

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОРИНА, НОВОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ ИЗ ЭНТОМОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *Photorhabdus laumondii*

© 2023 И.М. Бердышев^{1#}, А.О. Светлова^{1#}, К.Н. Чухонцева¹, М.А. Карасева¹,
А.М. Варижук², В.В. Филатов³, С.Ю. Клеймёнов^{4,5}, С.В. Костров¹, И.В. Демидюк^{1*}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: ilyaduk@yandex.ru

² Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Институт проблем химической физики РАН, 142432 Черноголовка, Московская обл., Россия

⁴ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия

⁵ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН,
119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.04.2023

После доработки 27.05.2023

Принята к публикации 17.06.2023

Энтомопатогенные бактерии рода *Photorhabdus* секретируют протеазу S (PrtS), которая рассматривается как фактор вирулентности. Нами обнаружено, что в геномах *Photorhabdus* непосредственно за генами *prtS* расположены гены, которые кодируют небольшие гипотетические белки, гомологичные эмфорино, открытому недавно белковому ингибитору металлопротеаз. Ген эмфориноподобного ингибитора из *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii* TT01 был клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Рекомбинантный белок, названный фоторином (Phin), очищен с помощью металл-хелатной аффинной и гельпроникающей хроматографии и охарактеризован. Установлено, что Phin является мономером и ингибирует активность протеализина и термолизина, относящихся, как и PrtS, к семейству пептидаз М4. Константы ингибирования составили $1,0 \pm 0,3$ и 10 ± 2 мкМ соответственно. Продемонстрировано также, что Phin способен подавлять протеолитическую активность культуральной жидкости *P. laumondii* (концентрация полумаксимального ингибирования $3,9 \pm 0,3$ нМ). Получены поликлональные антитела к Phin, и методом иммуноблоттинга показано, что Phin продуцируется клетками *P. laumondii*. Таким образом, гены *prtS* у энтомопатогенных бактерий рода *Photorhabdus* колокализированы с генами эмфориноподобных ингибиторов, которые, вероятно, регулируют активность фермента при инфекции. Строгая регуляция активности протеолитических ферментов является критической для функционирования всех живых систем. В то же время принципы регуляции активности протеаз белковыми ингибиторами остаются малоизученными. Бактериальные пары протеаза–ингибитор, такие как пара PrtS и Phin, являются многообещающей моделью для *in vivo* исследований этих принципов. Бактерии рода *Photorhabdus* имеют сложный жизненный цикл с несколькими хозяевами, являясь симбионтами нематод и мощными патогенами насекомых. Это даёт уникальную возможность использовать пару PrtS и Phin в качестве модели для изучения принципов регуляции активности протеаз белковыми ингибиторами в контексте взаимодействия бактерий с разными типами хозяев.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белковый ингибитор протеаз, *Photorhabdus*, энтомопатогенная бактерия, протеализин, эмфорин, фоторин.

DOI: 10.31857/S0320972523090154, **EDN:** WVEBDF

Принятые сокращения: БИП — белковые ингибиторы протеаз; ГПХ — гельпроникающая хроматография; ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия; КД — круговой дихроизм; МХАХ — металл-хелатная аффинная хроматография; ППП — протеализинподобные протеазы; ЭПИ — эмфориноподобные ингибиторы; Abz-RSVIK(Dnp) — 2-аминобензоил-L-аргинил-L-серил-L-валил-L-изолейлил-L-(ε-2,4-динитрофенил)лизин; M4in — эмфорин; Phin — фоторин; Pln — протеализин, PrtS — протеаза S; Tln — термолизин; TT01 — *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii* TT01.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы, внёсшие равный вклад в работу.

ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты играют принципиальную роль в функционировании всех живых систем. Активность протеаз в живых системах находится под строгим контролем, что обеспечивает высокую избирательность действия этих ферментов и предотвращает аберрантный протеолиз. Одним из факторов, регулирующих активность протеолитических ферментов, являются эндогенные селективные белковые ингибиторы протеаз (БИП). В некоторых важных случаях о функциях БИП имеется достаточно много информации [1–5], однако общие принципы регуляции активности протеаз БИП в живых системах остаются малоизученными.

Перспективной моделью для изучения *in vivo* принципов регуляции белковыми ингибиторами, на наш взгляд, могут стать бактериальные пары протеаза–ингибитор. Основным достоинством такой модели является доступность биологической системы, как в плане её меньшей сложности, так и с точки зрения удобства экспериментальной работы. Кроме того, наличие большого количества ортологичных пар протеаза–ингибитор у бактерий из разных таксонов позволяет рассматривать регуляцию в эволюционном аспекте. Однако о бактериальных БИП по сравнению с эукариотическими известно очень мало. Так, например, база данных пептидаз и их белковых ингибиторов MEROPS (www.ebi.ac.uk/merops/) [6] включает в настоящее время лишь около 18 000 последовательностей бактериальных и более 155 000 последовательностей эукариотических БИП (данные на 22.03.2023). Для большинства бактериальных БИП природные мишени и биологические функции не установлены. В то же время в некоторых случаях вывод о функциональной связи между бактериальными протеазами и их ингибиторами может быть сделан из локализации их генов в одном опероне [7].

Недавно мы обнаружили новое семейство белковых ингибиторов металлопротеаз, семейство I104 в базе данных MEROPS (www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=I104), и охарактеризовали прототип семейства эмфорин (M4in) из *Serratia proteamaculans*. Гены эмфориноподобных ингибиторов (ЭПИ) у бактерий и архей колокализуются с генами гомологов протеализина (Pln) из *S. proteamaculans* [8, 9], протеализинподобных протеаз (ППП), которые относятся к семейству пептидаз M4 (www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M4). У *S. proteamaculans* гены ЭПИ и ППП форми-

руют бицистронный оперон, однако у многих других видов бактерий – это, по-видимому, два независимых, но расположенных друг за другом гена. Для M4in продемонстрировано, что он является сильным ингибитором Pln. Таким образом, природными мишенями ЭПИ, очевидно, являются ППП, и эти белки, вероятно, связаны общей биологической функцией [7].

Биологическая роль ЭПИ и ППП не вполне понятна. Однако есть данные, указывающие на участие ППП в проникновении бактерий в клетки человека [10–14], подавлении иммунной защиты насекомых [15, 16] и рыб [17], а также в разрушении белков клеточной стенки растений [18, 19]. Кроме того, предполагается, что ЭПИ и ППП являются элементами неустоленной системы межбактериальной конкуренции [7, 20]. Таким образом, ППП, вероятно, являются мультифункциональными белками, вовлечёнными во взаимодействие бактерий с высшими организмами и, в частности, в патогенез, а также во взаимодействие бактерий между собой, в то время как ЭПИ регулируют активность ППП во всех упомянутых контекстах. Исходя из этого, пара ЭПИ–ППП могла бы стать моделью для исследований принципов регуляции активности протеаз белковыми ингибиторами. При этом успешность таких исследований, очевидно, будет в значительной степени зависеть от выбора модельного организма.

В качестве модельного организма многообещающе выглядят энтомопатогенные бактерии рода *Photorhabdus*, наиболее изученным представителем которого является *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii* TT01 (TT01) (прежнее название *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01). Эти бактерии имеют сложный жизненный цикл, в котором они выступают то в качестве симбионтов нематод семейства Heterorhabditidae, то как мощные инсектопатогены, что даёт уникальную возможность для исследования различных типов взаимодействий бактерий с хозяином [21]. В контексте нашего обсуждения следует отметить, что *Photorhabdus* инвазируют клетки ректальной железы нематод [22] и манипулируют иммунной системой инфицированных насекомых [21]. Кроме того, бактерии рода *Photorhabdus* проявляют противобактериальную и противогрибковую активность [23, 24]. ППП нескольких штаммов *Photorhabdus* (протеазы S, PrtS) в разной степени охарактеризованы [15, 16, 25, 26].

