщепленный субтилизином и химотрипсином, сохраняет способность к полимеризации, хотя критическая концентрация для его полимеризации выше, чем для интактного актина [Konno, 1988; Schwyter et al., 1989]. Таким образом, небольшая разница в сайте расщепления влияет на функциональные свойства протеолитически модифицированного актина и подчеркивает важную роль N-концевой части ДНКазы I-связывающей петли в мономер-мономерных взаимодействиях. Это делает актин, расщепленный гримеллизином, удобной моделью для изучения механизмов полимеризации актина и влияния на этот процесс различных факторов, а новую металлопротеиназу гримеллизин – эффективным молекулярным инструментом для ограниченного протеолиза молекулы актина.

Итак, расщепление связи Gly42-Val43 в молекуле актина приводит к ингибираванию его способности подавлять активность ДНКазы-I, но сохраняет его основные структурные свойства, что нами показано с помощью исследования спектра внутренней УФ-флуоресценции, способности к полимеризации в присутствии ионов Mg и взаимодействия со специфическими антителами (AT) к различным эпитопам актина (1-7, 18-28, 95-105, 195-205) (рис. 4). Реакционная способность антител к антигенным локусам 1-7 и 18-28 служит доказательством того, что после расщепления актина 1-42 N-терминальный сегмент сохраняется в стабильной ассоциации. Как видно из рисунка 4, антигенная реакционная способность расщепленного актина аналогична G-актину за исключением небольшого снижения реактивности в локусе 18-28 расщепленного актина. Более того, реактивность эпитопа 195-205, пространственно расположенного поблизости к «петле» 38-55, не изменилась при расщеплении актина гримеллизином. Согласно предыдущим результатам, эти исследования антигенных локусов указывают на то, что в расщепленном актине не появляются выраженные структурные изменения вокруг расщепленного сайта.

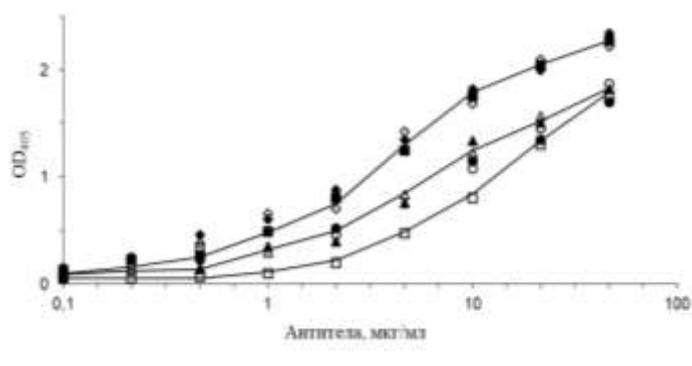


Рисунок 4 – Взаимодействие расщепленного актина с анти-актин антителами к разным эпитопам: 1-7 эпитопу (◆, ◇), 18-28 эпитопу (■, □), 95-105 эпитопу (▲, △) или 195-205 эпитопу (●, ○) к нативному (черный символ) или расщепленному (белый символ) актину. Связывание антител оценивали по поглощению при 405 нм.

Мы продемонстрировали возникновение бинарного комплекса между ДНКазой-I и расщепленным актином с использованием двух совершенно

разных подходов. Использование методов твердо-фазного анализа (рис. 5 А) и определения эмиссии гипохромной флуоресценции (рис. 5 Б) позволили нам установить, что комплексы между ДНКазой-І как с расщепленным, так и нативным актином обладают схожей стабильностью, а также выявить структурные изменения в молекуле актина, протяженные во времени и в зависимости от ионов Mg^{2+} .

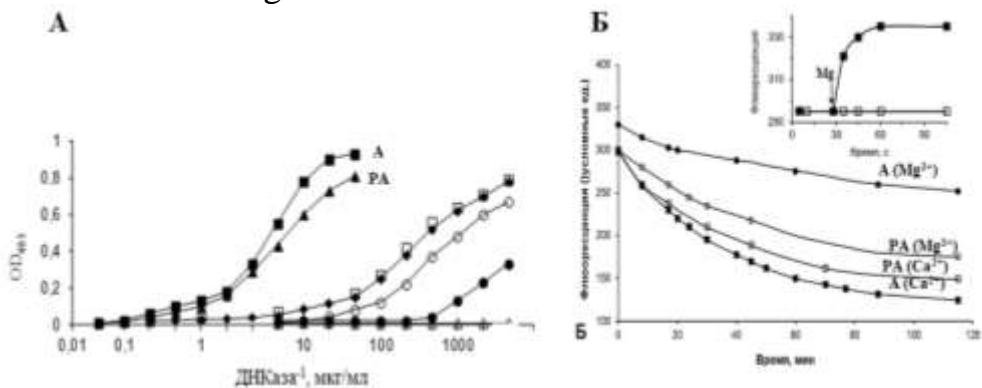


Рисунок 5 – Связывание ДНКазы I с расщепленным актином и производными актина.
А. Связывание биотинированной ДНКазы с G-актином (А) (■), расщепленным актином (РА) (▲), S-карбоксиметилированным актином (□) и фрагментами актина 1-226 (▼), 114-375 (○), 40-113 (●), 227-375 (Δ). Прямая ИФА.

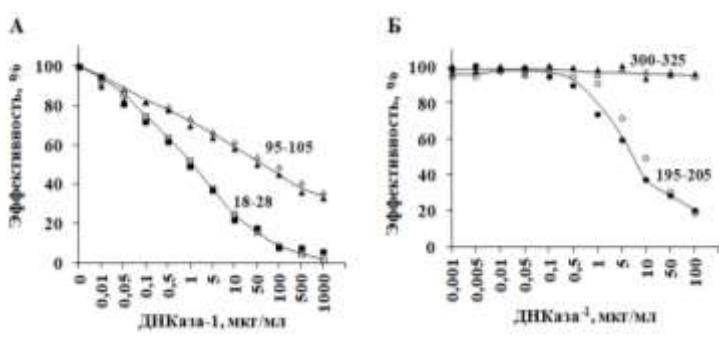
Б. Влияние ДНКазы I и солей на интенсивность излучения флуоресценции дансилированного актина при 470 нм. Нативный (черные символы) или расщепленный (белые символы) актин в количестве 10 мкг/мл инкубировали в присутствии ДНКазы I (10 мкг/мл) либо с 0.1 мМ $CaCl_2$ (■, □), либо с 2 мМ $MgCl_2$ (+ 1 мМ EGTA) (●, ○). **Вставка.** Влияние $MgCl_2$ (добавлен в момент времени, обозначенном стрелкой) на интенсивность флуоресценции дансилированного нативного (■) или расщепленного актина (□).

Полученные данные позволили предположить, что процесс ингибирования ДНКазы I при взаимодействии с молекулой нативного актина основан на конформационных ограничениях, индуцированных компактным мономером актина. Установили, что актин, расщепленный гримеллизином, тесно (плотно) взаимодействует с ДНКазой I и индуцирует конформационные изменения. При этом полностью прекращается ингибирование активности ДНКазы I. В работе С. Ю. Хайтлиной с соавторами показано, что в присутствии ионов Mg^{2+} «расщепленный» актин на 30-40% восстанавливает способность к ингибированию активности ДНКазы I [Khaitlina et al., 1993]. Следовательно, индуцированную ионами Mg^{2+} трансформацию актина (G^*), описанную как уплотнение структуры [Sheterline and Sparrow, 1994], следует учитывать для экстраполяции свойств комплекса ДНКаза I-актин в условиях клетки.

На основании флуоресцентных и иммунохимических экспериментов установили, что взаимодействие ДНКазы I с интактным или «расщепленным» актином индуцирует долгосрочные конформационные изменения в субдомене-1 актина (сегменты 18-28 и 95-105, Cys10 и Cys374). При анализе окружения дансилированного остатка Cys374 в G- и G^* -актине или в комплексах этих белков с ДНКазой I обнаружили (рис. 5 Б), что связывание с ДНКазой I индуцирует гипохромный эффект, связанный со

смещением в красной области (от 470 до 485 нм) в люминесцентном спектре эмиссии дансильной группы, которое завершается через 60 мин при соотношении ДНКаза I:актин, равном 1:1. В случае расщепленного актина во флуоресцентном спектре дансилированной метки было также смещение в красной области с центром в 475 нм к той же самой величине около 485 нм и гипохромный эффект, индуцированный связыванием с ДНКазой I. Итак, структурные изменения частично зависят от времени и заканчиваются через час после взаимодействия белков. Кинетический анализ демонстрирует сходное поведение актина с дансилированным Cys374 или расщепленного актина-АТФ- Ca^{2+} , что свидетельствует о том, что расщепление актина после Gly42 не затрудняет структурный эффект ДНКазы. Этот быстрый эффект ($t_{1/2} = 15-20$ с), полностью аннулируемый при связывании ионов Ca^{2+} , не наблюдается в расщепленном актине (рис. 5 Б). После формирования комплекса ДНКаза I- G^* -актин зависимый от времени гипохромный эффект (наблюдаемый с одним актином) полностью редуцирован в комплексе, сформированном с интактным актином, и частично снижается в случае «расщепленного» актина. Это свидетельствует о том, что трансформация актина (G^*), индуцируемая связыванием Mg^{2+} , ответственна за снижение чувствительности актина к структурным эффектам, вызываемых связыванием ДНКазы I, хотя это только частично верно в случае «расщепленного» актина. Частичное восстановление ингибирования ДНКазы I «расщепленным» актином после присоединения ионов Mg^{2+} , наблюданное ранее [Khaitlina et al., 1993], может быть обусловлено более плотной конформацией расщепленного актина, связанного с Mg^{2+} -АТФ.

Антигенный анализ бинарных комплексов расщепленного и нативного актина с ДНКазой I выявил значительное уменьшение реакционной способности анти-(18-28) и анти-(95-105) антител (18-28 и 95-105 эпитопы находятся в субдомене 1 актина) (рис. 6 А). При тех же условиях реакционная способность анти-(300-325)-антител (эпитопа субдомена-3 актина) не изменилась (рис. 6 Б). Потеря антигенных свойств двух локусов (18-28 и 95-103), расположенных в верхней части субдомена-1, может быть связана с потерей либо доступности, либо гибкости.



На рисунке 6 А и Б представлены результаты ингибирования связывания антител с актином и комплексом ДНКаза I-актина. Видно, что нативный актин (черные символы) ингибируется ДНКазой I гораздо сильнее, чем расщепленный актин (белые символы). На рисунке 6 А видно, что анти-актин-18-28 и анти-актин-95-105 антитела ингибируются ДНКазой I гораздо сильнее, чем анти-актин-300-325 антитела (рис. 6 Б). На рисунке 6 Б видно, что анти-актин-195-205 и анти-актин-300-325 антитела ингибируются ДНКазой I с одинаковой силой.

Рисунок 6 – Антигенная способность комплекса ДНКазы I и актина. Ингибирование связывания антител (%) наблюдали при 405 нм. **А** - ELISA между ДНКазой I и антителами к эпитопам актина 18-28 (■, □) или 95-105 (▲, Δ). **Б** - Конкурентный ELISA между ДНКазой I и антителами к эпитопам актина 195-205 (●, ○) или 300-325 (▲, Δ). Чёрные символы – нативный актин, белые символы – расщепленный актин.

Таким образом, способность к ингибираванию ДНКазы I, наблюдаемое с (АТФ-Са²⁺) G-актином, (АТФ-Мg²⁺) G*-актином, и плотное связывание ДНКазы I без ингибиторного эффекта, наблюдаемое с актином, обработанным ЭДТА [Bertazzon et al., 1990], или (АТФ-Са²⁺)-«расщепленным» актином, доказывает, что ингибиравание ДНКазы I требует взаимодействия с жесткой структурой актина.

Секвенирование и анализ генома *S. grimesii* A2

В результате секвенирования геномной ДНК *S. grimesii* A2 получили 5137381 высокоточных ридов со средней длиной около 500 п.о. и покрытием равным 12. Было протестирано несколько разных ассемблеров (GS Junior, Roche; Geneious R7; SPAdes 3.0; ABySS 1.3.2; MIRA 3-9-17), оптимальной платформой является SPAdes, с помощью которой риды были собраны в 120 контигов; N50: 108561 [Mardanova et al., 2014]. Размер генома *S. grimesii* A2 составил 5133068 п.о. Референсным геномом для сборки выбрали близкий *S. grimesii* A2 по гомологии гена 16S рРНК геном *S. proteamaculans* 568 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_009832.1]. Последовательность генома *S. grimesii* A2 опубликована в базе данных GenBank под номером NZ_JGVP00000000.1. G+C состав геномной ДНК составил 52.80%. В геноме были идентифицированы 68 генов тРНК и 11 рРНК, 4798 ОРС (по данным базы данных NCBI) и 4999 ОРС согласно аннотации в системе RAST.

На рисунке 7 представлена схема и нуклеотидная последовательность оперона, в который входит ген гримелизина. На схеме показана регуляторная область, в которой идентифицированы гипотетические сайты -10 и -35, SD. Сайт -10 перекрывается с сайтом связывания основного сигма фактора RpoD17. Других гипотетических сайтов связывания регуляторных белков не выявлено. В молекуле гримелизина нами идентифицирован один гипотетический трансмембранный домен в позиции 274-294 а.о. В состав оперона помимо гена гримелизина входит ген гипотетического белка. Последовательности ОРС обоих белков перекрываются на один нуклеотидный остаток (стоп кодон гримелизина перекрывается со старт кодоном гипотетического белка), что может свидетельствовать о трансляционном сопряжении генов. Анализ последовательности гипотетического белка, входящего в один оперон с геном гримелизина, с помощью программы TMpred показал, что белок не имеет трансмембранных доменов. BLAST анализ не выявил гомологов среди известных белков. Таким образом, функция этого белка остается неизвестной.

Анализ аннотированного генома *S. grimesii* A2 в программе MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) позволил идентифицировать все гипотетические белки с протеолитической активностью. Показано, что в геноме содержатся гены протеиназ всех основных групп (таблица 1). Всего аннотировано около 155 генов гипотетических пептидаз и 9 генов гипотетических ингибиторов пептидаз. Больше всего обнаружено сериновых пептидаз (63) и

металлопротеиназ (47). На их долю приходится 40% и 30% всех протеиназ и пептидаз этой бактерии.

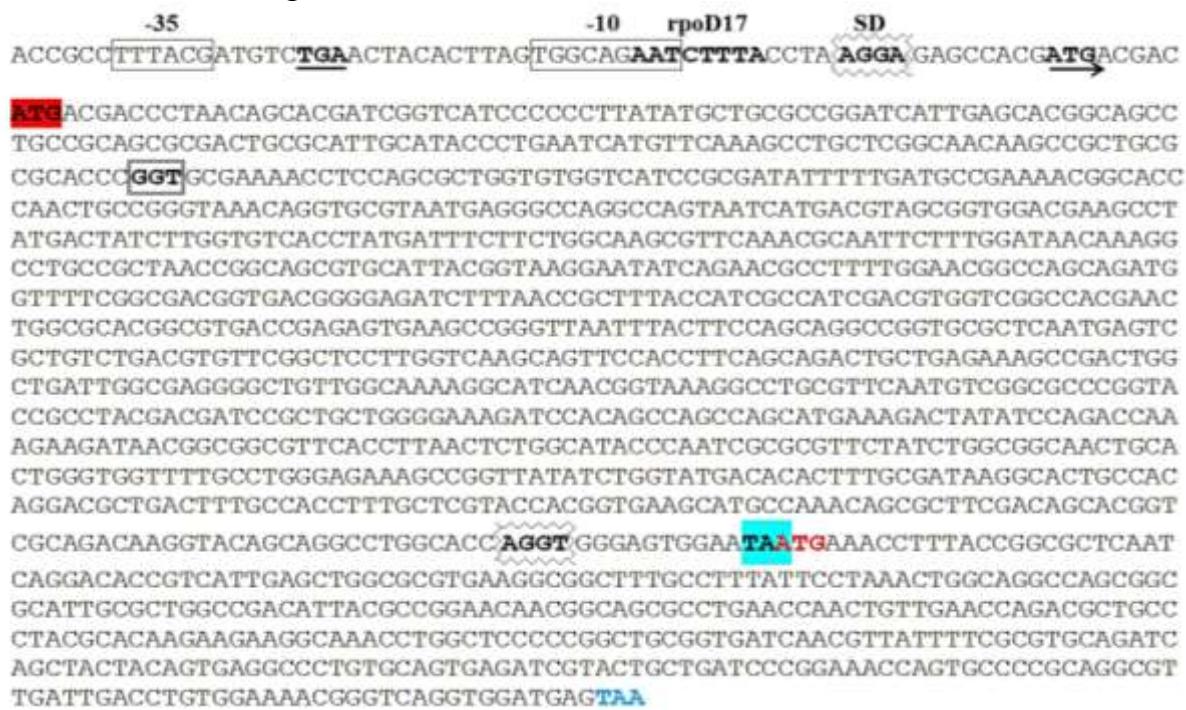


Рисунок 7 – Нуклеотидная последовательность оперона, включающего ген гримелизина *S. grimesii* A2 и ген гипотетического белка с общей регуляторной областью. Цветом выделены **старт**- и **стоп**-кодоны генов гримелизина и гипотетического белка. TGA – стоп-кодон предыдущего гена, GGT – конец сигнального пептида гримелизина, groD17 – сайт связывания σ^{70} -фактора, SD – последовательность Шайна-Дальгарно. [http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb].

