

## СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ IGA1-ПРОТЕАЗ

Казеева Т.Н.<sup>1,2</sup>, Шевелев А.Б.<sup>1,3</sup>, Леонович О.А.<sup>1</sup>, Фаизов Т.Х.<sup>3</sup>, Белякова А.В.<sup>3</sup>, Лебедева А.А.<sup>4</sup>, Кузнецова Т.В.<sup>4,5</sup>, Маракасова Е.С.<sup>5</sup>, Ермохина О.В.<sup>5</sup>, Эпова Е.Ю.<sup>3,5</sup>, Дудорова М.Г.<sup>1,5</sup>, Соцкова Д.В.<sup>2,5</sup>, Волкова Е.А.<sup>2</sup>, Терехина А.С.<sup>2</sup>, Воронова Т.Ю.<sup>6</sup>, Васильев И.А.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Набережночелнинский институт социально-педагогических технологий и ресурсов»;

<sup>3</sup> ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных»;

<sup>4</sup> Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН;

<sup>5</sup> ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина»;

<sup>6</sup> ФГБОУ ВПО «Курский государственный университет», e-mail: matilda4561@mail.ru

---

Обзор посвящен структурным и функциональным особенностям IgA1-специфичных протеаз патогенных микроорганизмов. Интерес к изучению структуры и функций данных протеаз вызван, прежде всего, их предполагаемой ролью в развитии различных инфекций. Основной функцией IgA1-протеаз принято считать деградацию секреторных антител на слизистых оболочках, что приводит к ослаблению иммунитета и к адгезии бактерий на эпителии. На основании анализа сходства «классических» IgA1-протеаз с их функциональными аналогами и структурными гомологами высказывается предположение о возможном влиянии IgA1-протеаз и на эффекторные механизмы, опосредованные сывороточными IgA.

---

Ключевые слова: IgA1-протеазы, менингит, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus*.

## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES IGA1-PROTEASE

Kazeeva T.N.<sup>1,2</sup>, Shevelev A.B.<sup>1,3</sup>, Leonovich O.A.<sup>1</sup>, Faizov T.H.<sup>3</sup>, Belyakova A.V.<sup>3</sup>, Lebedeva A.A.<sup>4</sup>, Kuznetsova T.V.<sup>4,5</sup>, Marakasova E.S.<sup>5</sup>, Ermokhina O.V.<sup>5</sup>, Epova E.YU.<sup>3,5</sup>, Dudorova M.G.<sup>1,5</sup>, Sotskova D.V.<sup>2,5</sup>, Volkova E.A.<sup>2</sup>, Terekhina A.S.<sup>2</sup>, Voronova T.YU.<sup>6</sup>, Vasiliev I.A.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and viral encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences;

<sup>2</sup> Naberezhnochelninsky Institute of Socio-pedagogical techniques and resources;

<sup>3</sup> Federal Center for Toxicological and Radiation Safety of Animals;

<sup>4</sup> S. N. Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences;

<sup>5</sup> Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology by K.I. Skryabin;

<sup>6</sup> Kursk State University, e-mail: matilda4561@mail.ru

This review is dedicated to structural and functional properties of IgA1-proteases in pathogenic microorganisms. The interest to structural and functional studies of IgA-proteases is caused essentially by their putatively great impact on set up and progression of infectious diseases. IgA degradation at mucosal surfaces is commonly suggested to be the main function of IgA1-proteases. In turn, this effect may lead to abatement of the immune response efficiency at the epithelial barrier. In our review, structural comparison of

## **“classic” IgA1-proteases with their functional analogues and structural homologues allows to hypothesize IgA-protease dependent effector mechanisms mediated by serum IgA.**

Key words: IgA1-protease, meningitis, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus*.

### **Введение**

Ряд косвенных данных позволяет рассматривать IgA1-специфичные протеазы в качестве одного из факторов патогенности микроорганизмов. Основной целью нашего обзора является изучение структурных и функциональных особенностей данных ферментов, а также особенностей их взаимодействия с субстратом, что возможно позволит сформулировать новые гипотезы о роли IgA1-протеаз в подавлении иммунных реакций организма.