Опубликованные данные позволяют заключить, что PrtS, по-видимому, не является основным инсектотоксином бактерий, но при этом,

вероятно, участвует во взаимодействии бактерий с иммунной системой насекомых, действуя на антибактериальные пептиды и индуцируя процесс меланизации [15, 16]. Однако эти данные фрагментарны, и биологические функции *PrtS*, как и других ППП, требуют дальнейшего изучения. Многие предполагаемые функции ППП, по-видимому, реализуются у *Photorhabdus*, и данная модель представляется перспективной для изучения этих ферментов. В частности, она может быть использована для изучения регуляции активности ППП с помощью ЭПИ. Однако никаких данных об ЭПИ у бактерий рода *Photorhabdus* в настоящее время нет.

В геномах *Photorhabdus* непосредственно за генами *prtS* расположены гены, кодирующие гипотетические белки, гомологичные M4in. В этой работе один из таких генов (из TT01) был впервые клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Рекомбинантный белок, названный фоторином (Phin), был очищен и охарактеризован. Было показано, что Phin ингибирует ППП и продуцируется клетками TT01. Полученные данные указывают на то, что пара ППП–ЭПИ функциональна у бактерий рода *Photorhabdus*, и эти организмы могут быть использованы в качестве модели для изучения принципов регуляции активности протеаз белковыми ингибиторами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общие методы. Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Брэдфорда, используя IgG в качестве стандарта [27, 28].

Концентрацию очищенных белков в растворе определяли по поглощению при 280 нм, используя коэффициенты экстинкции, рассчитанные с помощью сервера ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>): $\epsilon_{280} = 52\,370\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ — для PIn, $\epsilon_{280} = 58\,200\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ — для термолизина (TIn) и $\epsilon_{280} = 11\,460\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ — для Phin.

Белки анализировали электрофорезом в 15%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия, по Лэммли [29]. Зоны белков окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250 («Reanal», Венгрия). В качестве маркера молекулярных масс использовали набор Precision Plus Protein Unstained Standards («Bio-Rad», США).

Трансформацию клеток *E. coli* плазмидной ДНК проводили, как описано ранее [30]. Для получения плазмид использовали штамм

E. coli TG1. Для очистки ДНК применяли наборы Plasmid Miniprep или Cleanup Standard («Евроген», Россия).

Гельпроникающую хроматографию проводили на колонке Superdex 75 10/300 GL («GE Healthcare», Швеция). Для калибровки колонки использовали набор Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 6500–66 000 Da («Sigma», США).

Секвенирование полученных генетических конструкций, а также синтез всех использованных олигонуклеотидов проводили в компании «Евроген».

Клонирование гена фоторина и конструирование экспрессионного вектора. Штамм *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 (TT01) был получен из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (штамм DSM 15139, номер доступа в RefSeq NC_005126.1). TT01 культивировали в течение ночи с аэрацией при 30 °C в среде LB по Ленноксу [31]. Клетки из 1 мл бактериальной суспензии осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин), ресуспендировали в 100 мкл деионизированной воды, прогревали при 95 °C в течение 10 мин и центрифугировали (13 000 g, 10 мин). Супернатант (1 мкл) использовали для ПЦР с Pfu ДНК-полимеразой («СибЭнзайм», Россия) и парами олигонуклеотидных праймеров *EcoRI*_D1 и TT01_R1 или TT01_D2 и *HindIII*_R2 (табл. 1). Продукты ПЦР после очистки использовали вместе с праймерами *EcoRI*_D1 и *HindIII*_R2 для ПЦР с достройкой перекрывания. Полученный фрагмент генома TT01, содержащий гены *prtS* (PLU_RS06905) и *phin* (PLU_RS06900), а также фланкирующие участки, очищали, обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* («New England Biolabs», США) и использовали для клонирования. В качестве клонирующего вектора использовали фрагмент плазмиды pBR322, который амплифицировали с использованием праймеров *HindIII*_R3 и *EcoRI*_D3 (табл. 1), очищали, расщепляли теми же ферментами и лигировали с использованием Quick-TA T4 ДНК-лигазы («Евроген») с указанным выше фрагментом генома TT01. Полученная плазида была названа pTT01.

Для конструирования экспрессионной плазмиды pET-Phin ген *phin* амплифицировали, используя в качестве матрицы pTT01 и праймеры *FauNDI*_D4 и *XhoI*_R4 (табл. 1). Для клонирования в праймерах были предусмотрены сайты *FauNDI* и *XhoI*. Кроме того, в праймере *XhoI*_R4 был предусмотрен участок, обеспечивающий введение в ген *phin* дополнительной последовательности, кодирующей 6 остатков гистидина перед стоп-кодоном

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Обозначение праймера	Последовательность
EcoRI_D1	TCAAGAATTCGCAAAAACTGGATATGATTTTCCATC
TT01_R1	TCATTGAACGAATCCCTAC
TT01_D2	GTAGGGATTTCGTTCAATGA
HindIII_R2	CTCGAAGCTTTAATCCGCCAATTGTTGTGATCCACG
HindIII_R3	ACTCAAGCTTCCGGATCTGCATCGCAGGATG
EcoRI_D3	ATGAGAATTCCTTGAAGACGAAAGGGGGCCTCGT
FauNDI_D4	GGAACATATGAATAATAAACGCTCAA
XhoI_R4	GAATCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGACCACCCTTTTGTCTGGT

Примечание. Сайты *EcoRI*, *HindIII*, *FauNDI* и *XhoI* подчеркнуты. Участок, обеспечивающий введение в ген *phin* дополнительной последовательности, кодирующей 6 остатков гистидина перед стоп-кодоном, выделен жирным шрифтом.

(выделена жирным шрифтом в последовательности праймера в табл. 1). Продукты ПЦР очищали, обрабатывали рестриктазами *FauNDI* («СибЭнзайм») и *XhoI* («New England Biolabs») и лигировали с вектором pET-23a, расщепленным теми же ферментами.

Структура всех клонированных фрагментов была подтверждена секвенированием.

Получение фоторина. Клетки *E. coli* BL21 (DE3) («Novagen», США), трансформированные плазмидой pET-*Phin*, культивировали при перемешивании в 250 мл среды, содержащей (в расчёте на литр) 7,1 г Na_2HPO_4 , 6,8 г KH_2PO_4 , 3,3 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,3 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 г глицерина, 10 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 25 г глюкозы, 50 г лактозы и 100 мг ампициллина, при 37 °C в течение 3 ч, а затем при 16 °C – в течение 72 ч. Клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 4 °C, 10 мин), ресуспендировали в 25 мл 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) и обрабатывали ультразвуком при 4 °C два раза в течение 5 мин с импульсом 1 с и паузой 2 с. Лизат клеток центрифугировали (9000 g, 4 °C, 10 мин), и супернатант наносили на колонку с 1 мл Nickel XPure Agarose Resin («UBPBio», США), уравновешенную 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Колонку промывали тем же буфером, а затем элюировали *Phin* линейным градиентом концентрации имидазола (0–250 mM) в том же буфере. Фракции, содержащие *Phin* по результатам электрофоретического анализа, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией на Vivaspin Turbo 15,5 kDa MWCO («Sartorius», Германия). Полученный образец наносили на колонку Superdex 75 10/300 GL, уравновешенную 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), содержащим

150 mM NaCl, и элюировали тем же буфером со скоростью потока 0,5 мл/мин. Фракции, содержащие наибольшее количество *Phin* по результатам электрофоретического анализа, объединяли и дважды диализовали (6 и 16 ч) против 100 объёмов 50 mM NH_4HCO_3 с использованием диализной трубки SnakeSkin, 3.5 kDa MWCO («Thermo Fisher Scientific», США) при 4 °C. После диализа раствор *Phin* центрифугировали (8600 g, 4 °C, 15 мин) и лиофилизировали супернатант.