Таблица 1 – Гипотетические белки с протеолитической активностью в геноме *S. grimesii* A2, идентифицированные с помощью программы MEROPS [<https://www.ebi.ac.uk/merops/>]

№	Класс	Количество гипотетических генов	% от всех аннотированных пептидаз
1	Аспартатные пептидазы	3	1.9
2	Цистeinовые пептидазы	29	18.7
3	Металлопротеиназы	47	30
4	Аспарагиновые пептидазы	2	1.3
5	Сериновые пептидазы	63	40
6	Треониновые пептидазы	6	3.8
7	Пептидазы с неизвестным механизмом катализа	6	3.8
	Всего пептидаз:	155	100
8	Ингибиторы пептидаз	9	

Поиск генов гомологов гримелизина в геномах других бактерий

С помощью базы данных ASAP и программы BLAST нами проанализированы секвенированные геномы энтеробактерий и бактерий других филумов. Использовали нуклеотидную последовательность предшественника гримелизина *Serratia* sp. A2 длиной 1026 п.н. из базы

данных NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU287453.1>] и аминокислотную последовательность предшественника гримелизина *S. grimesii* A2 длиной 341 а.о. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABY40626.1>]. Биоинформационический анализ позволил обнаружить гомологичные нуклеотидные и аминокислотные последовательности в геномах разных видов энтеробактерий. Таким образом, ортологи гена гримелизина идентифицированы нами в геномах бактерий, относящихся к разным родам порядка *Enterobacterales* – *Serratia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Citrobacter* и *Cronobacter*. Также гомологичные гены были идентифицированы и у представителей сем. *Pseudomonodaceae*, сем. *Halomonodaceae*, сем. *Alcaligenaceae*, а также представителей актинобактерий сем. *Intrasporangiaceae* и сем. *Dermabacteriaceae*.

Наибольшая степень гомологии по генам (80-89%) характерна для бактерий рода *Serratia*. В геномах бактерий рода *Enterobacter* гомология генов ортологов гримелизина составляет 77-79% при выравнивании 70% последовательности генов. Кроме того, обнаружены белки с гомологией по аминокислотной последовательности в 34-45% у некоторых видов *Providencia* и бактерий *Morganella morganii*. В то же время не выявлены гомологи гримелизина у представителей таких важных с точки зрения инфекционной патологии энтеробактерий, как *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* и *Proteus*. Сравнительный анализ структурной организации гримелизин-кодирующего геномного локуса показал их консервативность у бактерий в пределах рода *Serratia* (рис. 8).

Как видно из рисунка 8, геномные локусы ортологов гримелизина в геномах *M. morganii* и *P. stuartii* сильно отличаются от локуса, в котором находится ген гримелизина в геноме *Serratia*, что коррелирует с невысоким сходством последовательностей самих протеиназ. В геномах бактерий *Morganella* и *Providencia* гены металлопротеиназы локализованы после генов *hemN*, кодирующих аэробную копропорфириноген оксидазу III и эти геномные локусы очень похожи.

В геномах клинических изолятов *M. morganii* ZM и *P. suartii* NK нами идентифицированы последовательности соответствующих генов и проведен анализ регуляторных областей этих генов. В обоих случаях в промоторной области идентифицированы гипотетические сайты -10 и -35, а также сайты связывания RpoD17. Кроме того, в промоторе гена *M. morganii* ZM идентифицирован гипотетический сайт связывания CAP-белка (TGTGAN₆TCACA), который участвует в регуляции экспрессии различных генов по механизму углеродной катаболитной репрессии [Leuze et al., 2012], что позволяет предположить вклад в регуляцию экспрессии гена металлопротеиназы *M. morganii* этого механизма. В промоторной области гена *P. suartii* NK идентифицированы гипотетические сайты связывания таких регуляторных белков как регулятор арабинозного оперона и белка IHF (The integration host factor). Идентификация дополнительных сайтов

регуляции может свидетельствовать о более сложной регуляции экспрессии соответствующих генов и свидетельствует о большом разнообразии в регуляции экспрессии гомологичных металлопротеиназ у разных видов бактерий.

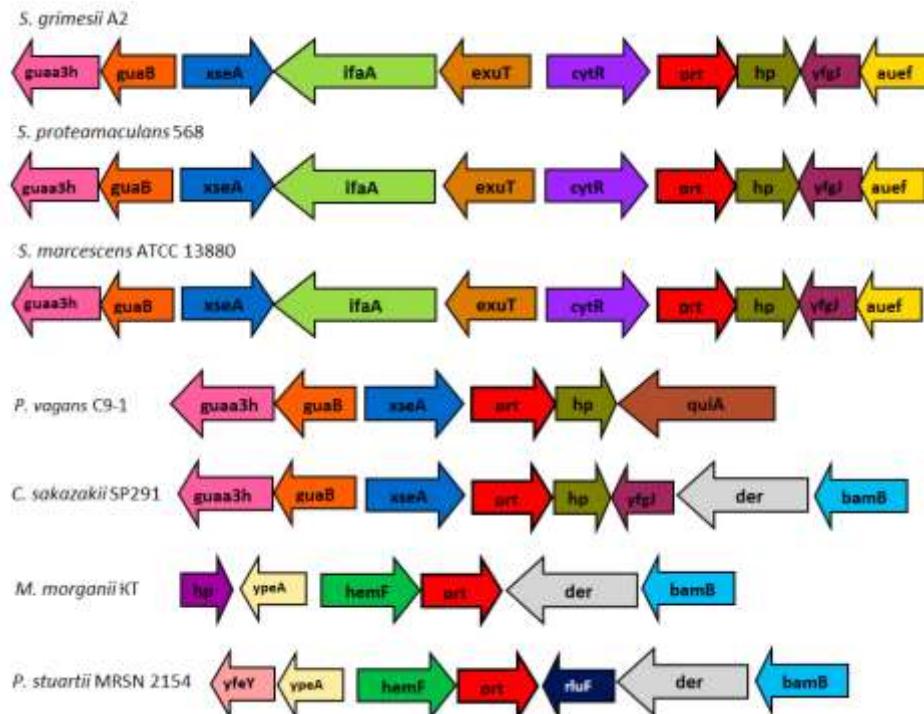


Рисунок 8 – Структура геномных локусов, содержащих ген-ортолог гримелизина, в геномах различных представителей порядка *Enterobacteriales*: стрелки вправо – гены, локализованные на плюс-цепи; стрелки влево – гены, локализованные на минус-цепи. *prt* – металлопротеиназа; *hp* – гипотетический белок; *yfgJ* – белок с неизвестной функцией; *auef* – насос ауксина; *cytR* – транскрипционный регулятор семейства LacI; *exuT* – MFS-транспортер; *ifaA* – α -глюказидаза; *xseA* – большая субъединица экзонуклеазы VII; *guaB* – инозин-5'-монофосфат дегидрогеназа; *guaA3* – ГМФ-сингтаза; *quiA* – дегидрогеназа; *der* – ГТФ-связывающий белок; *bamB* – белок внешней мембраны; *hemF* – аэробная копропорфиринагеноксидаза III; *ureA* – ацетилтрансфераза.

На основании BLAST-анализа аминокислотной последовательности гримелизина и гомологичных белков проведено множественное выравнивание по алгоритму MUSCLE в программе MEGA 7 [Kumar et al., 2016]. На основе выравнивания по методу максимального правдоподобия реконструировано филогенетическое древо металлопротеиназы-гримелизина, на котором видно, что клад, образуемый протеиназами *Serratia*, значительно удален от кладов гомологичных протеиназ *Morganella* и *Providencia*.

Используя программу Phyre2 (expasy.org), построили модели третичной структуры гипотетических металлопротеиназ из *M. morganii* ZM, *P. stuartii* NK и *S. grimesii* A2 (рис. 9). 3D-модели трех металлопротеиназ похожи, хотя и не идентичны, что свидетельствует о более высокой консервативности третичных структур белков в сравнении с их первичной структурой.

Таким образом, в геномах *M. morganii* ZM и *P. stuartii* NK нами идентифицированы гены, кодирующие гипотетические металлопротеазы с 38% и 42% идентичностью с гримелизином соответственно, состоящие из

366 и 382 аминокислотных остатков, что соответствует теоретическому размеру белка 41.37 кДа и 43.58 кДа. Несмотря на то, что металлопротеиназы *M. morganii* и *P. stuartii* значительно отличаются от гримелизина по первичной последовательности, они имеют схожие 3D-модели пространственной структуры и строение активных центров.

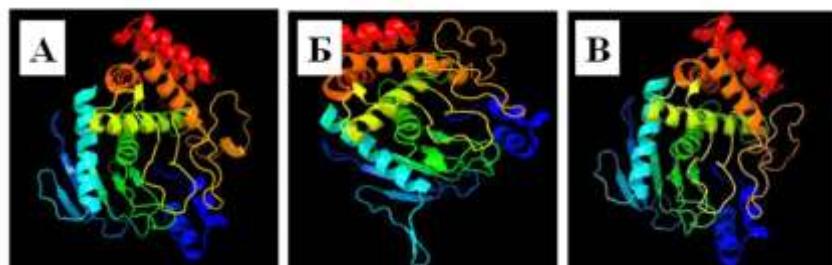


Рисунок 9 – Третичные структуры гримелизина *S. grimesii* A2 (А) и гипотетических металлопротеиназ *M. morganii* ZM (Б) и *P. stuartii* NK (В). Программа для моделирования, предсказания и анализа белков Phyre2 [http://www.expasy.org/proteomics/protein_structure].

Анализ протеолитической активности энтеробактерий

Следующий этап работы посвящен сравнительному анализу протеолитической активности клеточных экстрактов *S. grimesii* A2, *M. morganii* ZM и *P. stuartii* NK. Показано, что только гримелизин *S. grimesii* A2 способен ограниченно расщеплять скелетно-мышечный актин с образованием 36 и 8 кДа фрагментов (рис. 2). Клеточный экстракт *M. morganii* расщепляет актин неограниченно без образования стабильных промежуточных фрагментов (рис. 10 А). Экстракт *P. stuartii* NK также расщепляет актин неограниченно, но с образованием промежуточных фрагментов с молекулярной массой 34 и 30 кДа (рис. 10 Б).

Следовательно, только гримелизин проявляет способность к строго специальному расщеплению скелетно-мышечного актина, что позволяет использовать этот фермент для исследования свойств молекулы актина. Высокая специфичность при гидролизе молекулы актина определяется первичной последовательностью и структурой молекулы гримелизина.

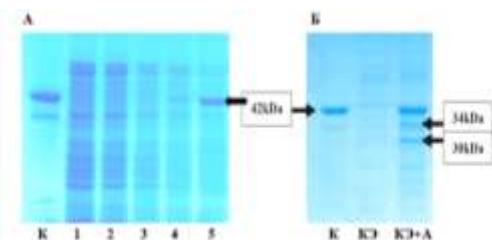


Рисунок 10 – Расщепление актина клеточными экстрактами 48 ч штаммов *M. morganii* (А) и *P. stuartii* (Б). К (контроль) – Актин; 1-5 – Актин + клеточные экстракты (кэ), разведенные 0, 2, 4, 8 и 16 раз. ПААГ-SDS, 12%.

Новая металлопротеиназа из клеточного лизата *M. morganii* ZM была выделена с использованием методов сульфатаммонийного фракционирования и гидрофобной хроматографии (рис. 11).

Таким образом, в клетках клинического изолята *M. morganii* ZM идентифицировали новую металлопротеиназу, способную гидролизовать актин, азоказеин и желатин. Двухстадийная очистка с использованием

сульфатаммонийного фракционирования и гидрофобной хроматографии позволила выделить из клеточного лизата бактерий препарат фермента с молекулярной массой, равной 35 кДа, и чувствительного к *o*-фенантролину.

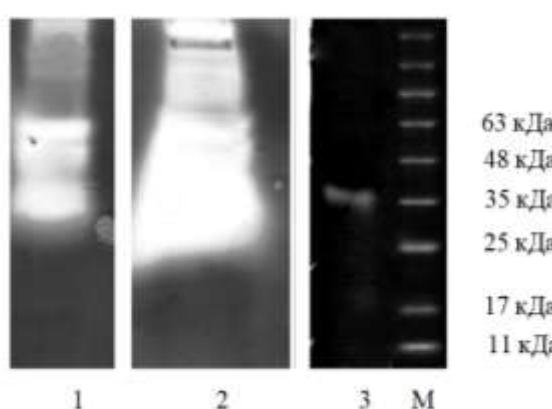


Рисунок 11 – Идентификация протеолитической активности в белковых фракциях клеточного экстракта *M. morganii* ZM на разных стадиях очистки методом зимографии. 1 – исходный клеточный экстракт, 2 – фракция белков, осажденных сульфатом аммония при 20-50% насыщения, 3 – фракция с протеолитической активностью после хроматографии на фенил-сепарозе, M – маркеры.

В геноме энтеробактерии *P. mirabilis* нами не обнаружено гена гомолога гримелизина. Однако известно, что *P. mirabilis* обладают внеклеточной протеолитической активностью, обусловленной присутствием металлопротеиназы ZapA [Pearson et al., 2008]. Известно, что бактерии *P. mirabilis* являются возбудителями инфекций мочевыводящих путей и, в частности, катетер-ассоциированных инфекций [Norsworthy and Pearson, 2017]. Нами показано, что биосинтез внеклеточной металлопротеиназы штамма *P. mirabilis* 5127-1 зависит от состава среды и индуцируется в присутствии мочевины, что характерно для регуляции многих факторов вирулентности уропатогенов (рис. 12). Кроме того, при росте на среде «искусственная моча» фермент синтезируется в виде одной стабильной изоформы с молекулярной массой 52 кДа (рис. 13 А), хотя на среде LB образуется две изоформы (52 и 50 кДа) (рис. 13 Б), что описано также у других авторов [Senior, 1999; Pearson et al., 2008]. По-видимому, при росте бактерий в богатой среде изоформа с молекулярной массой 52 кДа легче процессируется.