### **«Классические» IgA1-протеазы**

IgA1-протеазы – ферменты, обладающие уникальной субстратной специфичностью, как в отношении изоформа антител (способность отличать IgA1 от IgA2), так и в отношении вида организма-хозяина (способность отличать IgA1 человека от IgA1 других видов млекопитающих). Общепринятой является точка зрения, что роль этих ферментов сводится к расщеплению S-IgA, которые в больших количествах присутствуют на слизистых оболочках и обеспечивают первую линию защиты от бактериальных патогенов. Деградация антител IgA1-протеазами, таким образом, ослабляет иммунитет слизистых, что приводит к адгезии бактерий на эпителии и колонизации ими слизистых [10].

Наиболее изученными природными продуцентами IgA1-протеаз являются грам-положительные бактерии – гемолитические стрептококки групп А и В и примыкающая к ним *Gemella haemolysans*, и грам-отрицательные патогены родов *Neisseria* и *Haemophilus*. IgA1-протеазы *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* и *H. influenzae* принадлежат к классу химотрипсиноподобных сериновых протеаз, что подтверждается характерными особенностями первичной структуры и чувствительностью к диизопропилфторфосфату. Зрелый фермент этого структурного типа состоит из ~1000 а.о. и содержит последовательность активного сайта – VLGDSGSPLF, характерную для многих протеаз семейства химотрипсина [9, 10]. Яркой структурной особенностью IgA1-протеаз грам-отрицательных бактерий является способность к автономной транслокации через внешнюю мембрану, для чего они изначально синтезируются в виде белка-предшественника, несущего в своем составе так называемый транспортный β-домен. Согласно этому IgA1-протеазу нередко называют основоположником класса белков-

аутоотранспортеров грам-отрицательных бактерий. Среди представителей рода *Haemophilus* продуценты IgA1-протеаз обнаружены только среди серотипов, патогенных для человека [9]. Такие же выводы имели место и при изучении продукции IgA1-протеаз патогенными штаммами *Neisseria*. Подобные наблюдения служат главным основанием, позволяющим рассматривать способность к синтезу IgA1-протеаз в качестве значимого фактора патогенности.

Протеазы стрептококков *S. sanguis*, *S. pneumoniae* и др., а также *Gemella haemolysans*, принадлежат к классу металлопротеиназ: их активность полностью подавляется ЭДТА [6]. Для данного класса протеаз характерно наличие домена, обогащенного тандемно повторенной последовательностью LPNTG. Этот домен выполняет функцию закоривания секретированного за пределы цитоплазмы фермента на поверхности пептидогликановой клеточной стенки бактерии-хозяина. Каталитический центр металлозависимой IgA1-протеазы содержит типичный  $Zn^{2+}$ -связывающий мотив НЕМТН и дополнительный остаток Glu, расположенный в 20 а.о. к С-концу от ключевого His. Наличие генов IgA1-протеаз у стрептококков групп А и В имеет повсеместный характер и не зависит от вирулентности конкретного штамма. В то же время, заметна корреляция на физиологическом уровне: высокая продукция IgA1-протеаз более характерна для высоко вирулентных штаммов основной массы штаммов видов *S. sanguis*, *S. pyogenes*, а также *S. pneumoniae*, чем для представителей нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей. Таким образом, имеющиеся эпидемиологические данные, представленные рядом ученых, позволяют говорить о важной адаптивной роли IgA1-протеаз для патогенных микроорганизмов.