Масс-спектрометрический анализ. Лиофилизированный очищенный *Phin* растворяли в концентрации 5 мкМ в смеси вода/метанол/муравьиная кислота = 50/49,5/0,5 (v/v). Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Exactive Orbitrap («Thermo Fisher Scientific»), оснащённом специальным источником ионов [32]. Расчёт молекулярной массы белка проводили по набору пиков, соответствующих многократно протонированным молекулам белка в полученных электроспрейных масс-спектрах.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Измерения проводили при концентрации *Phin* 4,2 мг/мл на приборе MicroCal VP-Capillary DSC («Malvern Instruments», США). Эксперименты по ДСК и обработку данных осуществляли, как описано ранее [7].

Спектроскопия кругового дихроизма (КД). Спектры КД регистрировали на спектрофотометре Chirascan VX («Applied Photophysics», Великобритания) при комнатной температуре в кювете с длиной оптического пути 0,05 см. Для получения спектров *Phin* растворяли в концентрации 0,15 мг/мл в 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

и центрифугировали при 8600 *g* в течение 5 мин при 4 °С. Спектры анализировали с помощью программы DichroWeb с использованием метода CDSSTR и эталонного набора данных 4 [33]. Значения стандартного отклонения для каждого типа структуры рассчитывались только для предсказаний DichroWeb с общей суммой долей вторичных структур – 100%. Для предсказания спектров КД и расчёта долей вторичных структур по пространственным структурам использовали сервер PDBMD2CD [34].

Иммуноблоттинг. Электрофоретически гомогенный Phin был передан в НПО «БиоТест Системы» (Россия) для иммунизации кроликов по стандартному протоколу. Полученную антисыворотку использовали для проведения иммуноблоттинга по описанной ранее методике [35]. Для подтверждения специфичности полученных антител использовали очищенный Phin.

Для проведения анализа TT01 культивировали в течение 48 ч с аэрацией при 30 °С в среде LB по Ленноксу [31]. Через 16, 24, 30 и 48 ч после начала культивирования отбирали по 100 мкл бактериальной суспензии. Клетки осаждали центрифугированием (6000 *g*, 10 мин) и суспендировали в 100 мкл буфера, содержащего 125 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 2% Ds-Na, 5% β-меркаптоэтанол, 2 мМ 1,10-фенантролина, 0,01% бромфенолового синего и 20% глицерина. К супернатанту (культуральной среде) добавляли 100 мкл 50%-ной ТХУ, центрифугировали (10 000 *g*, 10 мин), осадок промывали ацетоном для удаления ТХУ и добавляли 100 мкл того же буфера. Образцы клеток и культуральной среды инкубировали 5 мин при 95 °С. После инкубации, основываясь на различиях в оптической плотности исходной бактериальной суспензии, образцы разбавляли тем же буфером так, чтобы 15 мкл полученного раствора (количество, которое использовали для электрофоретического анализа) содержали материал, соответствующий 100 мкл бактериальной суспензии с оптической плотностью 1 о.е. Белки разделяли с помощью электрофореза с додецилсульфатом натрия в 16%-ном полиакриламидном геле в буферной системе Tris-Tricine [36].

Определение констант ингибирования протеазина и термолизина фоторином. Анализ ингибирующего действия Phin на Pln и Tln проводили с использованием пептидного субстрата с внутренним тушением флуоресценции, 2-аминобензоил-L-аргинил-L-серил-L-валил-L-изолейцил-L-(ε-2,4-динитрофенил)лизин (Abz-RSVIK(Dnp)) («Peptide 2.0», США) [37], как описано ранее [38]. Для реги-

страции флуоресценции (длина волны возбуждения – 320 нм; длина волны испускания – 420 нм) использовали прибор CLARIOstar Plus («BMG», Германия). Реакцию проводили в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4). Концентрации Pln и Tln в реакционной смеси составляли 50 пМ, Abz-RSVIK(Dnp) – 30 или 90 мкМ. Концентрации Phin в случае Pln были 0,5; 1; 2; 4; 6 и 8 мкМ, а в случае Tln – 1; 5; 10; 20; 30 и 40 мкМ. При каждом экспериментальном условии проводили три независимых измерения.

При медленном связывании ингибитора с ферментом кинетические кривые аппроксимировали интегральным уравнением скорости и рассчитывали константы ингибирования, как описано ранее [39]. Константы ингибирования K_i как для Pln, так и для Tln были получены по методу Диксона [40, 41]. Константу изомеризации K_i^* для Pln рассчитывали в два этапа с использованием уравнений (1) и (2):

$$k_a = k_{-4} + \frac{k_{+4}[I]}{K_i(1 + [S]/K_M) + [I]}, \quad (1)$$

$$K_i^* = K_i \frac{k_{-4}}{(k_{+4} - k_{-4})}. \quad (2)$$

Для Pln в расчётах использовали константу Михаэлиса $K_M = 35$ мкМ [37]. Анализ данных проводили при помощи программы GraphPad Prism версии 8.0 («GraphPad Software», США).

Ингибирование активности культуральной среды *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 фоторином. TT01 культивировали в течение 24 ч с аэрацией при 30 °С в среде LB по Ленноксу [31]. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 *g* в течение 10 мин. Супернатант разводили в 1000 раз, используя 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), и 10 мкл полученного раствора использовали для измерения активности, как описано выше для Pln и Tln. Концентрация Abz-RSVIK(Dnp) в реакционной смеси составляла 30 мкМ, концентрации Phin – 1; 2,5; 5; 7,5 и 10 нМ. Скорость гидролиза субстрата в присутствии ингибитора определяли на линейном участке кинетических кривых, соответствующем диапазону 150–300 с после начала регистрации флуоресценции. IC_{50} рассчитывали с использованием нелинейной регрессии при помощи GraphPad Prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение фоторина. Ген предполагаемого эмфориноподобного ингибитора был клонирован из генома *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01, модифицирован для введения

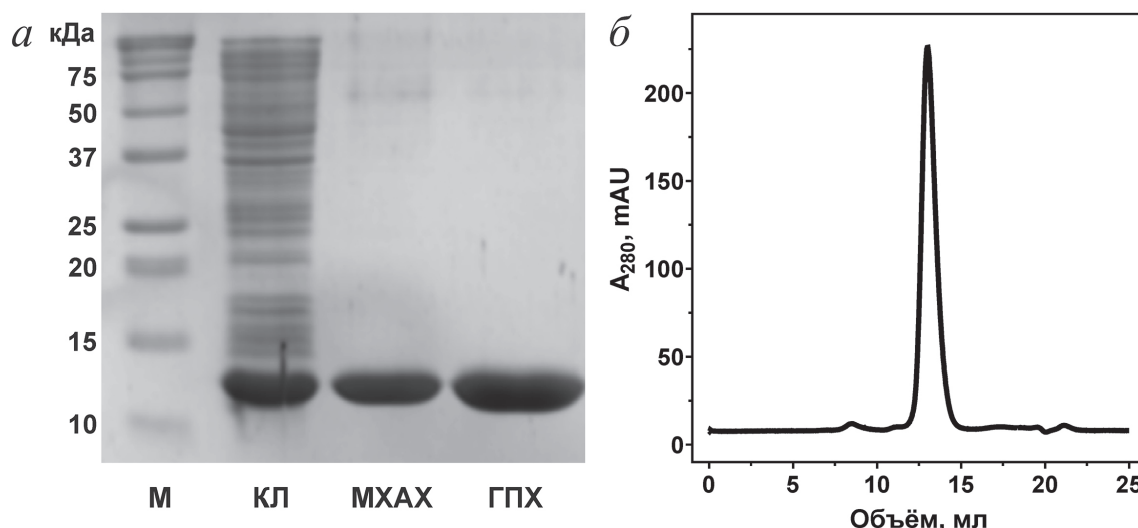


Рис. 1. Очистка рекомбинантного фоторина (Phin) и анализ очищенного белка. *a* – Электрофоретический анализ препарата Phin на разных стадиях очистки; *б* – анализ очищенного Phin с помощью гелипроникающей хроматографии на колонке Superdex 75 10/300 GL. М – Стандарты молекулярных масс; КЛ – супернатант клеточного лизата; МХАХ и ГПХ – образцы после металл-хелатной аффинной хроматографии и гелипроникающей хроматографии соответственно