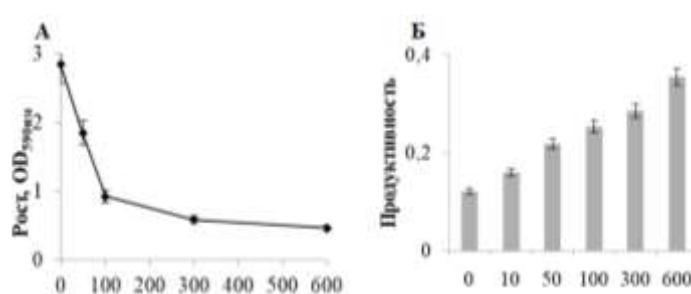
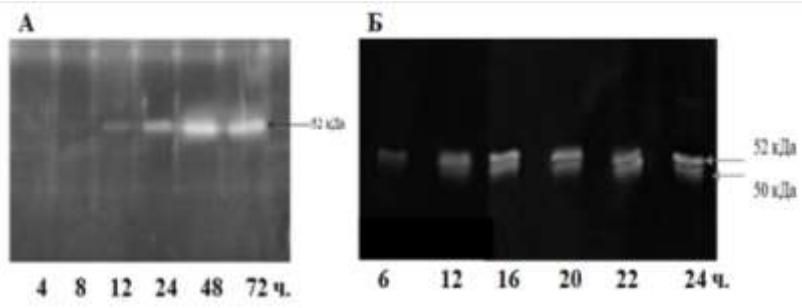


Рисунок 12 – Влияние мочевины на рост бактерий *P. mirabilis* (А) и продуктивность биосинтеза внеклеточной протеиназы (Б). Бактерии культивировали на среде LB с мочевиной при 37 °C в течение 16 ч.

Рисунок 13 – Идентификация методом зимографии изоформ протеиназы в культуральной жидкости *P. mirabilis* при росте на моче (А) и среде LB (Б). 37 °C. Субстрат – желатин.



Исследовали влияния экзогенных метаболитов бактерий *P. mirabilis* и *M. morganii* на целостность монослоя клеточной культуры HeLa. С этой целью использовали бесклеточную культуральную жидкость после 12 ч роста, которую добавляли к культуре клеток в разных соотношениях и инкубировали в течение 2 ч. Внесение культуральной жидкости в среду роста эукариотических клеток приводило к увеличению количества открепившихся от подложки клеток HeLa в случае обеих бактериальных культур. Однако бесклеточная среда *P. mirabilis* вызывала открепление клеток значительно сильнее, чем культуральная жидкость *M. morganii*. Как видно из рисунка 14, культуральная жидкость *P. mirabilis*, разведенная в 3 и 6 раз, приводила к увеличению открепившихся клеток в 2.4 и 2.7 раз в сравнении с контролем, в то время как культуральная жидкость *M. morganii* – только в 1.4 раза относительно контроля.

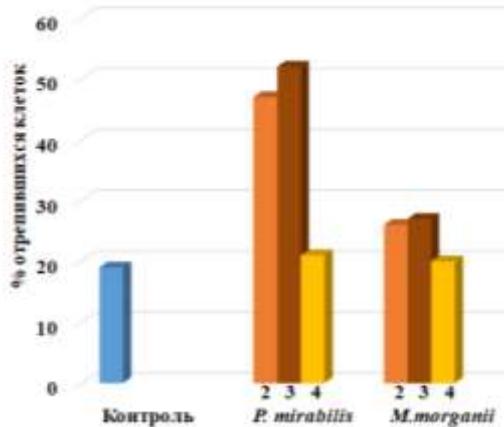


Рисунок 14 – Деструкция монослоя клеточной линии М HeLa под действием культуральной жидкости (КЖ) *P. mirabilis* 5127-1 и *M. morganii* ZM. Соотношение среды ЕМЕМ и культуральной жидкости: 1) – ЕМЕМ (контроль), 2) – ЕМЕМ + КЖ (6:1), 3) – ЕМЕМ + КЖ (3:1), 4) – ЕМЕМ + инактивированная КЖ (60 °C, 10 мин).

Следовательно, в культуральной жидкости *P. mirabilis* присутствует фактор (или факторы), индуцирующий открепление клеток от субстрата и деструкцию монослоя клеточной культуры. Этот фактор разрушался под действием высокой температуры и присутствовал в незначительных количествах в культуральной среде *M. morganii*. Цитопатический эффект *Proteus* коррелирует с внеклеточной протеолитической активностью.

Характеристика инвазии бактерий *P. mirabilis* 5127-1, *M. morganii* ZM и *P. stuartii* NK клеток М HeLa

Сравнительный анализ инвазивных свойств бактерий *P. mirabilis* 5127-1, *P. stuartii* NK и *M. morganii* ZM показал, что эффективность инвазии бактерий клеток М HeLa не высока и сильно зависит таких факторов как возраст бактериальной культуры, время инкубации и инфицирующая доза (рисунки 15 и 16).

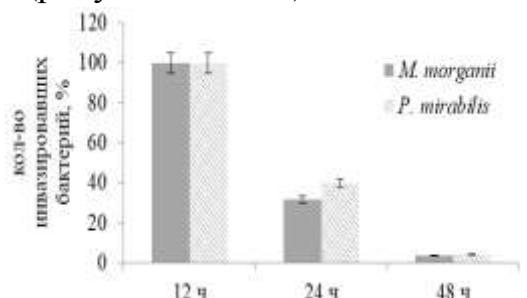


Рисунок 15 – Влияние возраста бактерий *M. morganii* ZM и *P. mirabilis* 5127-1 на инвазивный потенциал. Клетки HeLa инкубировали с бактериями при 37 °C в течение 2 ч при соотношении 1:50. За 100% брали максимальное количество инвазировавших бактерий.

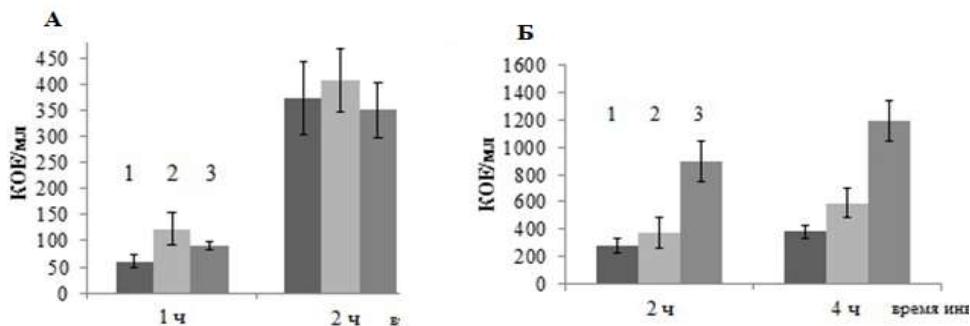


Рисунок 16 – Проникновение бактерий *M. morganii* (А) и *P. stuartii* (Б) в клетки HeLa M в зависимости от времени инвазии и инфицирующей нагрузки. Монослои HeLa-M инфицировали 12-часовой культурой бактерий при различных соотношениях бактериальных и эукариотических клеток (1 - 1:10, 2 – 1:50, 3 – 1:100) в течение 1-4 ч при 37 °C.

Для визуализации внутриклеточных бактерий и характеристики изменения морфологии эукариотических клеток и монослоя в целом использовали лазерную сканирующую конфокальную микроскопию (рисунки 17-19), которая позволила показать, что бактериальные штаммы *P. mirabilis* 5127-1, *M. morganii* и *P. stuartii* NK ZM способны адгезировать к эукариотическим клеткам линии M HeLa, а также способны проникать внутрь клеток. Большая часть бактерий обнаруживалась вне клеток или на поверхности клеток. Наблюдали некоторые изменения в организации цитоскелета эукариотических клеток в результате инвазии бактерий. При этом бактерии *P. mirabilis* способны вызывать активное округление клеток и в итоге разрушение монослоя HeLa, что может быть обусловлено активностью внеклеточной протеиназы.

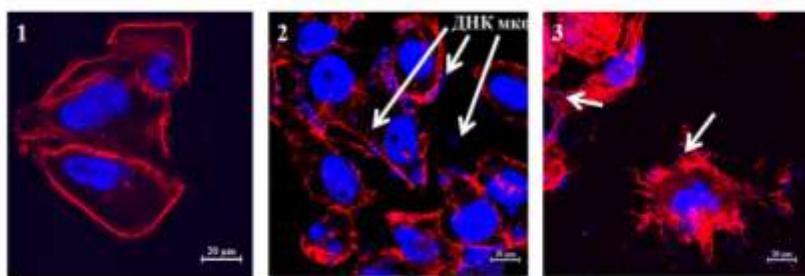


Рисунок 17 – Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия клеток линии M HeLa с инвазировавшими и адгезировавшими *M. morganii* ZM. ДНК клеток и бактерий окрашены красителем DAPI (голубой). Актиновый цитоскелет окрашен родамин-фаллоидином (красный). Время инвазии 4 ч. 1, 2 – клетки линии M HeLa (контроль). 3, 4 – клетки линии M HeLa с бактериями *M. morganii* ZM. ДНК бактериальных клеток отмечены стрелками.

Способность условно-патогенных бактерий трибы *Proteae*, не считающихся истинно инвазивными, проникать внутрь эукариотических эпителиальных клеток можно расценивать как стратегию возбудителей, обеспечивающую им защиту от иммунных механизмов хозяина и губительного действия антибиотиков, а также возможность персистировать в эпителиальных клетках хозяина.

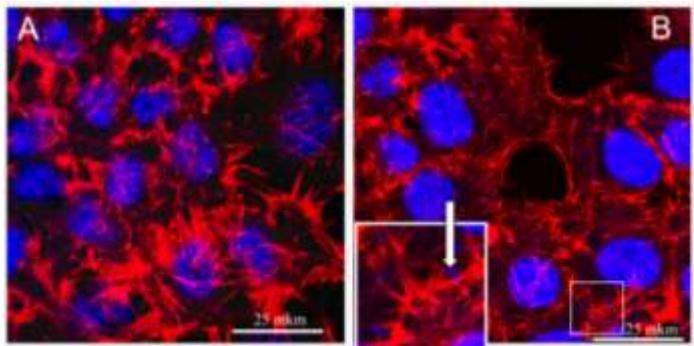


Рисунок 18 – Конфокальная микроскопия инвазии *P. stuartii* NK в клетки HeLa-M. Монослой HeLa-M инфицировали *P. stuartii* NK в соотношении 1:50 в течение 2 ч при 37 °C. А – контроль (не инфицированные клетки HeLa-M); В – клетки HeLa-M, инфицированные бактериями. Актиновый цитоскелет окрашен родаминофаллоидином. ДНК клеток и бактерий окрашена DAPI. Инвазировавшие бактерии отмечены стрелкой.

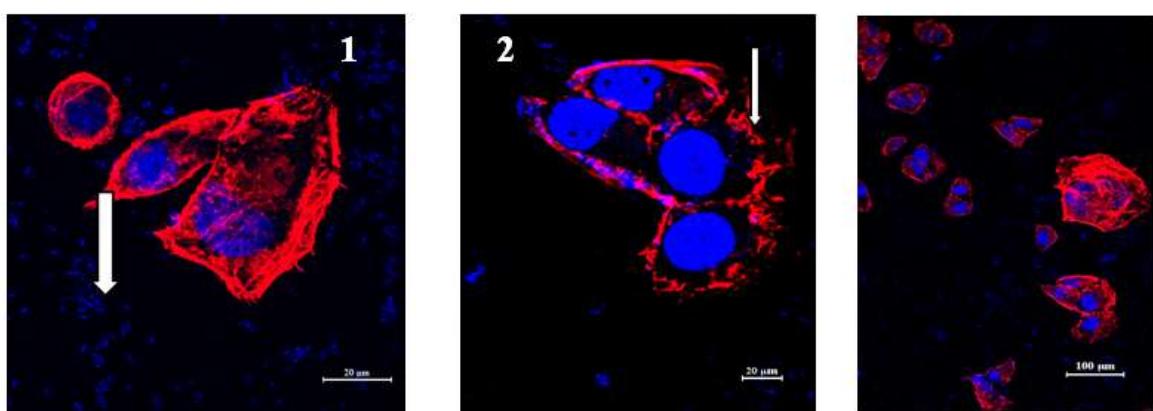


Рисунок 19 – Конфокальная микроскопия инвазии *P. mirabilis* 5127-1 эукариотических клеток линии M HeLa. Культуру клеток инкубировали с бактериями в течение 2 ч. ДНК клеток и бактерий окрашивали красителем DAPI (голубой), актиновый цитоскелет – родамин-фаллоидином (красный). 1, 2 – клетки линии M HeLa с инвазировавшими и адгезированными бактериями *P. mirabilis* 5127-1. 3 – разрушение монослоя M HeLa после инкубации с *P. mirabilis* 5127-1. ДНК бактериальных клеток отмечены стрелками.

Таким образом, энтеробактерии синтезируют широкий спектр металлопротеиназ семейства M4, различающихся по структуре и свойствам, что обусловлено широким разнообразием функций, которые могут выполнять эти ферменты в клетках грамотрицательных бактерий.

Актино- и α -актининоподобные белки у цианобактерий

Для выяснения вопроса о присутствии в клетках прокариот актиноподобных белков, которые могут являться потенциальными субстратами для гримеллизина, провели исследование по их идентификации с помощью иммунологических методов в клетках цианобактерий. С использованием спектра антител к различным локусам скелетно-мышечного актина нами в клетках *Synechocystis* sp. идентифицирован белок с молекулярной массой 56 кДа (рис. 20). Этот белок взаимодействовал с антителами к консервативным локусам эукариотического актина (18-28 и

105-120), но не взаимодействовал с антителами к вариабельным участкам актина (95-105 и 195-205) (рис. 21).

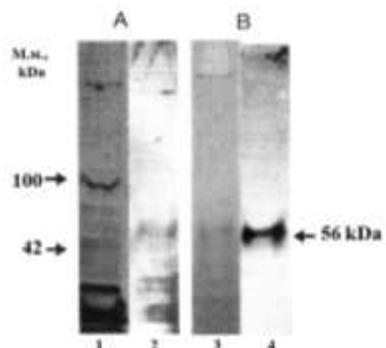


Рисунок 20 – Взаимодействие актиноподобного белка из *Synechocystis* с лектином (WGA). Образцы анализировали в градиентном 5-18% SDS-ПААГ. (А) Экстракт из клеток *Synechocystis*: 1 – гель, окрашенный кумасси-голубым, 2 – иммуноблотинг с лектином, меченный пероксидазой (0.5 мкг/мл). (В) Фракции, элюированные NAG с колонки с лектин-агарозой: 3 – гель, окрашенный кумасси-голубым; 4 – иммуноблотинг с анти-актин антителами, меченными пероксидазой (анти-18-28).

Известно, что высококонсервативные участки в молекуле актина участвуют во взаимодействии с различными актин-связывающими белками. Так, пептидный участок 18-28 является одним из миозин-связывающих сайтов [Mejean et al., 1986]. Локус актина 105-125 участвует в связывании таких белков, как α -актинин и филамин [Lebart et al., 1994]. Кроме того, актиноподобный белок цианобактерий связывал два актин-связывающих белка – α -актинин и филамин, подобно скелетно-мышечному актину (рис. 22).

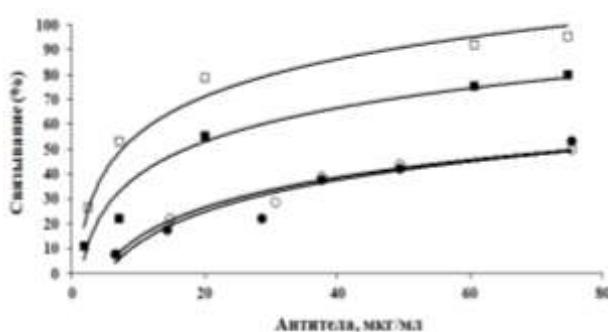


Рисунок 21 – Взаимодействие очищенных антител к актину со скелетно-мышечным актином и актиноподобным белком *Synechocystis*. Прямая ELISA: антитела (0-80 мкг/мл) связывались с адсорбированным на пластике скелетно-мышечным актином (черные значки) или актиноподобным белком *Synechocystis* (белые значки). анти-18-28 AT (□, ■); анти-105-120 AT (○, ●). Процент связывания рассчитывали относительно концентрации антител.