### **Структурные гомологи IgA1-протеаз**

Говоря о структурных гомологах IgA1-протеаз грам-отрицательных бактерий, необходимо обратиться к группе так называемых белков-аутоотранспортеров из энтеробактерий: *Escherichia coli* и *Shigella flexneri* [1, 2]. Будучи представителями того же подкласса *Gamma*proteobacteria, что и *Haemophilus*, *Enterobacteriaceae* значительно отличаются от них по среде обитания. Энтеробактерии, как правило, населяют кишечник человека и животных, проявляя при этом большую или меньшую склонность к образованию токсинов, что может приводить к развитию пищевых токсикоинфекций или истинных эпидемически значимых кишечных инфекций. Инвазивность и эпидемическая опасность штаммов энтеробактерий даже в пределах одного вида очень различается [4]. Белки-аутоотранспортеры являются атрибутом наиболее опасных в эпидемическом

отношении штаммов энтеробактерий, способных проникать во внутреннюю среду организма [8]. Например, белки Pic и EspP выделены из штаммов *E. coli* и *S. flexneri*, вызывающих кишечный геморрагический синдром, EspC – из энтеропатогенных *E. coli*, Sat – из *E. coli*, выделенных от урологических больных, Tsh – *E. coli*, вызывающих геморрагический колит у птиц, SepA – из штаммов *S. flexneri*, выделенных из крови больных септическим шоком. Искусственно полученные мутанты *S. flexneri*, лишенные гена *sepA*, проявляли сниженную по сравнению с исходным штаммом вирулентность при экспериментальном заражении кролика [3]. Высокая адаптивная значимость IgA1-протеазоподобных ауто транспортеров энтеробактерий подтверждается и геномной локализацией их генов: почти все они находятся на плазмидах.

Несмотря на принадлежность IgA1-протеазоподобных ауто транспортеров энтеробактерий к протеазам и явную гомологию всей их последовательности с сериновыми IgA1-протеазами, субстратная специфичность этих ферментов не связана с IgA1 человека. Так, например, EspC расщепляет связь Arg-Arg, Sat – Ala-Ala-Leu и Tyr-Leu-Val, а SepA – Val-Pro-Phe, Ala-Ala-Pro-Phe, Ala-Pro-Leu. В качестве естественных субстратов этих ферментов можно назвать пепсин, муцин, фактор свертывания крови V, спектрин [1].

Подводя итог рассмотрению роли IgA1-протеазоподобных ауто транспортеров энтеробактерий в патогенезе, можно высказать предположение, что их приуроченность к относительно редко встречающимся высокоинвазивным штаммам *E. coli* может рассматриваться в качестве косвенного свидетельства участия в выживании патогена во внутренней среде макроорганизма. Можно предполагать, что ауто транспортеры вносят вклад в инактивацию ударных механизмов иммунной системы за счет протеолиза, участвуют в механическом экранировании патогенов от этих систем или же выполняют функцию рецептора, ориентирующего патоген в пределах макроорганизма. Можно предположить, что эти функции в той или иной мере присущи и истинным IgA1-протеазам, продуценты которых сталкиваются с проблемами, аналогичными инвазивным энтеробактериям, в процессе транслокации из очага первичной инфекции слизистая дыхательных путей во вторичный очаг, ликвор головного мозга.

### **Функциональные аналоги IgA1-протеаз**

К числу близких функциональных аналогов «классических» металлозависимых и химотрипсиноподобных IgA1-протеаз относятся ферменты из бактерий класса Bacteroidetes: из рода *Prevotella* порядок Bacteroidales и рода *Carnocytophaga* порядок

Flavobacteriales. С точки зрения организации каталитического центра ферменты из этого источника принадлежат к классу тиол-зависимых протеаз. Обращает на себя внимание, что, как и в случае с грам-положительными и грам-отрицательными продуцентами «классических» IgA1-протеаз, представители класса Bacteroidetes, синтезирующие IgA1-протеазы, относятся к двум отдаленным группам, в то время, как близкие родственники каждой из них лишены этого признака. Отсюда можно сделать вывод, что сходство адаптивных приспособлений бактерий родов *Prevotella* и *Carnocytophaga* обусловлено сугубо экологическим фактором: обе группы являются анаэробами, населяющими десневые карманы человека и приматов. При этом оба рода представлены 5 – 8 видами, все представители которых синтезируют IgA1-протеазы с однотипными свойствами. Таким образом, и в случае бактерий класса Bacteroidetes можно наблюдать признаки горизонтального переноса генов IgA1-протеаз между отдаленными по происхождению таксонами [7].