Таблица 2. Ход очистки рекомбинантного фоторина (Phin)

Стадия очистки ^а	Общий белок (мг)	Содержание Phin (%) ^б	Выход (%)	Степень очистки
Клеточный лизат	138	38	100	1,0
МХАХ	48	86	80	2,3
ГПХ	10	98	20	2,6

Примечание. ^а МХАХ – металл-хелатная аффинная хроматография; ГПХ – гелипроникающая хроматография.

^б Содержание Phin оценивали с помощью денситометрии электрофоретических гелей, окрашенных Кумасси бриллиантовым синим R-250.

His₆-последовательности на С-конце белка и экспрессирован в клетках *E. coli*. Рекомбинантный белок, названный фоторином (Phin), был очищен до электрофоретической гомогенности с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии (МХАХ) и гелипроникающей хроматографии (ГПХ); ход очистки представлен на рис. 1, *a* и в табл. 2.

Определённая экспериментально методом масс-спектрометрии средняя молекулярная масса очищенного Phin (12 517,1 Да) хорошо соответствует теоретической молекулярной массе белка (12 517,81 Да), рассчитанной по выведенной из гена аминокислотной последовательности, которая включает N-концевой метионин и С-концевую His₆-последовательность.

По результатам ГПХ молекулярная масса очищенного Phin составила около 15,4 кДа (рис. 1, *б*). Это значение несколько выше расчётного, вероятно, из-за структурных особенностей белка. В то же время этот результат позволяет сделать вывод о том, что основной формой Phin в растворе является мономер.

Фоторин обнаруживается в клетках и культуральной жидкости *P. laumondii*. С использованием полученных нами кроличьих поликлональных антител к Phin методом иммуноблоттинга было продемонстрировано, что Phin накапливается в клетках и культуральной жидкости ТТ01 при периодическом культивировании (рис. 2). Количество детектируемого белка меняется в ходе культивирования. Максимальное количество Phin регистрируется через 24–30 ч после инокуляции, что соответствует началу стационарной фазы роста бактерий.

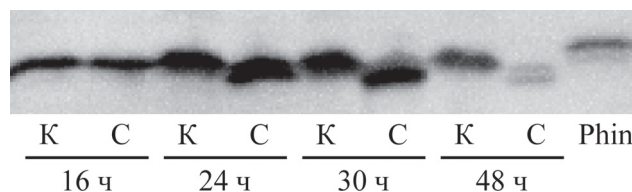


Рис. 2. Анализ накопления фоторина в клетках и культуральной среде *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 методом иммуноблоттинга. К – клетки ТТ01; С – культуральная среда; Phin – рекомбинантный Phin (0,5 нг)

В поздней стационарной фазе (48 ч) количество Phin заметно снижается, что, возможно, связано с регуляцией активности гена *phin* с участием системы Quorum Sensing.

Неожиданным оказалось то, что ингибитор детектируется в клетках и культуральной среде *P. laumondii* в примерно равных количествах. Ранее для M4in была продемонстрирована локализация внутри клеток, что коррелирует с отсутствием известных сигналов сортировки в последовательностях ЭПИ (в том числе в последовательности Phin) [7]. Возможно, выход Phin из клеток является неспецифическим и обусловлен особенностями TT01. Кроме того, иммуноблоттинг показывает, что после завершения логарифмической фазы роста (24, 36 и 48 ч) вне клеток детектируется белок с молекулярной массой ниже, чем у внутриклеточного, а также значительно большее снижение количества внеклеточного Phin, чем внутриклеточного, в поздней стационарной фазе (48 ч). Это может свидетельствовать о нестабильности Phin во внеклеточной среде, но в то же время может отражать работу неизвестных регуляторных систем. Так или иначе полученные данные указывают на то, что вопрос о клеточной локализации ЭПИ остаётся открытым. Это, однако, не влияет на основной вывод из описываемого эксперимента: ген *phin* экспрессируется в клетках природного продуцента ингибитора *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01.

Вторичная структура фоторина. Вторичную структуру Phin оценивали с помощью КД-спектроскопии. Анализ спектра (рис. 3) показал, что относительный вклад α -спиралей, β -листов, поворотов и областей, не формирующих регулярных вторичных структур, составляет 14 ± 5 , 34 ± 2 , 23 ± 3 и 30 ± 2 % соответственно. Аналогичные значения, рассчитанные по пространственной структуре M4in [42, 43], прототипа семейства ингибиторов I104, к которому относится Phin, составляют 32 ± 3 , 23 ± 9 , 19 ± 5 и 27 ± 3 %.

Таким образом, вторичные структуры Phin и M4in заметно различаются, что неудивительно, учитывая существенные различия в последовательностях белков (25% идентичности и 47% сходства). В то же время, несмотря на примерно двукратную разницу в количестве α -спиралей, обе молекулы характеризуются высокой долей α - и β -структур. Это свидетельствует о том, что оба белка относятся к одному структурному классу $\alpha + \beta$ и могут иметь общий тип укладки.

Термостабильность фоторина. Тепловая денатурация Phin была изучена методом ДСК (рис. 4).

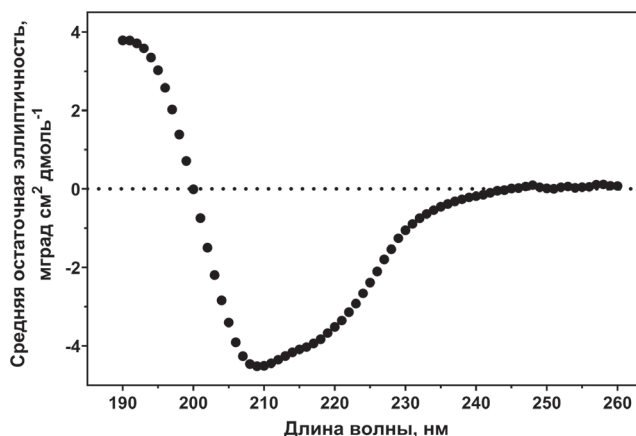


Рис. 3. КД-спектр фоторина

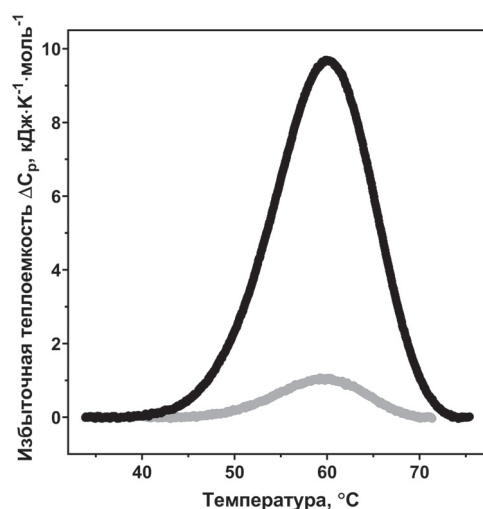


Рис. 4. Термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии фоторина. Чёрная и серая кривые – первый и второй нагрев образца соответственно

Phin демонстрировал одиночный тепловой переход с максимумом ($T_{\max}$) при $60,2$ °C. Суммарная калориметрическая энтальпия (ΔH_{cal}) Phin составляла $130,7$ кДж/моль. Тепловая денатурация Phin была почти полностью необратима, так как при втором нагреве образца наблюдалась $\Delta H_{\text{cal}} = 12,2$ кДж/моль, что соответствует всего ~9% начальной калориметрической энтальпии. При третьем и четвёртом нагревании энтальпия падала до 6% и 5% от исходного значения, что соответствует стандартному падению энтальпии обратимой тепловой денатурации при каждом последующем нагреве.