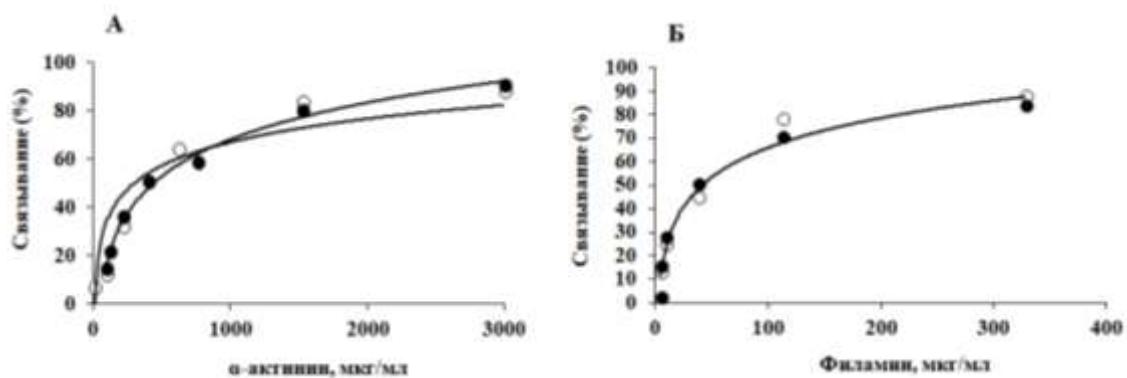


Рисунок 22 – Взаимодействие Ф-актин-связывающих белков с актиноподобным белком *Synechocystis*, исследованное методом ELISA. Повышающее количество α -актинина из желудка цыплят (0-3000 мкг/мл) (А) или филамин (0-300 мкг/мл) (Б) инкубировали с актином, иммобилизованным на пластике (○) или актиноподобным белком *Synechocystis* (●) в 10 mM Tris, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂ и 0.05% Tween-20, pH 7.4.

Молекулярная масса белка из цианобактерий выше, чем для эукариотического актина (42-43 кДа), что может быть связано с посттрансляционной модификацией белка, а именно гликозилированием, которое было установлено с помощью аффинной хроматографии на колонке с лектином.

В клетках цианобактерий *Spirulina platensis* нами идентифицирован белок, реактивный к антителам к скелетно-мышечному актину, а также α -актининоподобный белок с молекулярными массами 56 и 105 кДа соответственно (Рисунки 23 и 24). Полученные данные свидетельствуют о коэволюции актиноподобных и актин-связывающих белков у цианобактерий.

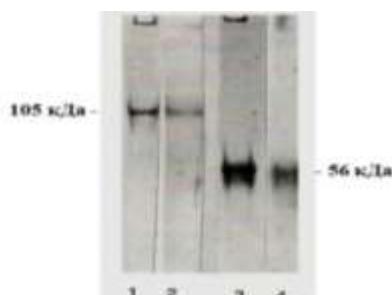


Рисунок 23 – Электрофорез и иммуноблотинг 105 кДа и 56 кДа белков из *Spirulina*, очищенных с помощью электроэлюции из ПААГ-DS-На. 105 кДа белок: 1 – гель, окрашенный кумасси-голубым; 2 – иммуноблотинг с антителами к α -актинину. 56 кДа белок: 3 – гель, окрашенный кумасси-голубым; 4 – иммуноблотинг с антителами к актину

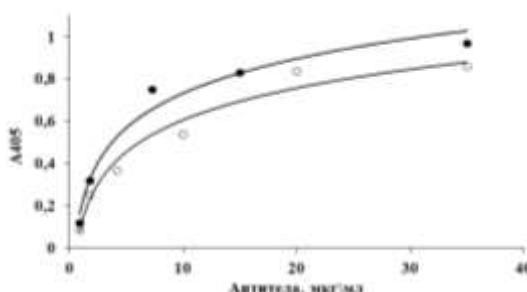


Рисунок 24 – Взаимодействие очищенных антител к актину (анти-18-28) и α -актинину (анти-27-мер) с С3 белковой фракцией клеточного экстракта *Spirulina*. Связывание антител (0-40 мкг/мл) с клеточным экстрактом, адсорбированным на планшетах, оценивали методом ELISA. Анти-18-28 антитела (●), анти-27-мер антитела (○).

Таким образом, в клетках цианобактерий *Synechocystis* и *Spirulina* обнаружены актиноподобные белки, а в клетках *Spirulina* также идентифицирован α -актининоподобный белок, сходные с соответствующими белками скелетных мышц, о чем свидетельствует взаимодействие этих белков со специфическими антителами. Известно, что различные бактерии содержат актиноподобный белок MreB, первичная структура которого гомологична структуре скелетно-мышечного актина на 15% [Carballido-López, 2006]. Сопоставление наших результатов с этими данными могут указывать на существование в исследуемых цианобактериях актино- или MreB-подобных белков, а также на то, что третичная структура соответствующего белка цианобактерий сходна со структурой актина.

Актиноподобные белки бактерий, которые выполняют функции, подобные эукариотическому актиновому цитоскелету, интенсивно исследуются с 2000 г. [Busiek, Margolin, 2015; Gunning et al., 2015]. Белок MreB, ген которого локализован в хромосоме бактерий, является основным из белков, определяющих форму палочковидных бактерий, и способен образовывать нити внутри бактериальной клетки, подобно актиновым филаментам [Jones et al., 2001; van den Ent et al., 2014]. Охарактеризованы и

многие другие бактериальные актиноподобные белки, которые выполняют различные функции [Gayathri, 2017].

Структура белка MreB оказалась схожей с пространственной структурой эукариотического актина (рис. 25) [Gayathri, 2017]. Бактериальный актин также состоит из 4 субдоменов (1A, 1B, 2A и 2B), которые соответствуют субдоменам эукариотического актина (1, 2, 3 и 4). Наибольшие различия наблюдаются в субдомене 1B.

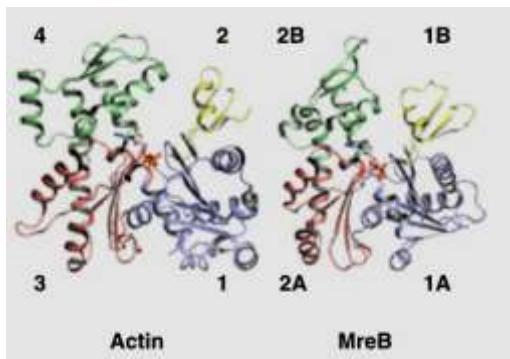


Рисунок 25 – Кристаллические структуры скелетномышечного эукариотического актина и актиноподобного белка MreB [Gayathri, 2017].

Сходство структур бактериальных актинов со скелетно-мышечным эукариотическим актином позволяет нам предположить, что внутриклеточным субстратом для гримелизина могут быть актиноподобные белки бактерий. Анализ специфичности гримелизина с помощью нативных и денатурированных белков показал узкую специфичность протеиназы, которая зависит от пространственной структуры белка-субстрата.

2. НОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ БАЦИЛЛ

Различные виды рода *Bacillus* являются продуцентами внеклеточных протеиназ, используемых в практических целях [Contesini et al., 2018; Cai et al., 2019].

Выделение и характеристика сериновых протеиназ бацилл

С использованием хромогенных специфических субстратов нами идентифицированы в культуральной жидкости штаммов *B. amyloliquefaciens* H2 и *B. pumilus* КММ 62 субтилизиноподобные протеиназы и глутамилэндопептидазы. Glu-, Asp-специфические протеиназы или глутамилэндопептидазы являются ферментами с узкой субстратной специфичностью, вследствие чего привлекают внимание как молекулярные инструменты при исследовании первичной структуры белков и пептидов.

Исследование динамики роста бациллярных культур и биосинтеза внеклеточных протеиназ позволило установить, что синтез субтилизиноподобных протеиназ и глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* носит двухфазный характер. Ферменты начинают появляться в среде в стадии замедления роста бактерий и достигают максимума накопления в стационарной фазе роста. Для обоих бациллярных штаммов обнаружены два максимума накопления ферментов: в

ранней и поздней стационарной фазе развития (рисунки 26 и 27). Это, согласно модели Колемана, указывает на то, что исследуемые протеиназы являются катаболическими ферментами, максимальный синтез которых наступает в период замедления роста культуры и перехода ее в стационарную фазу роста [Coleman et al., 1983]. Многие авторы описывают тот факт, что внеклеточные протеиназы *Bacillus* синтезируются в стационарной фазе роста, и их продукция регулируется углеродным и азотным стрессом [Joo and Chang, 2005; Contesini et al., 2017]. Стресс ассоциируется с началом стационарной фазы роста и переходом бактерий от вегетативного роста к споруляции [Contesini et al., 2017]. Итак, продукция протеиназ у многих бацилл часто связана со стадией споруляции.

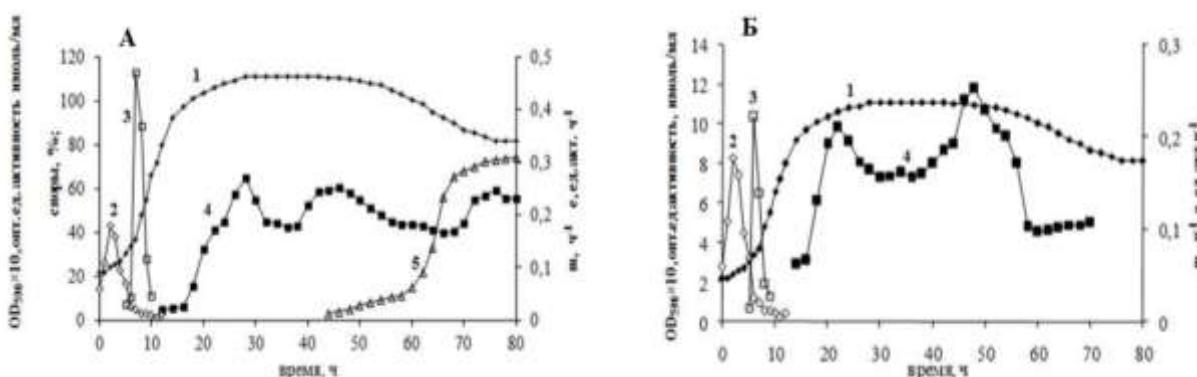


Рисунок 26 – Динамика роста (1), удельной скорости роста (2), протеолитической активности (3), удельной скорости накопления фермента (ε) (4) и спорообразования (5) *B. amyloliquefaciens* H2 ($\sigma \leq 10\%$). А – субтилизиноподобная протеиназа. Б – глутамилэндопептидаза.

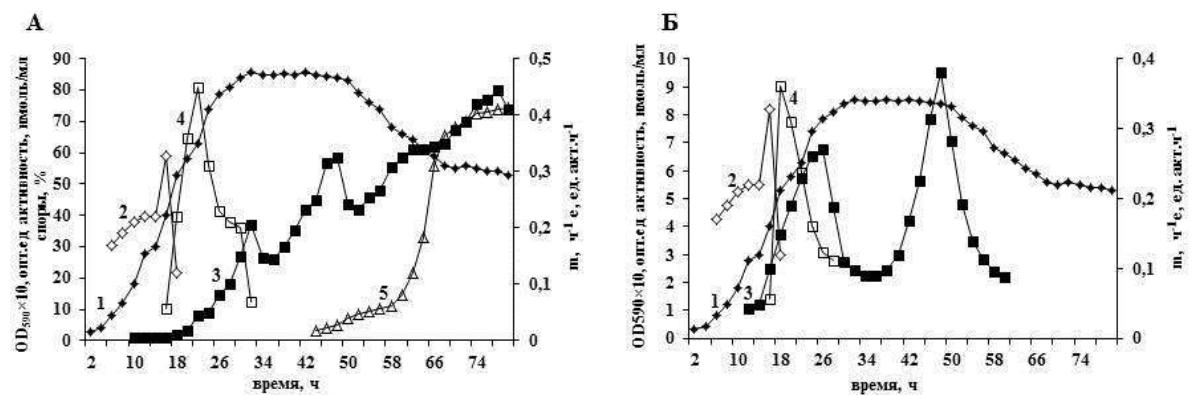


Рисунок 27 – Динамика роста (1), удельной скорости роста (μ) (2), протеолитической активности (3), удельной скорости накопления фермента (ε) (4) и спорообразования *B. pumilus* KMM62 ($\sigma \leq 10\%$). А – субтилизиноподобная протеиназа. Б – глутамилэндопептидаза.

Для выделения протеолитических ферментов ранней и поздней стационарной фазы роста из культуральной жидкости *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* использовали методы ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Mono-S в системе FPLC. Электрофоретический анализ белков в ПААГ-SDS

показал наличие в каждом препарате только одного полипептида (рис. 28). Молекулярные массы протеиназ, секретируемых на разных стадиях роста *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus*, одинаковы и для субтилизиноподобных протеиназ соответствуют 30 и 31 кДа, а для глутамилэндопептидаз – 26 и 26.5 кДа.

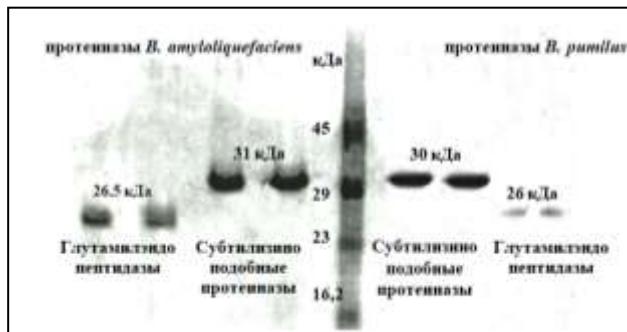


Рисунок 28 – ПААГ-DS-На-электрофорез гомогенных препаратов сериновых протеиназ *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus*. Маркеры: овальбумин куриного яйца (45 кДа), карбоксиангидраза бычих эритроцитов (29 кДа), соевый ингибитор трипсина (23 кДа), α -лактоальбумин (16.2 кДа).

В таблице 2 представлены физико-химические и энзиматические свойства выделенных протеиназ.

Таблица 2. Свойства протеиназ бацилл

	<i>B. amyloliquefaciens</i>		<i>B. pumilus</i>		<i>B. amyloliquefaciens</i>	
	Субтилизиноподобные протеиназы				Глутамилэндопептидазы	
	1	2	1	2	1	2
ингибиторы	PMSF, DFP		DFP		DFP	
pH _{оптимум}	8.5	9.0	8.5	8.5	8.2-8.5	8.0
pH _{стабильность}	7.2-9.5		7.2-9.5		7.2-9.5	7.2-8.5
T _{оптимум}	37 °C	37 °C	30 °C	30 °C	45 °C	45 °C
T _{стабильность}					22-45 °C	22-45 °C
Субстраты:	Удельная активность при гидролизе, Ед/мл					
Z-Ala-Ala-Leu-pNa	11.0	19.0	0.93	0.78	–	–
Glp-Ala-Ala-pNA	31.0	36.0	1.85	4.4	–	–
Z-Ala-Ala-Met-Glu-pNA	–	–	–	–	4.89	10.33
Z-Ala-Ala-Leu-Glu-pNA	–	–	–	–	11.75	20.09
Z-Ala-Ala-Phe-Glu-pNA	–	–	–	–	8.97	17.24

Ранее показано, что помимо трофической функции внеклеточные протеиназы участвуют в споруляции бацилл [Шарипова с соавт., 2002;

Errington et al., 1993]. Анализ активности маркерного фермента β -галактозидазы позволил установить, что протеиназы *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* поздней стационарной фазы роста являются секретируемыми, а не накапливаются в культуральной жидкости в результате лизиса клеток бацилл. Кроме того, к моменту активного синтеза протеиназ поздней стационарной фазы роста обоих видов бацилл количество спор в культуре не превышает 10-15%, а значительное увеличение их количества начинается только после 60 ч роста. Поэтому максимум накопления протеиназ на 46-48 ч роста культур связан с секрецией протеиназ, а не с выходом в среду ферментов в результате массового лизиса клеток. Третий максимум (70-76 ч роста) накопления ферментов, обнаруженный нами в культуральной жидкости *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus*, по-видимому, уже обусловлен массовым лизисом клеток, поскольку число спор в это время достигает 75-80%.