Субстратная специфичность тиоловых протеаз бактерий класса Bacteroidetes изучена слабо, так как в отличие от гемолитических стрептококков, *Neisseria* и *Haemophilus*, наряду с IgA1-протеазой они синтезируют другие ферменты, эффективно расщепляющие IgG, IgM и другие субстраты. В результате препараты высокоочищенных IgA1-протеаз из этого источника недоступны. В отличие от продуцентов «классических» IgA1-протеаз, *Prevotella* и *Carnocytophaga* не склонны вызывать менингит, но в некоторых случаях выделяются из содержимого гнойных абсцессов десны, напоминая в этом отношении золотистый стафилококк. Приведенные данные позволяют предполагать, что IgA1-протеазы бактерий этого типа служат преимущественно для обеспечения адгезии продуцирующих их бактерий на поверхности зубной ткани или парадонта, не будучи причастными к проникновению бактерий во внутреннюю среду организма.

### **Особенности субстратной специфичности IgA1-протеаз**

Большинство известных IgA1-протеаз расщепляет только одну постпролиновую пептидную связь, образованную карбоксильной группой Thr или Ser, двойного октапептида Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser в шарнирной области IgA1 человека. Первичная специфичность фермента заключается в способности расщеплять только одну связь в пределах двойного октапептида шарнирной области целостной молекулы IgA1. Получающиеся фрагменты при этом аналогичны продуктам частичного протеолиза IgG пепсином: Fab и Fc [6].

Хотя участок расщепления субстрата всеми IgA1-протеазами расположен в главном шарнире молекулы субстрата и никогда не затрагивает связи Ser-Pro или Thr-Pro в других ее частях, первичная специфичность IgA1-протеаз из различных источников достаточно разнообразна. Таким образом, по типу субстратной специфичности IgA1-протеазы и их структурные гомологи можно разделить на три типа. К первой группе можно отнести истинные IgA1-протеазы из грам-отрицательных патогенов и стрептококков, обладающие тем или иным типом катализа и расщепляющие одну из постпролиновых связей двойного октапептида в шарнирном регионе IgA1 человека. Ко второй группе ферментов можно отнести протеазы из *C. ramosum* и, возможно, *Prevotella* и *Campylobacter*, которые расщепляют связи Pro221-Val222 и Pro223-Ser224 соответственно, расположенные в шарнире IgA до двойного октапептида. К третьей группе ферментов можно отнести сериновые протеазы со способностью к аутотранспорту из бактерий семейства *Enterobacteriaceae* – *E. coli*, *S. flexneri* и *Campylobacter jejuni*, которые проявляют явную структурную гомологию с генами истинных IgA1-протеаз, но не обладают способностью расщеплять IgA1.

IgA1-протеазы обладают исключительной селективностью по отношению к субстрату: первичная специфичность, как уже упоминалось, проявляется в расщеплении связей полноразмерного IgA1 человека в пределах двойного октапептида шарнирной области, а вторичная – в том, что расщеплению подвергаются только IgA человека класса 1 [10]. Так белки, обогащенные остатками Pro и Thr, например, кроличьи IgA полностью устойчивы к действию протеаз. Синтетические пептиды, содержащие связь Pro-Thr, также практически невосприимчивы к протеолитической атаке IgA1-протеазами. Изменение в аминокислотной последовательности шарнирной области существенно влияет на каталитическую эффективность протеаз, о чем говорят, в частности, эксперименты с химерными молекулами IgA. [10].