Термостабильность Phin близка к термостабильности M4in, прототипа семейства I104, для которого $T_{\max} = 61,2$ °C. Однако, в отличие от Phin, денатурация M4in полностью необратима, демонстрирует 3 тепловых перехода и характеризуется $\Delta H_{\text{cal}} = 62,8$ кДж/моль [7].

Энтальпия денатурации определяется общим числом нековалентных взаимодействий,

стабилизирующих белковую глобулу [44]. Увеличение энтальпии в случае Phin можно объяснить меньшей, по сравнению с M4in, долей областей с нерегулярной вторичной структурой и наличием более плотно упакованных областей, где могут реализовываться более сильные стабилизирующие взаимодействия. При этом $T_{\max}$ определяется не только количеством связей, но и их силой, локализацией и другими факторами. Таким образом, результаты ДСК, а также результаты спектроскопии КД указывают на заметные структурные различия Phin и M4in, которые, однако, не приводят к существенной разнице в их термостабильности.

Фоторин ингибирует протеализин и термолизин по различным механизмам. Ингибирующее действие Phin было изучено по отношению к Pln и Tln. Кинетические кривые, полученные при действии Phin на Pln, имели форму, характерную для медленно связывающихся ингибиторов, и соответствовали интегральному уравнению скорости [39] для этого типа ингибирования (во всех случаях R^2 выше 0,98). Значения начальной скорости реакции (v_0) и кажущейся константы скорости первого порядка (k_a), полученные нелинейной регрессией, использовали для построения диагностических диаграмм (рис. 5, Pln + Phin). Гиперболический характер зависимостей v_0 и k_a от концентрации Phin указывает на двухстадийный механизм (уравнение (3)), при котором быстрообразующийся исходный комплекс фермент–ингибитор (EI) подвергается медленно конформационному переходу в изомеризованный комплекс EI*:



Таблица 3. Константы ингибирования протеализина (Pln) и термолизина (Tln) фоторином (Phin)^a

Константы для Phin	Pln	Tln
K_i (мкМ)	$1,0 \pm 0,3$	$10,2 \pm 1,9$
k_{-4} ($10^{-4} \cdot c^{-1}$)	$3,5 \pm 0,6$	н/п
k_{+4} ($10^{-3} \cdot c^{-1}$)	$2,0 \pm 0,4$	н/п
K_i^* (нМ)	153 ± 46	н/п

Примечание. ^a Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка; н/п – неприменимо.

Исходя из этого, равновесная константа ингибирования ($K_i = k_{-3}/k_{+3}$) была определена методом Диксона на основе набора значений v_0 . Для расчёта констант скоростей k_{-4} и k_{+4} зависимость k_a от концентрации Phin аппроксимировали уравнением (1) (рис. 5, Pln + Phin). Равновесную константу изомеризации (K_i^*) рассчитывали по уравнению (2). Полученные значения констант представлены в табл. 3.

В принципе, конформационные изменения при взаимодействии ингибитора с ферментом могут происходить как до первоначального столкновения их молекул (конформационный отбор, conformational selection), так и после (индуцированная подстройка, induced-fit) [45, 46]. Двухстадийный механизм, описываемый уравнением (3) и характерный для взаимодействия Phin и Pln, представляет собой простейший случай, когда связывание ингибитора проходит быстро по сравнению с дальнейшими конформационными изменениями. Этот механизм реализуется при наличии большого избытка ингибитора по отношению к ферменту

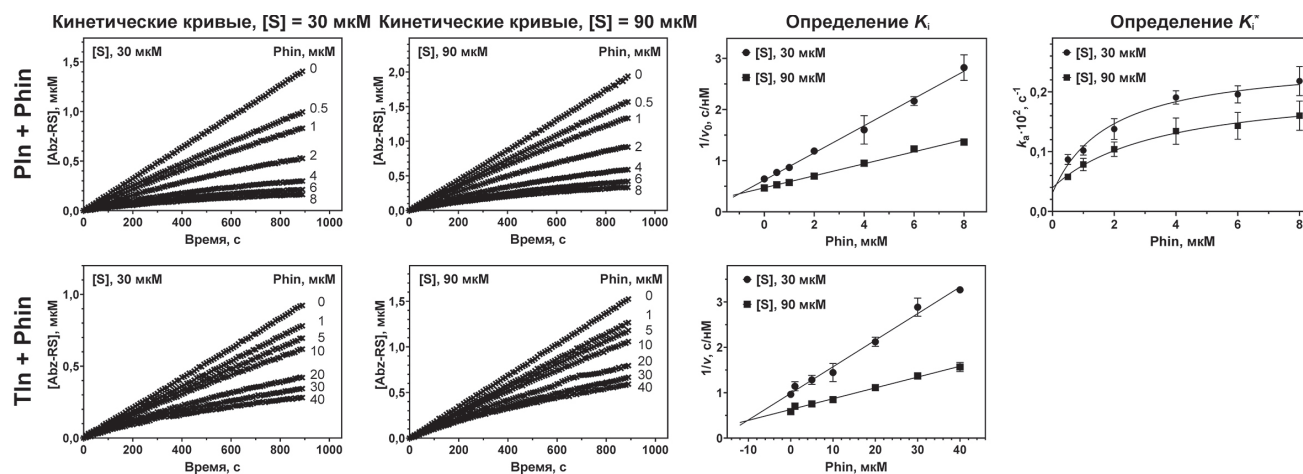


Рис. 5. Кинетические кривые гидролиза субстрата Abz-RSVIK(Dnp) протеализином (Pln) и термолизин (Tln) в присутствии фоторина (Phin), и определение констант ингибирования. Кинетические кривые были получены для различных концентраций ингибитора и двух концентраций субстрата (30 и 90 мкМ). Abz-RS является продуктом гидролиза субстрата. Зависимость значений $1/v_0$ и k_a для Pln и зависимость величины $1/v$ для Tln от концентрации Phin использовали для расчёта констант ингибирования. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка

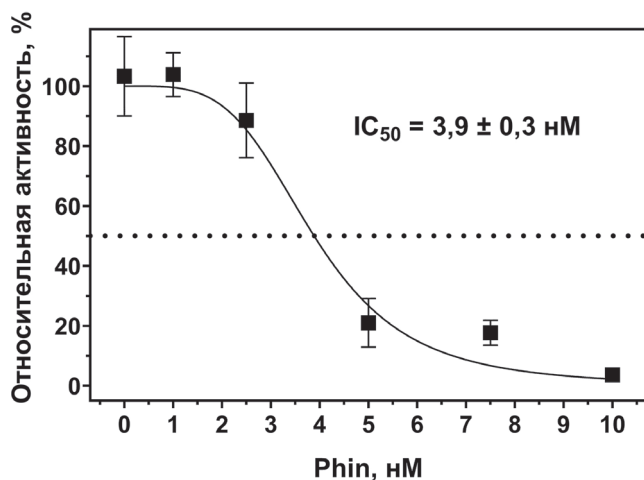


Рис. 6. Ингибирование фоторином (Phin) активности культуральной среды *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01. IC₅₀ — концентрация полуингибирования

(в наших экспериментах концентрация Phin была как минимум на 4 порядка выше концентрации Pln). Таким образом, этот механизм можно рассматривать как индуцированную подстройку — конформационную адаптацию фермента к ингибитору или наоборот [47].