Оптимизация сред для продукции сериновых протеиназ

Анализ влияния различных компонентов среды и добавок показывает, что продуктивность протеиназ разных штаммов зависит от состава среды культивирования бактерий [Sharma et al., 2017]. Нами использована среда, ранее разработанная для культивирования штамма *B. intermedius* 3-19 [Ицкович с соавт., 1995], как исходная для оптимизации продуктивности культур *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* по синтезу внеклеточных сериновых протеаз. Продуктивность этих бацилл в отношении синтеза субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы на исходной среде ниже по сравнению с *B. intermedius* 3-19 в 20 и 2-3 раза соответственно. Поэтому возникла необходимость повышения продуктивности культур для получения исследуемых белков в препаративных количествах. Известно, что подбор оптимальных условий синтеза позволяет повысить выход ферментов в десятки раз [Beg et al., 2002]. Оптимизация питательной среды для синтеза сериновых протеиназ *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* позволила нам повысить уровень активности субтилизиноподобных протеиназ 1 и 2 *B. amyloliquefaciens* H2 в 2 и 1.6 раз соответственно по сравнению с исходной средой, а в случае субтилизиноподобных протеиназ 1 и 2 *B. pumilus* КММ 62 – в 10 и 6.5 раз. Оптимизация состава сред позволила также повысить уровень активности в среде глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens* в 1.45 и 1.3 раза, а глутамилэндопептидаз *B. pumilus* – в 1.3-1.2 раза. Интересно отметить, что оптимальные концентрации пептона и неорганического фосфата значительно различаются для протеиназ, секретируемых в разные фазы роста культуры. Так, для «поздней» глутамилэндопептидазы *B. pumilus* необходимо в два раза больше фосфора, чем для накопления глутамилэндопептидазы 1 (0.2 и 0.4 г/л). Кроме того, для активного синтеза обоих ферментов требуется присутствие в среде высокого содержания пептона (42-45 г/л), что в два раза больше, чем необходимо для накопления глутамилэндопептидаз *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus*. Данные по подбору

оптимальных концентраций компонентов среды подтверждают тот факт, что для каждого продуцента необходимо подбирать условия эффективной продукции протеиназ [Mothe and Sultanpuran, 2016; Sharma et al., 2017].

Оптимизация по другим компонентам среды (соли аммония, белки, дрожжевой экстракт и аминокислоты) показывает, что эти компоненты влияют в разной степени на уровень биосинтеза внеклеточных протеиназ бацилл. Более того, разные аминокислоты способны активировать или ингибировать биосинтез протеиназ. В случае штамма *B. pumilus* КММ 62 нами установлено, что уровень протеолитической активности на разных стадиях роста бактерий зависит от типа и концентрации аминокислот, дополнительно вносимых в среды. Так, гидрофобные аминокислоты лейцин и триптофан по-разному влияют на накопление протеиназы в раннюю и позднюю стационарную фазу роста. Наиболее выраженный стимулирующий эффект проявляют лейцин и аспарагин в концентрациях 0.1%.

Таким образом, для повышения продуктивности бактерий по синтезу различных внеклеточных протеиназ важным этапом работы является оптимизация состава среды по различным компонентам. Необходимо учитывать активирующий или репрессирующий эффекты разных компонентов. В случае *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* модификация сред позволила нам повысить уровень накопления в среде культивирования сериновых протеиназ в 2-10 раз в сравнении с исходной средой.

Регуляция биосинтеза внеклеточных протеиназ бацилл

Различное влияние компонентов среды на биосинтез протеиназ разных штаммов бацилл позволяет предположить наличие сложных путей регуляции биосинтеза этих ферментов. Для исследования этого вопроса проведено секвенирование и BLAST анализ последовательности гена сериновой протеиназы (*aprBp*) *B. pumilus* 3-19 и его регуляторной области и показано, что ген *aprBp* имеет 71% гомологии с генами субтилизина *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* и 91% гомологии с субтилизиноподобной протеиназой из штамма *B. pumilus*. Анализ регуляторной области гена *aprBp* позволил выявить участок протяженностью 81 п.о. с 61% гомологии с регуляторной областью гена *aprE* *B. subtilis*. Такая низкая гомология регуляторной области анализируемых генов может свидетельствовать о вовлечении разных путей регуляции в экспрессию гомологичных генов у разных штаммов бацилл.

Анализ регуляторной области гена *aprBp* позволил выявить гипотетические сайты связывания с регуляторными белками. Идентифицирован tandemный повтор сайтов Spo0A-box и несколько сайтов с консенсусами, распознаваемыми регулятором ответа DegU. Боксы Spo0A расположены близко к потенциальным консенсусам DegU или перекрываются с ними. Это свидетельствует о том, что обе системы регуляции не могут быть активированы одновременно. Мы провели исследования экспрессии гена *aprBp* в штамме *B. subtilis* AJ73, дефицитном по внеклеточным протеиназам, и обнаружили два максимума накопления

субтилизиноподобной протеиназы в культуральной жидкости. Изучение динамики споруляции штамма *B. subtilis* показало, что каждый из максимумов соответствует разным стадиям цикла споруляции, что позволило нам предположить, что субтилизиноподобная протеиназа, продуцируемая на разных стадиях роста бактерий, регулируется по-разному. Результаты нашего исследования показали, что экспрессия гена *aprBp* во время вегетативного роста подвержена эффективной репрессии глюкозой, в то время как на поздней стационарной фазе экспрессия гена *aprBp* нечувствительна к катаболитной репрессии (рис. 29).

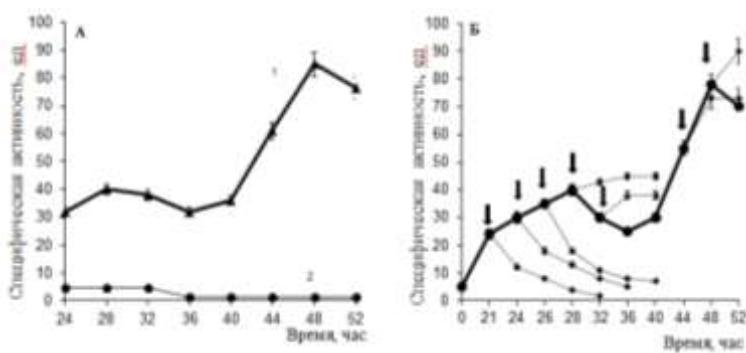


Рисунок 29 – Динамика экспрессии гена *aprBp* в AJ73 (pCS9) *B. subtilis* в среде, содержащей 1% глюкозы. LB-среду, не дополненную глюкозой, использовали в качестве контрольной среды и выделили жирным шрифтом (1). (А) Добавление 1% глюкозы в среду до культивирования (2).

(Б) Добавление 1% глюкозы на разных стадиях роста *B. subtilis* (3-9). Время внесения глюкозы обозначено стрелками.

Известно, что глобальный регуляторный белок CcpA играет критическую роль в контроле катаболических оперонов у *Bacillus*. Белок CcpA специфически связывается с сайтом *cre* (катаболитчувствительным элементом) в генах-мишениях, предотвращая инициацию транскрипции в присутствии глюкозы [Moreno et al., 2001; Fujita, 2009]. Как правило, последовательности *cre*, расположенные внутри или ниже региона промотора, важны для репрессии, в то время как *cre*-сайты, расположенные выше промотора, важны для активации [Brückner et al., 2002; Kim et al., 2005]. Наши данные в сочетании с идентификацией последовательности *cre*-консенсуса ниже по течению от промотора гена *aprBp* свидетельствуют о вовлечении механизмов катаболического контроля в экспрессию *aprBp* до начала накопления спор в культуральной жидкости, что подтверждено экспериментально. В соответствии с данными литературы, транскрипция гена *ccpA* опосредуется вегетативным сигмА-фактором [Yang et al., 2017]. Мы не обнаружили репрессивного эффекта глюкозы на продукцию субтилизиноподобной протеиназы во время поздней стационарной фазы роста рекомбинантного штамма AJ73 (pCS9) *B. subtilis*, что свидетельствует о различии в регуляции экспрессии *aprBp* на разных стадиях роста бактерий в соответствии со сложно устроенным промотором, содержащим различные сайты регуляции.

Анализ экспрессии *aprBp* в рекомбинантных клетках *B. subtilis* в условиях солевого стресса и в мутантах *B. subtilis deg*⁻ показал, что в условиях высокой солености наблюдается 2.5-25-кратное увеличение

производства фермента. Экспрессия гена протеиназы *B. pumilus* 3-19 в делеционных мутантах *degS-degU* *B. subtilis* сильно подавлена, что указывает на то, что для эффективной экспрессии гена *aprBp* требуется функционально активный оперон *DegS-DegU*. Напротив, в клетках мутантного штамма *B. subtilis* 8G5 *degU32* (Hy), характеризующегося гиперпродукцией *DegS-DegU*-регулируемых белков, обнаружен повышенный уровень экспрессии протеиназы. Полученные результаты согласуются с присутствием гипотетической последовательности-мишени связывания белка *DegU* в промоторной области *aprBp*. Из этих данных следует, что экспрессия *aprBp* подлежит положительной регуляции с помощью двухкомпонентной системы *DegS-DegU*. Участие регуляторной системы *DegS-DegU* позволяет нам предположить потенциальную роль этого фермента в физиологических реакциях *B. pumilus* 3-19 в фазе переходного состояния. Двухкомпонентная система *DegS-DegU* является частью регуляторной сети, контролирующей синтез ферментов деградации у *B. subtilis*, а также подвижность бактерий, образование биопленки и споруляцию [Kovács, 2016].

Анализ экспрессии гена *aprBp* в *spo0A*⁻ мутантном штамме *B. subtilis* показал, что регулятор *Spo0A*-ответа необходим для активации экспрессии субтилизиноподобной протеиназы (рис. 30). Дерепрессия экспрессии *aprBp* в клетках мутантов *spo0A*⁻-*abrB*⁻ *B. subtilis* согласуется с присутствием консенсусной последовательности, важной для связывания белка *AbrB* в регуляторном регионе гена *aprBp*. По-видимому, регуляторный белок *AbrB* участвует в отрицательном контроле экспрессии гена *aprBp*.

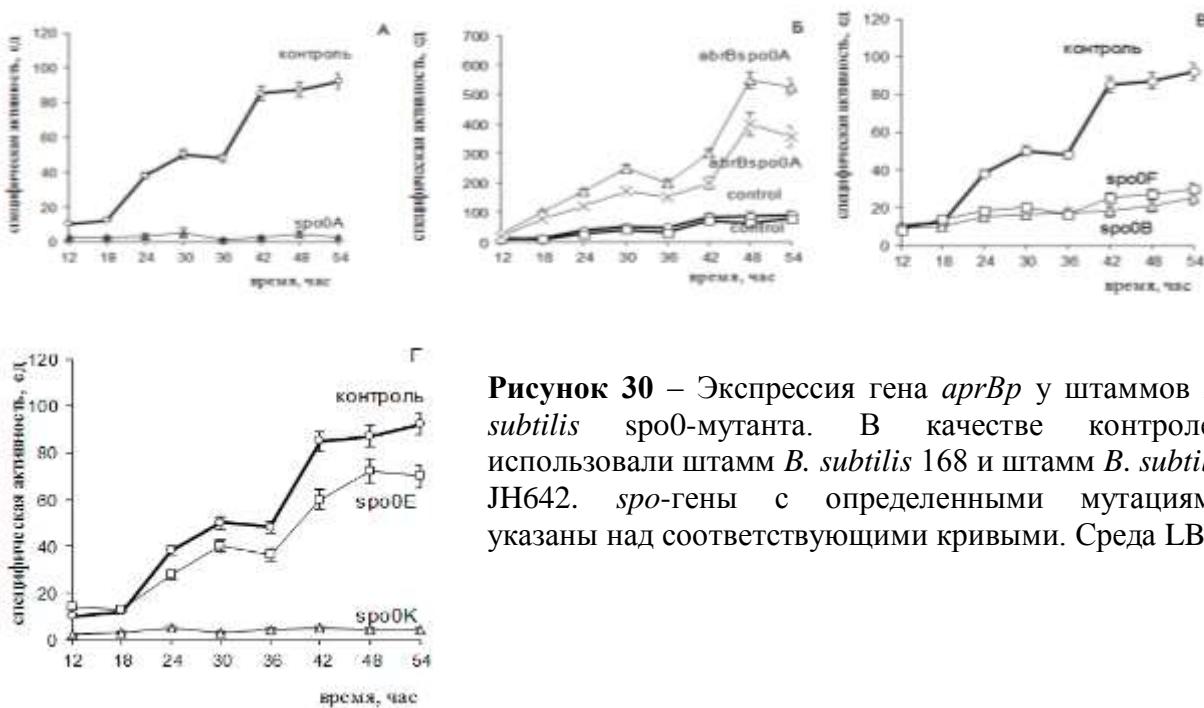


Рисунок 30 – Экспрессия гена *aprBp* у штаммов *B. subtilis* *spo0*-мутанта. В качестве контролей использовали штамм *B. subtilis* 168 и штамм *B. subtilis* JH642. *spo0*-гены с определенными мутациями указаны над соответствующими кривыми. Среда LB.

Известно, что регулятор *AbrB* *Bacillus* является важным глобальным репрессором транскрипции и действует как активатор для некоторых генов путем связывания с промоторами [Kim et al., 2003]. *AbrB* имеет широкий

спектр регуляторных функций, включая синтез клеточной стенки и мембранны, бактериальный хемотаксис, синтез антибиотиков, синтез и транспорт аминокислот, модификацию белка и т. д. [Strauch et al., 2007; Shu et al., 2018]. AbrB напрямую регулирует более 100 генов и косвенно влияет еще на сотни генов. Данные свидетельствуют, что уровень экспрессии AbrB ингибируется другим регуляторным белком Spo0A-P, что приводит к противоположной тенденции экспрессии гена AbrB по сравнению с экспрессией Spo0A-P, то есть высокой экспрессии в течение логарифмической фазы и низкой экспрессии в течение стационарной фазы [Banse et al., 2008; Chumsakul et al., 2011].

Транскрипционный фактор Spo0A должен фосфорилироваться фосфопередачей KinA-Spo0F-Spo0B для его положительной роли в транскрипции [Hoch and Varughese, 2001]. Репрессия гена *aprBp* в *spo0F*⁻, *spo0B*⁻ и *spo0A*⁻ мутантных штаммах позволяет нам предположить, что фосфорилированная форма Spo0A ответственна за активацию экспрессии *aprBp* в клетках *B. subtilis*. Основываясь на результатах по анализу экспрессии гена *aprBp* в клетках *B. subtilis* мутантных по гену *spo0E*, мы полагаем, что экспрессия *aprBp* и *spo0E* регулируется различными механизмами. Возможно, что субтилизиноподобная протеиназа не влияет на Spo0E-зависимый путь дефосфорилирования Spo0A-P. Мутации в локусе *spo0K* приводят к сильной репрессии гена *aprBp*, подтверждая идею о том, что биосинтез протеиназы может координироваться регуляцией транспорта олигопептидов через мембранны. Известно, что белок Spo0K участвует в мембранном транспорте пентапептидов, в частности инактивируя Rap-фосфатазы, которые контролируют путь направленного Spo0F дефосфорилирования [Perego and Brannigan, 2001; Solomon et al., 2003]. Заманчиво предположить, что субтилизиноподобная сериновая протеиназа может участвовать в направленном процессинге олигопептидов, предназначенных для переноса из клетки на внешнюю сторону мембранны и снова в клетки, выполняя регуляторную функцию на уровне популяции и отдельных клеток. Для штамма *B. pumilus* 3-19 активная форма субтилизиноподобной протеиназы первоначально обнаружена в цитоплазматической мемbrane и культуральной жидкости, но полностью отсутствует в цитоплазме [Sharipova et al., 2000].