Очевидно, что для распознавания и эффективного расщепления природного субстрата, IgA1-протеазам не достаточно предъявить только уникальную последовательность шарнирного региона. Исследования с использованием рекомбинантных иммуноглобулинов IgA1 с шарнирным регионом типа IgA2 и IgG2 с шарнирным регионом IgA1 показали, что, хотя шарнирный регион необходим для распознавания и расщепления IgA1-протеазами, будучи встроен в IgG2, он оказывается недоступен для расщепления ими. Таким образом была показана необходимость гомологичных C $\alpha$ 2 и C $\alpha$ 3 доменов в структуре Fc-фрагмента. Эти данные позволяют провести некую гомологию при взаимодействии IgA1-протеаз, IgA-связывающих белков патогенных бактерий и эндогенного рецептора CD89 с молекулами IgA человека: при

взаимодействии IgA1-протеаз с IgA1 C $\alpha$ 2 и C $\alpha$ 3 домены также играют ключевую роль, то есть структура Fc-фрагмента вносит существенный вклад в связывание с ферментом. Можно говорить и о том, что IgA1-протеазы содержат пространственно разнесенные каталитический сайт и аллостерический активаторный сайт и что связывание Fc-домена IgA является первым шагом в формировании фермент-субстратного комплекса. Приведенные данные позволяют предполагать, что тот участок IgA, который обуславливает аллостерическую активацию IgA1-протеаз, может соседствовать или полностью совпадать с сайтами для IgA-связывающих белков из гемолитических стрептококков и стафилококков, а также для эндогенного рецептора CD89.

### Заключение

Анализируя представленные данные о структурных и функциональных особенностях IgA1-протеаз патогенных микроорганизмов и их гомологах, нельзя рассматривать эти ферменты только как механизм, обеспечивающий нормальную колонизацию бактерий на эпителии хозяина, в частности, и потому, что активность IgA1-протеаз патогенов была экспериментально выявлена в биологических средах пациентов с заболеваниями, причиной которой являются обсуждаемые нами микроорганизмы. Можно предполагать, что IgA1-протеазы могут эффективно деградировать и сывороточные IgA1, приводя к отмене опосредованных ими эффекторных функций, таких, например, как взаимодействие с CD89 [5].

### Список литературы

---

1. Benjelloun-Touimi Z., Sansonetti P.J., Parsot C. // *Mol. Microbiol.* 1995. V. 17 P. 123-135.
2. Brockmeyer J., Bielaszewska M., Fruth A., Bonn M.L., Mellmann A, Humpf H.U., Karch H.// *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 6351-6390.
3. Houdouin V., Bonacorsi S., Bidet P.// *Clin. Microbiol. Infect.* 2007. V. 13. P. 1207-1210.
4. Johnson T.J., Wannemuehler Y.M., Nolan L.K.// *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 2360-2369.
5. Kazeeva T.N., Shevelev A.B. Unknown functions of immunoglobulins A. // *Biochemistry Mosc.* 2007. V. 72. P. 485-494.
6. Lomholt J.A., Kilian M. Immunoglobulin A1 protease activity in *Gemella haemolysans*// *J. Clin. Microbiol.* 2000. V. 38. № 7. P. 2760-2762.
7. Renn J.P., Clark P.L. A conserved stable core structure in the passenger domain beta-helix of autotransporter virulence proteins // *Biopolymers.* 2008. V. 89. P. 420-427.

---

8. Restieri C., Garriss G., Locas M.C., Dozois C.M.// *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73 P. 1553-1562.

9. Romanello V., Marcacci M., Dal Molin F., Moschioni M., Censini S., Covacci A., Baritussio A.G., Montecucco C., Tonello F.// *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 45. P. 142-149.

10. Senior B.W., Woof J.M. Effect of mutations in the human immunoglobulin A1 (IgA1) hinge on its susceptibility to cleavage by diverse bacterial IgA1 proteases// *Infect. Immun.* 2005. V. 73. P. 1515-1522.

**Рецензенты:**

Алешин В.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник Государственного учреждения Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

Ляпустин В.Н., д.б.н., ст.н.с., зав. отделением криогенного хранения культур клеток и коллекционных штаммов вирусов ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, г. Москва.