Таким образом, Phin, подобно M4in, является медленно связывающимся конкурентным ингибитором Pln, но ингибирует этот фермент значительно слабее. Мы обнаружили также, что Phin взаимодействует с Pln по двухстадийному механизму, в отличие от M4in, который действует по одностадийному механизму с медленным формированием комплекса фермент–ингибитор [7]. Однако различия в механизмах, вероятно, обусловлены в первую очередь различиями в условиях эксперимента, которые диктуются драматическими различиями в эффективности связывания.

Кинетические кривые при действии Phin на Tln выглядят слегка изогнутыми (рис. 5, Tln + Phin). В то же время они плохо аппроксимируются интегральным уравнением скорости для медленно связывающихся ингибиторов [39], но хорошо описываются линейной регрессионной моделью ($R^2 > 0,98$). Поэтому в данном случае K_i рассчитывали по методу Диксона, как для классического ингибирования (табл. 3).

Таким образом, Phin является классическим ингибитором Tln, что, вероятно, определяется структурными различиями в области активного центра Tln и Pln [48] — двух ферментов, относящихся к одному структурному семейству пептидаз, а не структурными различиями ингибиторов. К сожалению, данных о механизме ингибирования Tln эмфорином в настоящее время нет.

Способность культуральной среды *P. laumondii* гидролизовать Abz-RSVIK(Dnp) ингибируется фоторином. Культуральная среда *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 через 24 ч роста проявляет существенную активность в отношении субстрата Abz-RSVIK(Dnp) (~4000 мкмоль/(мин мл)). Эта активность эффективно подавляется Phin, концентрация полуингибирования IC₅₀ составляет $3,9 \pm 0,3$ нМ (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе мы впервые получили данные, позволяющие предположить, что у протеазы S из *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 (TT01) есть специфический ингибитор — фоторин. Phin является вторым охарактеризованным ингибитором из семейства I104 (по классификации базы данных MEROPS). Сравнение Phin с другим известным представителем этого семейства, его прототипом эмфорином (M4in), показывает, что эти два белка заметно различаются. По последовательности они имеют лишь четверть идентичных и около половины сходных аминокислотных остатков, что обуславливает зарегистрированные нами с помощью КД-спектроскопии различия во вторичной структуре. Структурные различия влекут за собой различия в характере плавления белков и, что более важно, различия в их ингибирующей способности.

Ингибирующее действие Phin было изучено по отношению к Pln и Tln, металлопротеазам из различных эволюционных групп семейства M4 (по классификации MEROPS). Оказалось, что ингибирование Pln фоторином происходит по-иному, чем в случае M4in, механизму, а константы ингибирования на 3 (K_i^*) и 4 (K_i) порядка выше (K_i для M4in составляет 52 пМ [7]). Такой результат не кажется неожиданным, так как Pln является природной мишенью M4in, а Phin должен быть оптимизирован для взаимодействия с PrtS. В пользу такой оптимизации свидетельствует эффективное подавление Phin гидролиза пептидного субстрата для протеализинподобных протеаз [37] культуральной жидкостью TT01, одной из основных протеаз в которой является PrtS [49]. Концентрация полуингибирования (IC₅₀) при этом находится в наномолярном диапазоне, то есть примерно в 40 раз ниже K_i^* , наблюдаемой в случае действия Phin на Pln. Активность Tln, в отличие от Pln и PrtS, не являющегося ППП [50], Phin подавляет ещё на порядок хуже, чем активность Pln (табл. 3).

Таким образом, сопоставление имеющихся данных об ингибирующей способности Phin и M4in указывает на эволюционную адаптацию ингибиторов семейства M104 к являющимся их природными мишенями ППП из тех же организмов.

Возвращаясь к ассоциации Phin и PrtS, следует обратить внимание на то, что организация их генов у *P. laumondii* отличается от того, как организованы соответствующие гены ингибитора и протеазы у *S. proteamaculans*. У этой бактерии гены *pln* и *m4in*, как упоминалось выше, формируют бицистронный оперон, причём стоп-кодон гена протеазы перекрывается со стартовым кодоном гена ингибитора, что указывает на трансляционное сопряжение [7]. В случае генов *prtS* и *phin* анализ последовательности генома TT01 показывает, что в межгенном промежутке протяжённостью 160 п.н. перед геном ингибитора расположен промотор. Таким образом, в случае *P. laumondii* протеаза и ингибитор кодируются следующими друг за другом, но автономными генами, что указывает на дифференциальную регуляцию транскрипции этих генов.

Различия в регуляции экспрессии пар генов протеаза–ингибитор, вероятно, отражают различия в функциях, которые кодируемые этими генами белки выполняют у разных бактерий. Независимый контроль на уровне транскрипции даёт возможность гибко менять соотношение ЭПИ/ППП в клетке, в то время как интеграция генов в одном опероне с трансляционным сопряжением, напротив, жёстко фиксирует этот параметр. Принимая во внимание вероятную мультифункциональность ППП, можно предположить, что независимая регуляция является необходимым условием для реализации одних функций этих протеаз, но избыточна для выполнения других. Так, снижение соотношения ЭПИ/ППП, что требует независимой регуляции, может быть триггером, например, для начала атаки на иммунную систему хозяина. А в том случае, когда ингибитор играет роль антитоксина в системе межбактериальной конкуренции, достаточно, чтобы его концентрация в клетке была пропорциональна концентрации протеазы. Впрочем, независимая регуляция позволяет реализовать оба варианта и в целом, несомненно, имеет больший потенциал. В этом контексте независимая регуляция генов, вероятно, возникает при увеличении числа функций пары ЭПИ–ППП.

Наличие Phin в культуральной среде, в отличие от M4in, наблюдаемого только внутри клеток, также указывает на вероятные различия в функциях этих ингибиторов. Действие Phin, находящегося вне клеток, может быть направлено на регуляцию активности PrtS в среде. В то же время мишенью Phin могут быть и другие ферменты. Это могут быть, например, термолизинподобные протеазы, продуцируемые микроорганизмами-конкурентами, или протеазы организма-хозяина. Таким образом, нельзя исключить, что Phin имеет биологические функции, не связанные с работой PrtS.

Заканчивая обсуждение, следует подчеркнуть, что пара Phin и PrtS у бактерий рода *Photorhabdus* представляется многообещающей моделью для исследований фундаментальных принципов регуляции протеолиза. Однако таким исследованиям должно предшествовать выяснение функции этих белков у *Photorhabdus* и детальная характеристика взаимодействия Phin и PrtS.

Вклад авторов. И.В. Демидюк – концепция и руководство работой; И.М. Бердышев, А.О. Светлова, К.Н. Чухонцева, М.А. Карасева, А.М. Варижук, В.В. Филатов, С.Ю. Клеймёнов – проведение экспериментов; И.М. Бердышев, А.О. Светлова, С.В. Костров, И.В. Демидюк – обсуждение результатов исследования; И.М. Бердышев, А.О. Светлова, И.В. Демидюк – написание текста; И.М. Бердышев, А.О. Светлова, К.Н. Чухонцева, М.А. Карасева, А.М. Варижук, В.В. Филатов, С.Ю. Клеймёнов, С.В. Костров, И.В. Демидюк – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00135).