Полученные данные позволяют предположить, что субтилизиноподобная протеиназа может участвовать в ряде регуляторных событий в начале споруляции бацилл.

Таким образом, в рекомбинантных клетках *B. subtilis* несколько различных двухкомпонентных систем взаимодействуют для контроля постэкспоненциальных фазовых реакций, включая продукцию ферментов деградации. Анализ экспрессии *aprBp* в штаммах-мутантах *B. subtilis* во время вегетативного роста и во время спорообразования выявил, что продукция субтилизиноподобной протеиназы наблюдается на обеих стадиях, но существенно возрастает в поздней стационарной фазе. Это позволяет

предположить, что эта протеиназа может участвовать в неспецифическом расщеплении структурных компонентов клеточной поверхности, способствуя высвобождению эндоспор в среду. Исследование экспрессии гена сериновой протеиназы *B. pumilus* 3-19 установило участие в его регуляции продуктов таких генов, как *spo0* и *degU*, катаболитной репрессии, а также продемонстрировало изменения в контроле биосинтеза фермента на разных стадиях роста бактерий. На рисунке 31 представлена схема регуляции гена *aprBp* различными факторами транскрипции. Как видно из рисунка, на стадии вегетативного роста, когда экспрессируется субтилизиноподобная протеиназа 1, промотор гена регулируется позитивно со стороны фактора транскрипции *DegU*-Р и отрицательно со стороны регулятора катаболитной репрессии *CspA* и плейотропного регулятора *AbrB*. На стадии II, когда происходит дифференцировка клеток бацилл (споруляция), наблюдается второй максимум накопления внеклеточной протеиназы (субтилизиноподобная протеиназа 2). Промотор фермента на этой стадии подвергается позитивному контролю со стороны фактора транскрипции *Spo0A*-Р.

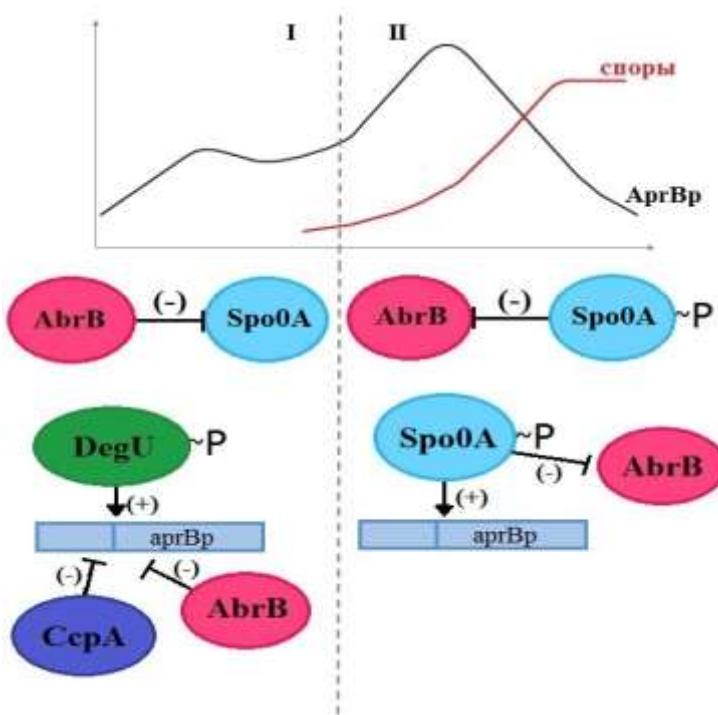


Рисунок 31 – Схема регуляции промотора гена субтилизиноподобной протеиназы *aprBp* *B. pumilus* 3-19 регуляторными факторами на разных стадиях роста. (+) – Положительный контроль, (-) – Отрицательный контроль. I – Стадия вегетативного роста. II – Стадия дифференцировки клеток бацилл.

Следовательно, экспрессия субтилизиноподобной протеиназы находится под контролем двух отдельных промоторов, индуцируемых во время вегетативного роста и споруляции, что предполагает сложную сетевую регуляцию экспрессии сериновых протеиназ у бацилл.

Таким образом, синтез экзопротеиназ разных видов бацилл, являющихся важными метаболическими ферментами, подвергается сложной и разнообразной регуляции с помощью множества факторов транскрипции.

Использование сериновых протеиназ бацилл

Тромболитическая терапия. Сердечно-сосудистые заболевания, связанные с тромбоэмбolicкими расстройствами, становятся основной причиной смертности в мире. По оценкам экспертов если в 2012 г. от таких заболеваний умерло около 17.5 млн человек, то в 2030 г. может умереть около 23.6 млн человек [Global status report on non-communicable diseases, 2014. World Health Organization; http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/]. Одним из методов лечения таких сердечно-сосудистых заболеваний является использование различных фибринолитических препаратов, таких как, например, тканевый активатор плазминогена (тPA) или бактериальные протеазы – стрептокиназы (SK) и стафилокиназа (SAK) [Keramati et al., 2013; Adivitiya and Yogender Pal Khasa, 2017]. В РФ зарегистрирован препарат Тромбовазим® на основе субтилизина, который также вследствие модификации (пегилирования) обладает низкой иммуногенностью и успешно применяется в терапии венозных тромбозов [Мадонов с соавт., 2015; Вышлов с соавт., 2016; Мишенина с соавт., 2016], что указывает на перспективность применения протеиназ бацилл в качестве тромболитических препаратов.

Следовательно, актуальным является поиск новых протеиназ с более высокой активностью, но меньшей антигенностью и/или большей фибриноспецифичностью. Недавно охарактеризованы протеиназы из различных штаммов с высокими тромболитическими и фибринолитическими свойствами [Sharma et al., 2019; Yao et al., 2019].

Исследование фибринолитических, тромболитических и антикоагулянтных свойств протеиназ *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* показывает, что субтилизиноподобные протеиназы *B. amyloliquefaciens* обладают высокой фибринолитической активностью в сравнении с другими известными ферментами, такими как субтилизиноподобная протеиназа 1 *B. intermedius* 3-19 [Ицкович с соавт., 1997], тиолзависимая протеиназа из *Thermoactinomyces vulgaris* [Лютова с соавт., 1990] (рис. 32). Необходимо отметить, что узкоспецифичные глутамилэндопептидазы *B. amyloliquefaciens* также проявляют фибринолитическую активность. В отличие от субтилизиноподобных протеиназ, глутамилэндопептидазы, по-видимому, в большей степени расщепляют фибрин и оказывают менее выраженное активирующее действие на плазминоген. Все исследуемые сериновые белки в высоких концентрациях (1 мг/мл) эффективно лизируют тромб, хотя наибольшей активностью обладают субтилизиноподобные протеиназы *B. pumilus*, а наименьшей – глутамилэндопептидазы *B. amyloliquefaciens*. Активность протеиназ сравнима с активностью известной протеиназы *Thermoactinomyces vulgaris*, которая в концентрации 330 мкг/мл растворяет тромб за 4.5 ч [Лютова с соавт., 1990]. Хотя субтилизиноподобная протеиназа *B. intermedius* 3-19 в концентрации 1 мг/мл лизирует тромб за 4.5 ч, в концентрациях 50-250 мкг/мл полного растворения тромба не происходит и за 24 ч инкубации [Ицкович с соавт., 1995]. В сравнении с этим субтилизиноподобные протеиназы *B. pumilus* КММ 62 в концентрации 25

мкг/мл полностью лизируют тромб за 24 ч, а концентрации 50 и 100 мкг/мл – за 17-20 и 6-10 ч соответственно, что свидетельствует об их высокой тромболитической активности, сравнимой с известными ферментами *Th. vulgaris* и *B. intermedius*. Способность протеиназы *B. pumilus* КММ 62 эффективно лизировать тромбы в низких концентрациях (25-100 мкг/мл) важна с точки зрения минимизации побочных токсических эффектов, характерных для протеиназ с широкой специфичностью. Более того, все исследованные нами бациллярные протеиназы обладают выраженными антикоагулянтными свойствами, сопоставимыми с таковыми для протеиназы *B. intermedius* 3-19 [Ицкович с соавт., 1995].

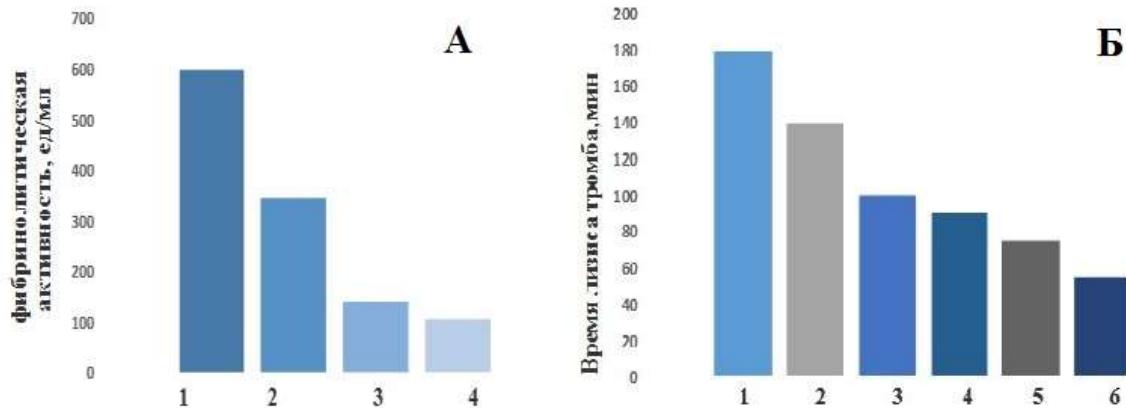


Рисунок 32 – (А) Фибринолитическая активность сериновых протеиназ: 1 и 2 – субтилизиноподобная протеиназа 1 и 2 *B. amyloliquefaciens*; 3 и 4 – глутамилэндопептидазы 1 и 2 *B. amyloliquefaciens*. **(Б)** Тромболитическая активность сериновых протеиназ: 1 и 2 – глутамилэндопептидазы 1 и 2 *B. amyloliquefaciens*; 3 и 4 – субтилизиноподобные протеиназы 1 и 2 *B. amyloliquefaciens*; 5 и 6 – субтилизиноподобные протеиназы 1 и 2 *B. pumilus*.

Таким образом, сериновые внеклеточные протеиназы *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* могут рассматриваться как потенциально перспективные ферменты для применения в качестве тромболитических препаратов.

Синтез пептидов. Известно, что синтез пептидов с помощью химических методов сложен, и это побуждает искать альтернативные подходы к синтезу пептидных веществ [Lombard et al., 2005]. Одним из возможных подходов является синтез пептидов с использованием протеиназ в качестве катализаторов. Показано, что протеолитические ферменты – химотрипсин, пепсин, папаин, термолизин и другие в специфических буферных растворах, чаще всего в водно-органических смесях, способны катализировать образование пептидных связей между аминокислотами и пептидами [Fruton, 1983; Malak, 1999; Lombard et al., 2005]. Хотя в водной среде равновесие сдвинуто в сторону гидролиза пептидной связи, направленное изменение условий реакции позволяет сместить равновесие в сторону ее синтеза. Небольшие пептиды были синтезированы с помощью сериновых протеиназ бацилл [Воюшина с соавт., 1985; Аникина с соавт., 2006; Malak et al., 2005]. В настоящей работе показано, что

субтилизиноподобные протеиназы 1 и 2 *B. amyloliquefaciens* способны катализировать синтез пептидных связей. Получен пептид Z-Ala-Ala-Leu-pNA, имеющий практическую ценность.

Таким образом, исследуемые субтилизиноподобные протеиназы могут использоваться для синтеза целевых пептидов.

Разрушение биопленок. Известно, что до 80% инфекций человека связаны с образованием биопленок. Это является одной из причин персистенции возбудителя в организме хозяина, ведет к хронизации инфекционных процессов, а также чрезвычайно затрудняет проведение антибиотикотерапии [Römling and Balsalobre, 2012; Krzyściak et al., 2017; Percival, 2017; Henly et al., 2019]. Одним из подходов в борьбе с биопленками является использование в сочетании с антибиотиками различных агентов, диспергирующих бактериальные биопленки [Niazi et al., 2014 и 2015; Hogan et al., 2017; Mugita et al., 2017]. Известно, что белки составляют значительную часть матрикса биопленок различных бактерий [Hobley et al., 2015]. Использование протеиназ для разрушения биопленок рассматривается как перспективная стратегия.

Исследовали действие внеклеточной сериновой субтилизиноподобной протеазы AprBp *B. pumilus* 3-19 на смешанные биопленки *P. aeruginosa* и *K. oxytoca* (рис. 33). Использовали препарат частично очищенной протеиназы с исходной активностью 10 ед/мл. Гомогенность препарата протеиназы составляла 94-96% по данным электрофореза в ПААГ DS-Na. Установили, что растворы фермента с активностью в 1 и 2 ед/мл не оказывали заметного влияния на биопленку при обработке в течение 4 ч. Растворы протеиназ с активностью 5 и 10 ед/мл снижали плотность смешанной биопленки на 22 и 51% соответственно.

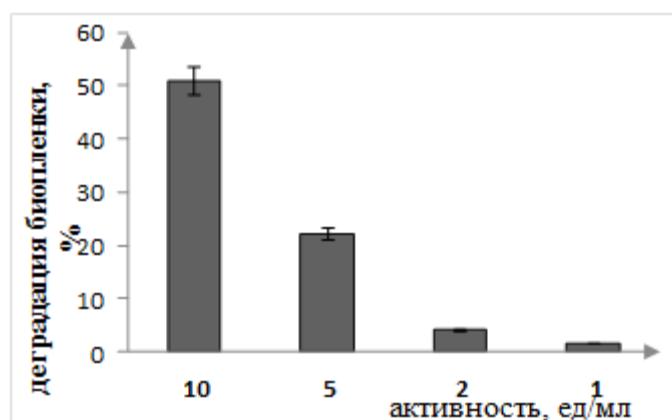


Рисунок 33 – Влияние внеклеточной сериновой протеазы AprBp *B. pumilus* 3-19 на смешанные биопленки *P. aeruginosa* RSC-2 и *K. oxytoca* RSC-2. 5-сут биопленки в 96-луночных полистироловых планшетах инкубировали с протеазой в течение 4 ч при 37 °C и окрашивали генцианом фиолетовым. За 100% принимали оптическую плотность биопленки без обработки протеиназой.

Оценили способность протеиназы AprBp к разрушению биопленки другой грамотрицательной бактерии – *S. marcescens*. С этой целью 7-сут биопленки *S. marcescens* обрабатывали раствором протеиназы (1 ед/мл) в течение 12 ч при 37 °C. Как видно из рисунка 34, фермент эффективно диспергировал биопленку за счет разрушения внеклеточного матрикса, что свидетельствует о важной структурной роли внеклеточных белков в стабилизации биопленок.

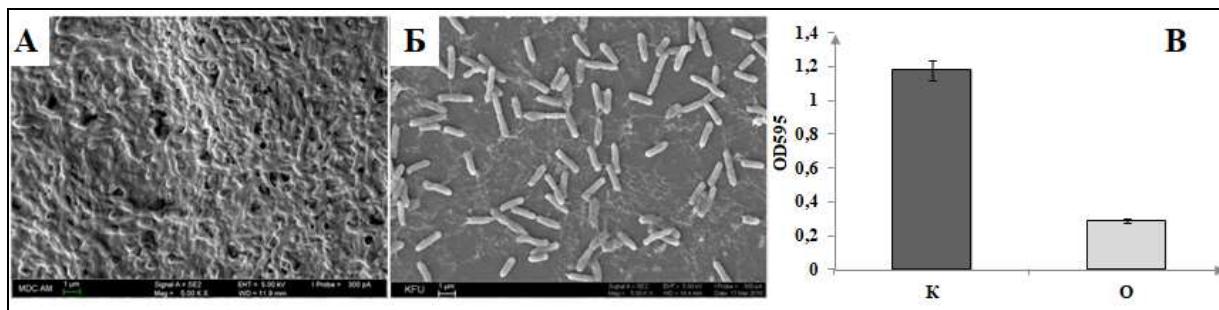


Рисунок 34 – Влияние субтилизиноподобной протеиназы AprBr *B. pumilus* 3-19 на 7-сут биопленки *Serratia marcescens*. Сканирующая электронная микроскопия на микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия): А (контроль) – биопленка без обработки протеиназой; Б (опыт) – биопленки после обработки протеиназой (1 ед/мл) в течение 12 ч при 37 °С. Также биопленки окрашивали генцианом фиолетовым и оценивали разрушение биопленки по связыванию красителя (В). К (контроль) – необработанная биопленка. О – биопленка, обработанная протеиназой.