Благодарности. В работе использовали оборудование Центра клеточных и генных технологий Института молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт». Авторы благодарят Д.И. Левицкого (Институт биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь в проведении экспериментов по дифференциальной сканирующей калориметрии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuna, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N., and Martinez-Fierro, M. L. (2020) The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9739, doi: 10.3390/ijms21249739.
2. D'Acunto, E., Fra, A., Visentin, C., Manno, M., Ricagno, S., Gallicciotti, G., and Miranda, E. (2021) Neuroserpin: structure, function, physiology and pathology, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 6409-6430, doi: 10.1007/s00018-021-03907-6.
3. Kelly-Robinson, G. A., Reihill, J. A., Lundy, F. T., McGarvey, L. P., Lockhart, J. C., Litherland, G. J., Thornbury, K. D., and Martin, S. L. (2021) The serpin superfamily and their role in the regulation and dysfunction of serine protease activity in COPD and other chronic lung diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6351, doi: 10.3390/ijms22126351.
4. Sillen, M., and Declerck, P. J. (2021) A narrative review on plasminogen activator inhibitor-1 and its (patho)physiological role: to target or not to target? *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 2721, doi: 10.3390/ijms22052721.
5. Wilkinson, D. J. (2021) Serpins in cartilage and osteoarthritis: what do we know? *Biochem. Soc. Trans.*, **49**, 1013-1026, doi: 10.1042/BST20201231.
6. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R. D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D624-D632, doi: 10.1093/nar/gkx1134.
7. Chukhontseva, K. N., Berdyshev, I. M., Safina, D. R., Karaseva, M. A., Bozin, T. N., Salnikov, V. V., Konarev, P. V., Volkov, V. V., Grishin, A. V., Kozlovskiy, V. I., Kostrov, S. V., and Demidyuk, I. V. (2021) The protealysin operon encodes emfourin, a prototype of a novel family of protein metalloprotease inhibitors, *Int. J. Biol. Macromol.*, **169**, 583-596, doi: 10.1016/j.jbiomac.2020.12.170.
8. Demidyuk, I. V., Gromova, T. Y., and Kostrov, S. V. (2013) *Protealysin*. in *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Rawlings, N. D., and Salvesen, G., eds.), 3 Ed., Academic Press, Oxford, pp. 507-602.
9. Demidyuk, I. V., Kalashnikov, A. E., Gromova, T. Y., Gasanov, E. V., Safina, D. R., Zabolotskaya, M. V., Rudenskaya, G. N., and Kostrov, S. V. (2006) Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor, *Protein Express. Purif.*, **47**, 551-561, doi: 10.1016/j.pep.2005.12.005.
10. Bozhokina, E. S., Tsaplina, O. A., Efremova, T. N., Kever, L. V., Demidyuk, I. V., Kostrov, S. V., Adam, T., Komissarchik, Y. Y., and Khaitlina, S. Y. (2011) Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimelysin and protealysin, *Cell Biol. Int.*, **35**, 111-118, doi: 10.1042/CBI20100314.
11. Tsaplina, O. A., Demidyuk, I., Artamonova, T., Khodorkovsky, M., and Khaitlina, S. (2020) Cleavage of the outer membrane protein OmpX by protealysin regulates *Serratia proteamaculans* invasion, *FEBS Lett.*, **594**, 3095-3107, doi: 10.1002/1873-3468.13897.
12. Tsaplina, O. A., Efremova, T., Demidyuk, I., and Khaitlina, S. (2012) Filamentous actin is a substrate for protealysin, a metalloprotease of invasive *Serratia proteamaculans*, *FEBS J.*, **279**, 264-274, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08420.x.
13. Цапина О. А., Ефремова Т. Н., Кевер Л. В., Комиссарчик Я. Ю., Демидюк И. В., Костров С. В., Хайтлина С. Ю. (2009) Выявление актиназной активности протеализина, *Биохимия*, **74**, 797-804.
14. Khaitlina, S., Bozhokina, E., Tsaplina, O., and Efremova, T. (2020) Bacterial actin-specific endoproteases grimelysin and protealysin as virulence factors contributing to the invasive activities of *Serratia*, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4025, doi: 10.3390/ijms21114025.
15. Cabral, C. M., Cherqui, A., Pereira, A., and Simoes, N. (2004) Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photobacterium* sp. Strain Az29, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3831-3838, doi: 10.1128/aem.70.7.3831-3838.2004.
16. Held, K. G., LaRock, C. N., D'Argenio, D. A., Berg, C. A., and Collins, C. M. (2007) A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photobacterium luminescens* induces melanization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 7622-7628, doi: 10.1128/aem.01000-07.
17. Eshwar, A. K., Wolfrum, N., Stephan, R., Fanning, S., and Lehner, A. (2018) Interaction of matrix metalloproteinase-9 and Zpx in *Cronobacter turicensis* LMG 23827(T) mediated infections in the zebrafish model, *Cell. Microbiol.*, **20**, e12888, doi: 10.1111/cmi.12888.
18. Feng, T., Nyffenegger, C., Hojrup, P., Vidal-Melgosa, S., Yan, K. P., Fangel, J. U., Meyer, A. S., Kirpekar, F., Willats, W. G., and Mikkelsen, J. D. (2014) Characterization of an extensin-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* Prt1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 10077-10089, doi: 10.1007/s00253-014-5877-2.
19. Kyöstiö, S. R., Cramer, C. L., and Lacy, G. H. (1991) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* extracellular protease: characterization and nucleotide sequence of the gene, *J. Bacteriol.*, **173**, 6537-6546, doi: 10.1128/jb.173.20.6537-6546.1991.

20. Tsaplina, O., Khaitlina, S., Chukhontseva, K., Karaseva, M., Demidyuk, I., Bakhlanova, I., Baitin, D., Artamonova, T., Vedyaykin, A., Khodorkovskii, M., and Vishnyakov, I. (2022) Protealysin targets the bacterial housekeeping proteins FtsZ and RecA, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10787, doi: 10.3390/ijms231810787.
21. Clarke, D. J. (2008) *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism, *Cell. Microbiol.*, **10**, 2159-2167, doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x.
22. Ciche, T. A., Kim, K. S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K. C., and Hall, D. H. (2008) Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by heterorhabditis bacteriophora nematodes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2275-2287, doi: 10.1128/AEM.02646-07.
23. Cimen, H., Touray, M., Gulsen, S. H., Erincik, O., Wenski, S. L., Bode, H. B., Shapiro-Ilan, D., and Hazir, S. (2021) Antifungal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species against various fungal phytopathogens and identification of the antifungal compounds from *X. szentirmaii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**, 5517-5528, doi: 10.1007/s00253-021-11435-3.
24. Muangpat, P., Suwannaroj, M., Yimthin, T., Fukruksa, C., Sitthisak, S., Chantratita, N., Vitta, A., and Thanwisai, A. (2020) Antibacterial activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolated from entomopathogenic nematodes against antibiotic-resistant bacteria, *PLoS One*, **15**, e0234129, doi: 10.1371/journal.pone.0234129.
25. Bowen, D., Blackburn, M., Rocheleau, T., Grutzmacher, C., and French-Constant, R. H. (2000) Secreted proteases from *Photorhabdus luminescens*: separation of the extracellular proteases from the insecticidal Tc toxin complexes, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 69-74, doi: 10.1016/S0965-1748(99)00098-3.
26. Marokházi, J., Kóczán, G., Hudecz, F., Gráf, L., Fodor, A., and Venekei, I. (2004) Enzymic characterization with progress curve analysis of a collagen peptidase from an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus luminescens*, *Biochem. J.*, **379**, 633-640, doi: 10.1042/bj20031116.
27. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
28. Гаспаров В. С., Дегтярь В. Г. (1994) Определение белка по связыванию с красителем кумасси бриллиантовым голубым G-250, *Биохимия*, **59**, 763-777.
29. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
30. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., and Engel, J. (1985) Molecular cloning – A laboratory manual, in *Acta Biotechnologica*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, **5**, 104-104, doi: 10.1016/0307-4412(83)90068-7.
31. Lennox, E. S. (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1, *Virology*, **1**, 190-206, doi: 10.1016/0042-6822(55)90016-7.
32. Kozlovski, V., Brusov, V., Sulimenkov, I., Pikhtev, A., and Dodonov, A. (2004) Novel experimental arrangement developed for direct fullerene analysis by electrospray time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 780-786, doi: 10.1002/rcm.1405.
33. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, *Anal. Biochem.*, **287**, 252-260, doi: 10.1006/abio.2000.4880.
34. Drew, E. D., and Janes, R. W. (2020) PDBMD2CD: providing predicted protein circular dichroism spectra from multiple molecular dynamics-generated protein structures, *Nucleic Acids Res.*, **48**, W17-W24, doi: 10.1093/nar/gkaa296.
35. Chukhontseva, K. N., Salnikov, V. V., Morenkov, O. S., Kostrov, S. V., and Demidyuk, I. V. (2019) Protealysin is not secreted constitutively, *Protein Peptide Lett.*, **26**, 221-226, doi: 10.2174/0929866526666181212114907.
36. Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE, *Nat. Protoc.*, **1**, 16-22, doi: 10.1038/nprot.2006.4.
37. Karaseva, M. A., Chukhontseva, K. N., Lemeskina, I. S., Pridatchenko, M. L., Kostrov, S. V., and Demidyuk, I. V. (2019) An internally quenched fluorescent peptide substrate for protealysin, *Sci. Rep.*, **9**, 14352, doi: 10.1038/s41598-019-50764-2.
38. Berdyshev, I. M., Karaseva, M. A., and Demidyuk, I. V. (2022) Assay for protealysin-like protease inhibitor activity, *Bio Protoc.*, **12**, e4528, doi: 10.21769/BioProtoc.4528.
39. Goličnik, M., and Stojan, J. (2004) Slow-binding inhibition: A theoretical and practical course for students, *Biochem. Mol. Biol. Educat.*, **32**, 228-235, doi: 10.1002/bmb.2004.494032040358.
40. Butterworth, P. J. (1972) The use of Dixon plots to study enzyme inhibition, *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 251-253, doi: 10.1016/0005-2744(72)90074-5.
41. Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.*, **55**, 170-171, doi: 10.1042/bj0550170.
42. Bozin, T. N., Berdyshev, I. M., Chukhontseva, K. N., Karaseva, M. A., Konarev, P. V., Varizhuk, A. M., Lesovoy, D. M., Arseniev, A. S., Kostrov, S. V., Bocharov, E. V., and Demidyuk, I. V. (2023) NMR structure of emfourin, a novel protein metalloprotease inhibitor: insights into the mechanism of action, *J. Biol. Chem.*, **299**, 104585, doi: 10.1016/j.jbc.2023.104585.
43. Bozin, T. N., Chukhontseva, K. N., Lesovoy, D. M., Filatov, V. V., Kozlovskiy, V. I., Demidyuk, I. V.,

- and Bocharov, E. V. (2021) NMR assignments and secondary structure distribution of emfourin, a novel proteinaceous protease inhibitor, *Biomol. NMR Assign.*, **15**, 361–366, doi: 10.1007/s12104-021-10030-x.
44. Chiu, M. H., and Prenner, E. J. (2011) Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, **3**, 39–59, doi: 10.4103/0975-7406.76463.
 45. Gianni, S., Dogan, J., and Jemth, P. (2014) Distinguishing induced fit from conformational selection, *Biophys. Chem.*, **189**, 33–39, doi: 10.1016/j.bpc.2014.03.003.
 46. Hammes, G. G., Chang, Y. C., and Oas, T. G. (2009) Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13737–13741, doi: 10.1073/pnas.0907195106.
 47. Masson, P., and Lushchekina, S. V. (2016) Slow-binding inhibition of cholinesterases, pharmacological and toxicological relevance, *Arch. Biochem. Biophys.*, **593**, 60–68, doi: 10.1016/j.abb.2016.02.010.
 48. Demidyuk, I. V., Gromova, T. Y., Polyakov, K. M., Melik-Adamyan, W. R., Kuranova, I. P., and Kostrov, S. V. (2010) Crystal structure of the protealysin precursor: insights into propeptide function, *J. Biol. Chem.*, **285**, 2003–2013, doi: 10.1074/jbc.M109.015396.
 49. Marokházi, J., Lengyel, K., Pekár, S., Felföldi, G., Patthy, A., Gráf, L., Fodor, A., and Venekei, I. (2004) Comparison of proteolytic activities produced by entomopathogenic *Photobacterium* bacteria: strain- and phase-dependent heterogeneity in composition and activity of four enzymes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7311–7320, doi: 10.1128/aem.70.12.7311-7320.2004.
 50. Demidyuk, I. V., Gasanov, E. V., Safina, D. R., and Kostrov, S. V. (2008) Structural organization of precursors of thermolysin-like proteinases, *Protein J.*, **27**, 343–354, doi: 10.1007/s10930-008-9143-2.

PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF PHOTORIN, A NEW PROTEIN PROTEASE INHIBITOR FROM THE ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA *Photobacterium laumondii*

I. M. Berdyshev^{1#}, A. O. Svetlova^{1#}, K. N. Chukhontseva¹, M. A. Karaseva¹,
A. M. Varizhuk², V. V. Filatov³, S. Y. Kleymenov^{4,5}, S. V. Kostrov¹, and I. V. Demidyuk^{1*}

¹ National Research Centre “Kurchatov Institute”, 123182 Moscow, Russia; e-mail: ilyaduk@yandex.ru

² Moscow Institute of Physics and Technology, State University, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Chernogolovka Branch of the N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics,
Russian Academy of Sciences, 142432 Chernogolovka, Moscow Region, Russia

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia

⁵ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

Entomopathogenic bacteria of the genus *Photobacterium* secrete protease S (PrtS), which is considered as a virulence factor. We found that in *Photobacterium* genomes, immediately after the *prtS* genes, there are genes that encode small hypothetical proteins homologous to emfourin, a recently discovered protein inhibitor of metalloproteases. Emfourin-like inhibitor gene from *Photobacterium laumondii* subsp. *laumondii* TT01 was cloned and expressed in *Escherichia coli* cells. The recombinant protein, named photorin (Phin), was purified by metal chelate affinity and gel permeation chromatography and characterized. It has been established that Phin is a monomer and inhibits the activity of protealysin and thermolysin, which, like PrtS, belong to the M4 peptidase family. The inhibition constants were 1.0 ± 0.3 and $10 \pm 2 \mu\text{M}$, respectively. It was also demonstrated that Phin is able to suppress the proteolytic activity of *P. laumondii* culture broth (half-maximal inhibition concentration $3.9 \pm 0.3 \text{ nM}$). Polyclonal antibodies to Phin were obtained, and it was shown by immunoblotting that *P. laumondii* cells produce Phin. Thus, the *prtS* genes in entomopathogenic bacteria of the genus *Photobacterium* are colocalized with the genes of emphorin-like inhibitors, which probably regulate the activity of the enzyme during infection. Strict regulation of the activity of proteolytic enzymes is essential for the functioning of all living systems. At the same time, the principles of regulation of protease activity by protein inhibitors remain poorly understood. Bacterial protease-inhibitor pairs, such as the PrtS and Phin pair, are a promising model for *in vivo* studies of these principles. Bacteria of the genus *Photobacterium* have a complex life cycle with multiple hosts, being both nematode symbionts and powerful insect pathogens. This provides a unique opportunity to use the PrtS and Phin pair as a model for studying the principles of regulation of protease activity by proteinaceous inhibitors in the context of bacterial interactions with different types of hosts.

Keywords: proteinaceous protease inhibitor, *Photobacterium*, entomopathogenic bacteria, protealysin, emfourin, photorin