Сравнение с трипсином и протеиназой К показало, что эффективнее всего биопленки псевдомонад разрушаются при их обработке трипсином и субтилизиноподобной протеиназой *B. pumilus* 3-19. Обработка протеазами (10 ед/мл) в течение 4 ч приводит к деструкции пленок на 39 и 49% соответственно (рис. 35, А). Увеличение времени обработки до 24 ч способствует практически полной деградации биопленок (рис. 35, Б).

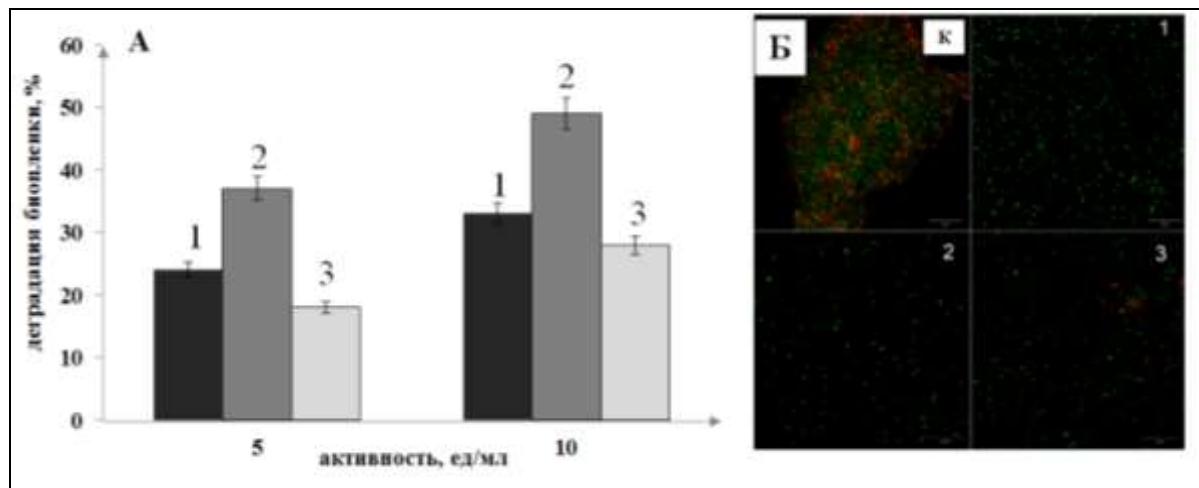


Рисунок 35 – (А) Влияние разных сериновых протеиназ на биопленки *P. aeruginosa* RSC-2. 5-сут биопленки в полистирольных планшетах инкубировали с протеиназами в течение 4 ч при 37 °С и окрашивали генцианом фиолетовым. Биопленки после обработки субтилизиноподобной протеиназой AprBr *B. pumilus* 3-19 (I), трипсином (II), протеиназой К (III). За 100% принимали связывание красителя необработанной биопленкой.

(Б) Флуоресцентная микроскопия биопленок *P. aeruginosa*, обработанных сериновыми протеиназами (5 ед/мл) в течение 24 ч: 1 – субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* 3-19, 2 – трипсин, 3 – протеиназа К. К (контроль) – необработанная биопленка.

Влияние различных протеолитических ферментов на биопленки активно изучается в течение длительного времени. Например, использование

иммобилизованных протеиназы В (0.025 Ед/мл) и Нейтразы (1.07 Ед/мл) приводило к уменьшению образования биопленок *P. aeruginosa* на 25% и 72% соответственно после 6 ч инкубации. Алкалаза (0.125 Ед/мл) снижает образование биопленок у *S. aureus* на 20 % [Pierre et al., 2015]. Известно, что сериновые протеиназы регулируют образование и дисперсию биопленок в естественных условиях [Barbara et al., 2013]. Показана способность сериновых протеиназ к разрушению биопленок [Vandecandelaere et al., 2014], а также синергическое действие ферментов при использовании наряду с протеиназами амилаз и липаз [Tsiaprazi-Stamou et al., 2019].

Таким образом, субтилизиноподобная протеиназа *B. ruminis* 3-19 способна эффективно разрушать биопленки, образованные грамотрицательными патогенами. Воздействие субтилизиноподобной протеиназы на биопленки сопоставимо с действием коммерческих протеиназ – трипсина и протеиназы К. Отсутствие цитотоксичности свидетельствует о том, что мишенью протеиназ являются белки матрикса биопленок, играющих структурную функцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ протеолитических ферментов двух групп бактерий – грамотрицательных энтеробактерий и грамположительных бацилл – показал, что бактерии обладают широким арсеналом протеиназ с различными свойствами. Геномы бактерий насыщены генами протеолитических ферментов: в геноме *S. grimesii* их количество составляет 3.5% от всех белок-кодирующих генов. Самые многочисленные группы – сериновые протеиназы (67) и металлопротеиназы (47). Из клеток *S. grimesii* A2 выделена новая металлопротеиназа – гримелизин с узкой субстратной специфичностью, способная ограниченно расщеплять скелетно-мышечный актин. В геномах других видов энтеробактерий идентифицированы гомологи этой протеиназы. Идентичность последовательности гримелизина с белками внутри рода *Serratia* достигает 85-97%, с гомологами из *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter* и некоторых других видов – 70-74%, а с белками эволюционно отдаленных *M. morganii* ZM и *P. stuartii* составляет 48 и 38%. Несмотря на идентичность активных центров протеиназ, они различаются по характеру расщепления актина: металлопротеиназы морганеллы и провиденсии расщепляют актин неограниченно. Анализ структурной организации локусов генов гримелизиноподобных протеиназ показал высокую консервативность локуса только в пределах рода. В случае бактерий, эволюционно отдаленных от серраций, гены гомологов организованы индивидуальным образом в отличие от гена гримелизина, входящего в оперон вместе с геном гипотетического белка с неизвестной функцией. Промоторы генов гомологов гримелизина содержат также различные сайты регуляции, что свидетельствует о разнообразии в регуляции этих ферментов в клетках различных видов бактерий. Наличие в клетках

бактерий актиноподобных белков, третичная структура которых близка структуре скелетно-мышечного актина, может свидетельствовать о функциональной роли гримелизина в протеолизе прокариотических актиноподобных белков. Благодаря способности к ограниченному протеолизу актина гримелизин может быть использован в структурно-функциональном анализе взаимодействия актина с актин-связывающим белком ДНКазой I.

Показано, что разные виды бацилл способны секретировать в среду культивирования различные сериновые протеиназы: неспецифическую субтилизиноподобную протеиназу и узкоспецифическую глутамилэндопептидазу, которые имеют практическую и коммерческую значимость. Оптимизация сред по основным источникам питания позволяет значительно повысить продуктивность штаммов, что важно с биотехнологической точки зрения. Показано, что биосинтез внеклеточных протеиназ подвергается сложной координированной регуляции несколькими двухкомпонентными системами, и регуляция синтеза протеиназ различается в разные фазы роста продуцентов, что необходимо учитывать при разработке стратегии их получения в промышленных масштабах. Исследуемые протеиназы бацилл обладают высоким потенциалом практического применения в медицине и сельском хозяйстве.

Полученные в работе данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Выделена и охарактеризована новая внутриклеточная металлопротеиназа *S. grimesii* – гримелизин, расщепляющая скелетно-мышечный актин строго в ДНКазе I-связывающей петле по связи Gly42-Val43 с образованием «расщепленного» актина, представляющего комплекс из 36- и 8 кДа-фрагментов, Са-связанная форма которого теряет способность к полимеризации. Новый фермент является удобным инструментом для исследования физико-химических свойств актина. В геноме штамма *S. grimesii* A2 содержится 4396 белок-кодирующих генов, среди которых идентифицированы 47 генов, кодирующих металлопептидазы и в том числе ген гримелизина – металлопротеиназы семейства M4. Ген гримелизина входит в состав оперона с геном гипотетического белка с неизвестной функцией под контролем конститутивного промотора.

2. Актин, расщепленный гримелизином по связи Gly42-Val43, сохраняет структуру, близкую к нативной, но отличается по свойствам от актина, расщепленного субтилизином или химотрипсином. Ограниченный протеолиз актина гримелизином не приводит к выраженным структурным изменениям вокруг сайта расщепления, «расщепленный актин» образует стабильный комплекс с ДНКазой I, но теряет способность подавлять активность фермента. Присоединение ДНКазы-I к нативному или «расщепленному актину» вызывает структурные изменения в субдомене-1 (эпитопы 18-28 и 95-105, Cys10). Замена АТФ-Са²⁺ на АТФ-Мg²⁺ в мономере актина препятствует распространению этих структурных изменений на «быстрым» конце, частично восстанавливает ингибиторную способность

«расщепленного актина» и позволяет получить тройной комплекс ДНКаза-І-актин-CapZ.

3. Секвенированы гены гипотетических гримелизиноподобных металлопротеиназ *M. morganii* ZM и *P. stuartii* NK. Анализ показал, что 11 аминокислотных остатков, которые входят в активные сайты, идентичны соответствующим сайтам гримелизина, несмотря на небольшое сходство первичных структур белков. Из клеток *M. morganii* ZM выделена в высокоочищенном виде новая металлопротеиназа с молекулярной массой 35 кДа, способная неограниченно расщеплять актин, азоказеин и желатин. Эффективность инвазии *M. morganii* ZM, *P. stuartii* NK и *P. mirabilis* 5127-1 клеток HeLa зависит от возраста бактериальной культуры и инфицирующей дозы. Цитопатическое действие бактерий *P. mirabilis* в отношении клеток M HeLa обусловлено активностью внеклеточной протеиназы Zap A, отсутствующей у бактерий *M. morganii* ZM.

4. Из клеток цианобактерий *Synechocystis* sp. и *Spirulina* sp. выделены актиноподобные белки с молекулярной массой 56 кДа, которые реагировали с антителами к эпитопам 18-28 и 105-120 скелетно-мышечного актина. Актиноподобные белки *Synechocystis* и *Spirulina* связывают α -актинин и филамин подобно скелетно-мышечному актину. Из клеток *Spirulina* выделен α -актининоподобный белок с молекулярной массой 105 кДа. Антигенная реактивность актиноподобных белков цианобактерий свидетельствует о сходстве их третичной структуры со структурой актина.

5. Из культуральной жидкости *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* выделены и охарактеризованы сериновые протеиназы, секретируемые на разных стадиях роста бактерий. Оптимизация состава среды культивирования позволяет увеличить продукцию протеиназ в 2-10 раз. Экспрессия субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B. pumilus* в период вегетативного роста негативно регулируется катаболитной репрессией и позитивно – фактором транскрипции DegU, на стадии дифференцировки клеток экспрессия протеиназы возрастает под действием позитивного фактора транскрипции Spo0A. Субтилизиноподобные протеиназы бацилл обладают выраженной фибринолитической, тромболитической и антикоагулянтной активностями, катализируют синтез трипептида Z-Ala-Ala-Leu-pNA, способны эффективно разрушать биопленки, образованные грамотрицательными патогенными бактериями, что свидетельствует о высоком потенциале использования исследуемых протеиназ.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СТАТЕЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Kabanov D., Khabipova N., Valeeva L., Sharipova M., Rogov A., Kuznetsova S., Abaseva I., **Mardanova A.** Effect of Subtilisin-like Proteinase of *Bacillus pumilus* 3-19 on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms / BioNanoScience. – 2019. – V. 9, №2. – P. 515–520. WoS, Scopus IF=0.53
2. Kurmasheva N., Vorobiev V., Sharipova M., Efremova T., **Mardanova A.** The Potential Virulence Factors of *Providencia stuartii*: Motility, Adherence, and Invasion / BioMed Res. International. – 2018. – V.2018. – Article ID 3589135, 8 pages. WoS IF=2.58
3. Mitrofanova O., **Mardanova A.**, Evtugyn V., Bogomolnaya L., Sharipova M. Effects of *Bacillus* Serine Proteases on the Bacterial Biofilms / BioMed Res. International. – 2017. – V. 2017. – Article ID 8525912, 10 pages. WoS IF=2.58
4. Kurmasheva K., Skipina I., **Mardanova A.** Identification of Grimelysin-Like Metalloprotease Gene in the Genome of Bacterium *Providencia stuartii* / BioNanoScience. – 2017. – V.7. – P. 177–181. WoS, Scopus IF=0.53
5. Gilyazeva A.G., Toymencheva A.A., **Mardanova A.M.** Analysis of Genome Grimelysin-Containing Locus in the Genome of *Serratia grimesii* A2 / BioNanoScience. – 2016. – V.7, №2. – P. 320–322. Wos, Scopus IF=0.53
6. Tsaplina O., Bozhokina E., **Mardanova A.**, Khaitlina S. Virulence factors contributing to invasive activities of *Serratia grimesii* and *Serratia proteamaculans* / Arch. Microbiol. – 2015. – V.197, №3. – P. 481-488. WoS IF=1.64
7. **Mardanova A.M.**, Toymencheva A.A., Gilyazeva A.G., Kazakov S.V., Shagimardanova E.I., Khaitlina S.Yu., Sharipova M.R. Draft Genome Sequence of *Serratia grimesii* strain A2 / Genome Announcements. – 2014. – September/October. – V.2. – issue 5. – e00937-14. Scopus, WoS IF=0.48
8. Замалютдинова Н.М., Миннуллина Л.Ф., Шарипова М.Р., **Марданова А.М.** Новая металлоэндопептидаза *Morganella morganii* / Биоорганическая химия. – 2014. – Т.40, №6. – С.682-687. WoS IF=0.79
9. **Марданова А.М.**, Богомольная Л.М., Романова Ю.Д., Шарипова М.Р. Эффлюкс системы *Serratia marcescens* / Микробиология. – 2014. – Т.83, № 1. – С.3-14. WoS IF=1.027
10. Балабан Н.П., Данилова Ю.В., Шамсутдинов Т.Р., **Марданова А.М.**, Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Свойства глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus* на разных фазах роста рекомбинантного штамма / Биоорганическая химия. – 2013. – Т.39, №1. – С. 46-53. WoS IF=0.79
11. Шарипова М.Р., Тойменцева А.А., Сабирова А.Р., Мухаметзянова А.Д., Ахметова А.И., **Марданова А.М.**, Балабан Н.П. Новое филогенетическое положение штамма *Bacillus intermedius* 3-19 / Микробиология. – 2011. – Т.80, №3. – С.424-426. WoS IF=1.027
12. **Марданова А.М.**, Маликова Л.А., Балабан Н.Б., Замалютдинова Н.М., Шарипова М.Р. Субтилизиноподобная протеиназа, секретируемая штаммом *Bacillus pumilus* KMM 62 на разных фазах роста / Биоорганическая химия. – 2012. – Т.38, №2. – С.234-241. WoS IF=0.79
13. Михайлова Е.О., **Марданова А.М.**, Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Ильинская О.Н., Шарипова М. Р. Биохимические свойства субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus*

subtilis в стационарной фазе роста / Биохимия. – 2009. – Т.74, №.3. – С. 380-388. WoS

14. Mikhailova E.O., Balaban N. P., **Mardanova A. M.**, Rudakova N.L., Ilyinskaya O.N., Rudenskaya G.N., Rizvanov A.A., Sharipova M.R. Purification of subtilisin-like serine proteinase from recombinant *Bacillus subtilis* during different phases of growth / Annals of Microbiology. – 2009. – V.59, №2. – P. 301-307. Scopus IF=0.46
15. Sharipova M., Balaban N., Kayumov A., Kirillova Y., Gabdrakhmanova L., **Mardanova A.**, Leshchinskaya I., Rudenskaya G., Akimkina T., Safina D., Demidyuk I., Kostrov S. The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* / Microbiological Research. – 2008. – V.163, №1. – P.39-50. WoS IF=2.56
16. Balaban N.P., **Mardanova A.M.**, Malikova L.A., Shamsutdinov T.R., Ilinskaya O. N., Rudenskaya G. N., Sharipova M. R. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* endopeptidase that is secreted in stationare phase of culture growth / Annals of Microbiology. – 2008. – V. 58, №4. – P. 697-704. Scopus IF=0.46
17. Михайлова Е.О., Балабан Н.П., **Марданова А.М.**, Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73 на разных фазах роста бацилл / Биохимия. – 2007. – Т.72, № 2. – С. 228-235. WoS
18. Шагимарданова Е.И., Частухина И.Б., Балабан Н.П., **Марданова А.М.**, Шамсутдинов Т. Р., Костров С. В., Шарипова М Р. Гетерологичная экспрессия гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* рекомбинантными штаммами *Bacillus subtilis*, дефектными по регуляторным белкам / Микробиология. – 2007. – Т.5. – С. 645-651. WoS
19. Sharipova M.R., Shagimardanova E.I., Chastukhina I.B., Shamsutdinov T.R., Balaban N.P., **Mardanova A.M.**, Rudenskaya G.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V. The expression of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene in *Bacillus subtilis* recombinant strains / Mol Biol Rep. – 2007. – V.34. – P. 79-87. Scopus
20. Маликова Л.А., **Марданова А.М.**, Соколова О.В., Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Шарипова М.Ш. Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* KMM 62 / Микробиология. – 2007. – Т.76, №3. – С. 1-8. WoS
21. Балабан Н.П., Маликова Л.А., **Марданова А.М.**, Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Получение и характеристика субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых в стационарную фазу роста *Bacillus amyloliquefaciens* H2 / Биохимия. – 2007. – Т.72, № 4. – С. 568-575. WoS
22. Кириллова Ю.М., Михайлова Е.О., Балабан Н.П., **Марданова А.М.**, Руденская Г.Н., Костров С.В., Шарипова М.Р. Условия роста культуры и биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Микробиология. – 2006. – Т.75, №2. – С. 172-178. WoS
23. Кириллова Ю.М., Михайлова Е.О., Балабан Н.П., **Марданова А.М.**, Каюмов А.Р., Руденская Г.Н., Костров С.В., Шарипова М.Р. Особенности биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* // Микробиология. – 2006. – Т.75, №2. – С.79-185. WoS
24. Балабан Н.П., **Марданова А.М.**, Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Соколова Е.А., Руденская Г.Н., Лещинская И.Б. Очистка и характеристика тиолзависимой сериновой протеиназы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 / Биохимия. – 2004. – Т.69, №4. – С. 519-526. WoS

25. Balaban N., Gabdrachmanova L., Sharipova M., Sokolova E., Malikova L., **Mardanova A.**, Rudenskaya G., Leshchinskaya I. Selection of cultivation medium for production of late stationary phase serine proteinases from *Bacillus intermedius* / J. Basic. Microbiol. – 2004. – V.44, №6. – P. 415–423. Scopus, WoS IF=1.89
26. Балабан Н.П., **Марданова А.М.**, Шарипова М.Р., Габдрахманова Л.А., Соколова Е.А., Гарусов А.В., Мильготина Е.И., Руденская Г.Н., Лещинская И.Б. Получение и характеристика глутамилэндопептидазы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 / Биохимия. – 2003. – Т.68. – С. 1514-1521. WoS
27. Balaban N.P., Gabdrakhmanova L.A., Sharipova M.R., **Mardanova A.M.**, Sokolova E.A., Rudenskaya G.N., Leshchinskaya I.B. Proteinases from *Bacillus intermedius* secreted in the late stages of sporulation / Med. Sci. Monit. – 2002. – V.8, №5. – С. 168-171. Scopus IF=1.59
28. **Usmanova A.**, Astier C., Mejean C., Hubert T., Feinberg J., Benyamin Y., Roustan C. Coevolution of actin and assotiated proteins: an α -actinin-like protein in a cyanobacterium (*Spirulina platensis*) / Comp. Biochem. Phisiol. B. Biochem. Mol. Biol. – 1998. – V.120, № 4. – P. 693-700. Scopus IF=1.99
29. Лещинская И.Б., Шакиров Е.В., Ицкович И.Л., Балабан Н.П., **Марданова А.М.**, Шарипова М.Р., Благова Е.В., Левдеков В.М., Куранова И.П., Руденская Г.Н., Степанов В.М. Глутаминовая эндопептидаза *Bacillus intermedius* штамма 3-19. Очистка, свойства и кристаллизация / Биохимия. – 1997. – Т.62, №8. – С. 1052-1059. WoS
30. Leschinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovitch N.L., Balaban N.P., **Mardanova A.M.**, Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius*, strain S-19 / FEBS Letters. – 1997. V.404. – P. 241-244. WoS IF=2.2
31. **Usmanova A.**, Astier C., Lebart M. C., Kwiatek O., Papa I., Boyer M., Roustan C., Benyamin Y. Analysis of long-range structural effects induced by DNAase-I interaction with actin monomeric form or complexed to Cap Z / Biochimie. – 1997. – V.79, №8. – P. 485-492. Scopus IF=3.36
32. Matveyev V.V., **Usmanova A.M.**, Morozova A.M., Collins J.H., Khaitlina S.Yu. Purification and characterization of the proteinase ECP 32 from *Escherichia coli* A2 strain / BBA. – 1996. – V.1296. – P. 55-62. WoS IF=3.61

ПАТЕНТЫ

1. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., **Марданова А.М.**, Ахметова А.И., Мухаметзянова А.Д., Шагимарданова Е.И., Тойменцева А.А., Нямсурэн Ч. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* 2А-5 с низкой протеолитической активностью, повышенной активностью фосфатазы, способ его получения и применения. Патент № 2511416. 24.10.2012.
2. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Ризванов А.А., **Марданова А.М.**, Каримова М.Р., Шагимарданова Е.И., Тойменцева А.А., Нямсурэн Ч. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* МК-10 с низкой протеолитической активностью и его применение. Патент № 2510821. 24.10.2012.
3. Данилова Ю.В., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., **Марданова А.М.**, Руденская Г.Н., Шамсутдинов Т.Р., Лютова Л.В. Применение рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* ТВ-06 в качестве продуцента глутамилэндопептидазы, вещества с тромболитическими и антикоагулянтными свойствами. Патент № 2611378. 08.06.2015.

МАТЕРИАЛЫ И ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. Шарипова, М.Р. Фитазы и протеазы как основа для кормовых добавок в птицеводстве // М.Р. Шарипова, А.М. **Марданова**, А.Д. Сулейманова, Н.Л. Рудакова, Д.С. Трошагина, А.О. Корягина, Д.С. Пудова, Д.Л. Иткина, С.Ю. Смоленцев // Материалы IV Международной научной конференции «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки». Ялта. – 2019. – С. 368-370.
2. Шарипова М.Р. Бактериальные ферменты как кормовые добавки в птицеводстве / М.Р. Шарипова, А.Д. Сулейманова, Н.Л. Рудакова, Д.С. Трошагина, А.О. Корягина, А.М. **Марданова**, М.Т. Лутфуллин, Г.Ф. Хадиева, С.Ю. Смоленцев // Актуальная биотехнология - 2018 - Материалы VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». Ялта. – 2018. – №3 (26). – С. 498
3. Kurmasheva, N.R. Adhesion of *Providencia stuartii* onto cultured bladder epithelial cells / N.R. Kurmasheva, M.R. Sharipova, А.М. **Марданова** // Mol. Biol. Cell. 2017 ASCB Annual Meeting Abstracts. – 2017. – V. 28 (26). – P.1617.
4. Курмашева, Н.Р. Идентификация гримелизин-подобной металлопротеиназы в геноме бактерий *Providencia stuartii* / Н.Р. Курмашева, И.М. Скипина, А.М. **Марданова** // Материалы Международной конференции «Трансляционная медицина 2016». Казань. – 2016. – С. 58.
5. Гилязева, А.Г. Анализ геномного локуса, содержащего ген гримелизина, в геноме *Serratia grimesii* / А.Г. Гилязева, А.А. Тойменцева, А.М. **Марданова** // Материалы Международной конференции «Трансляционная медицина 2016». Казань. – 2016. – С. 29.
6. Курмашева, Н.Р. Инвазивная способность бактерий *Providencia stuartii* и идентификация гримелизиноподобной протеиназы / Н.Р. Курмашева, А.М. **Марданова** // Материалы II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Материалы и технологии XXI века”. Казань. – 2016. – С. 53
7. Замалютдинова, Н.М. Внеклеточная протеиназа *Proteus mirabilis*: поиск гомологов и характеристика биосинтеза / Н.М. Замалютдинова, А.Г. Гилязева, А.М. **Марданова** Л.Ф. Миннуллина // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. – 2014. – С. 121.
8. **Марданова, А.М.** Роль *Morganella morganii* в этиологии заболеваний амбулаторных больных // А.М. **Марданова**, М.А. Шалавина, А.О. Арапова // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. – 2014. – С. 207.
9. Замалютдинова, Н.М. Сравнительная характеристика инвазивной способности *Proteus mirabilis* и *Morganella morganii* / Н.М. Замалютдинова, А.М. **Марданова** // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. – 2014. – С. 213.
10. Замалютдинова, Н.М. Инвазия *Morganella morganii* ZM в клетки HeLa / Н.М. Замалютдинова, А.М. **Марданова** Л.Ф. Миннуллина // Материалы VI Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. Москва. – 2014. – С. 105.

11. Шляпникова Е.В. Идентификация гена металлопротеиназы в геноме условно-патогенной бактерии *Providencia stuartii* / Е.В. Шляпникова, **А.М. Марданова** // XX Международная конференция «Ломоносов – 2013». Москва. – 2013. – С. 221.
12. **Марданова, А.М.** Металлопротеиназы условно-патогенных микроорганизмов / **А.М. Марданова**, Н.М. Замалютдинова, А.Г. Гилязева, Л.М. Богомольная // Материалы VI-го Российского симпозиума «Белки и пептиды». Уфа. – 2013. – С. 271.
13. Гилязева А.Г. Биоинформационный анализ в геномах энтеробактерий генов металлопротеиназы / А.Г. Гилязева, Н.М. Замалютдинова, **А.М. Марданова** // Материалы III Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. – 2012. – С. 181-182
14. Шляпникова, Е.В. Поиск гена гримелизина в геноме энтеробактерий рода *Providencia* / Е.В. Шляпникова, Н.М. Замалютдинова, **А.М. Марданова** // Материалы III Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. – 2012. – С. 101.
15. Бондырева Н.М., Особенности биосинтеза внеклеточных протеиназ *Proteus mirabilis* / Н.М. Бондырева, **А.М. Марданова** // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее». МГУ им. М.В. Ломоносова. Москва. – 2011. – С. 21.
16. **Марданова, А.М.** Внеклеточные протеиназы *Proteus mirabilis* / **А.М. Марданова**, Н.М. Бондырева // Материалы V Российского симпозиума «Белки и пептиды». Петрозаводск. – 2011. – С. 247.
17. Шамсутдинов Т.Р. Свойства глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, продуцируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста / Т.Р. Шамсутдинов, А.А. Тойменцева, Ю.В. Данилова, А.М. Черемин, Н.П. Балабан, **А.М. Марданова**, М.Р. Шарипова // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск. – 2008. – С. 381.
18. **Марданова, А.М.** Внеклеточные сериновые протеиназы *Bacillus pumilus* КММ 62 / **А.М. Марданова**, Л.А. Маликова, Н.П. Балабан, О.А. Мовчан, М. Р. Шарипова // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск. – 2008. – С. 378.
19. **Марданова, А.М.** Оптимизация условий биосинтеза внеклеточных субтилизиноподобных протеиназ *Bacillus amyloliquefaciens* H2 и *Bacillus pumilus* КММ 62 / **А.М. Марданова**, Л.А. Маликова, Е.И. Фрузенкова, О.В. Соколова, Н.П. Балабан // Материалы VI Симпозиума «Химия протеолитических ферментов». Москва. – 2007. – С. 60-61.
20. Маликова, Л.А. Тромболитические и антикоагулянтные свойства субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых культурами *Bacillus amyloliquefaciens* H2 и *Bacillus pumilus* КММ 62 / Л.А. Маликова, Н.П. Балабан, О.В. Соколова, Г.Н. Руденская, **А.М. Марданова** // Материалы VI симпозиума «Химия протеолитических ферментов». Москва. – 2007. – С. 157-158.
21. Балабан, Н.П. Выделение и характеристика внеклеточной сериновой протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* H2 / Н.П. Балабан, Л.А. Маликова, О.А.

- Мовчан, А.М. **Марданова**, Г.Н. Руденская // Материалы VI симпозиума «Химия протеолитических ферментов». Москва. – 2007. – С. 67-68.
22. Маликова, Л.А. Субтилизиноподобные протеиназы *Bacillus amyloliquefaciens* / Л.А. Маликова, Т.Р. Шамсутдинов, Г.Н. Руденская, А.М. **Марданова** // Материалы XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». Казань. – 2005. – С. 55-56.
23. Маликова, Л.А. Сериновые протеиназы *Bacillus pumilus*, секрецируемые в позднюю стационарную фазу роста / Л.А. Маликова, О.В. Соколова, А.М. **Марданова**, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». Казань. – 2005. – С. 57-59.
24. Kadyrova, J.M. Expression of *Bacillus intermedius* serine protease in *Bacillus subtilis* recombinant strains / J.M. Kadyrova, M.R. Sharipova, N.P. Balaban., А.М. **Марданова**, L.A. Gabdrakhmanova, S.V. Kostrov, G.N. Rudenskaya, I.B. Leshchinskaya // Abstracts FEMS Congress of European Microbiologist “Bacillus-2003”. Ljubljana, Slovenia. – 2003. – Р. 32.
25. Шарипова, М.Р. Бациллы – продуценты внеклеточных протеиназ / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, А.М. **Марданова**, Л.А. Габдрахманова, Ю.М. Кадырова, С.В. Костров, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Материалы I Международного конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития». Москва. – 2002. – С. 224.
26. Балабан, Н.П. Секрецируемые протеиназы *Bacillus intermedius* поздней стационарной фазы роста. / Н.П. Балабан, А.М. **Марданова**, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Материалы V симпозиума «Химия протеолитических ферментов». Москва. – 2002. – С. 48.
27. **Марданова А.М.** Влияние аутоиндукторов анабиоза на активность секрецируемых протеиназ *Bacillus intermedius* / А.М. **Марданова**, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, И.Б. Лещинская, Г.И. Эль-Регистан // Материалы V симпозиума «Химия протеолитических ферментов». Москва. – 2002. – С. 106.
28. Балабан, Н.П. Глутамилэндепептидазы *Bacillus intermedius*, секрецируемые на разных фазах роста / Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, А.М. **Марданова**, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Материалы V симпозиума «Химия протеолитических ферментов». Москва. – 2002. – С. 109.
29. **Марданова, А.М.** Получение и характеристика протеиназ *Bacillus intermedius*, секрецируемых на поздних стадиях развития / А.М. **Марданова**, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова, Л.А. Габдрахманова, Е.А. Соколова, Г.Н. Руденская, Г.И. Эль-Регистан, И.Б. Лещинская // Материалы III-го съезда Биохимического общества. Санкт-Петербург. – 2002. – С. 593.
30. Shakirov, E. Glutamilendopeptidase from *Bacillus intermedius* / E. Shakirov, A. **Марданова** // Abstracts of 8-th European Congress on Biotechnology. Budapest. – 1997. – Т. VI. – 1128. – Р. 144.