

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 57.061:577.151

### МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗЫ КЛАНА МЕТЦИНКИНОВ: КЛАССИФИКАЦИЯ, СВОЙСТВА, СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

*Н.П. Балабан, Н.Л. Рудакова, А.Р. Сабирова,  
О.Н. Ильинская, М.Р. Шарипова*

#### Аннотация

В обзоре рассматривается одна из групп интересных и жизненно важных цинковых эндопептидаз – группа метцинкинов. Эти ферменты характеризуются общим мотивом активного центра и присутствием метионинового поворота в аминокислотной последовательности. Тем не менее они различаются по структурной организации белковой молекулы, своим физико-химическим свойствам и субстратной специфичности, а также механизмам активации и секреции. Рассматриваются вопросы классификации металлоэндопептидаз, свойства и структурные особенности отдельных подсемейств метцинкинов.

**Ключевые слова:** метцинкины, матриксины, сerratилины, астаины, репролизины, адамализины.

---

#### Введение

Белки, необходимые для жизнедеятельности организмов, имеют строго определенную структуру, соответствующую роли, которую они выполняют в живой клетке. Протеолитические ферменты катализируют множество реакций, участвуя в различных деструктивных процессах, связанных с утилизацией ненужных белков, а также осуществляют селективный протеолиз, связанный с изменением метаболизма клетки. Кроме выполнения жизненно важной трофической функции, протеолитические ферменты играют ключевую роль в процессах клеточной дифференцировки, осуществляя регуляторные функции на посттрансляционном уровне.

Установлено, что протеолитические ферменты вовлечены во множество патологических процессов: воспалительные процессы, ревматоидные артриты, атеросклероз, онкологические заболевания и другие. Обнаружение ферментов, участвующих в возникновении и развитии этих заболеваний, ведет к необходимости исследования функциональных и структурных особенностей соответствующих ферментов и механизма их действия *in vitro* и *in vivo*.

В обзоре анализируются данные исследований ферментов эндопептидаз, объединенных в группу метцинкинов. Описаны различия, позволяющие разде-

лить метцинкины семейств M10 и M12 на отдельные подсемейства, каждое из которых имеет характерные признаки.

### 1. Основы классификации металлопротеиназ

Классификация ферментов класса металлопротеиназ основывается на двух критериях: по типу катализируемой связи и по структуре каталитического центра [1].

По типу гидролиза все металлопротеиназы подразделяются на ферменты экзо- и эндонуклеотического типа действия, однако часто в одном клане оказываются ферменты обоих типов. По аминокислотным остаткам, образующим каталитический центр, все известные металлопротеиназы (КФ 3.4.24) в 1995 г. были подразделены на 5 кланов: MA, MB, MC, MD и ME, каждый из которых содержит один каталитически важный ион цинка [2]. Позднее к ним были добавлены ещё три клана, два из которых (MF и MH) содержали в активном центре по два атома цинка, а клан MG – два атома кобальта [3, p. 992–1416]. На основании этой классификации была составлена база данных пептидаз MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), в которой гомологичные металлопротеиназы были объединены в семейства и гомологичные семейства сгруппированы в кланы [4].

Таким образом, почти все металлопротеиназы представляют собой цинковые протеиназы, для которых присутствие иона цинка в каталитическом центре является необходимым условием для осуществления катализа.

Хорошо изученным представителем металлопротеиназ является термолизин (клан MA MEROPS), активный центр которого содержит аминокислотную последовательность **HEXXH** с двумя гистидиновыми остатками His142 и His146. Эти остатки являются лигандами для иона цинка, третий лиганд (Glu166) находится в консервативном мотиве NEXXSD на расстоянии 20 аминокислотных остатков от С-конца активного центра фермента [5]. Термолизиноподобные ферменты клана MA, имеющие в активном центре глутамат в качестве третьего лиганда цинка, называются *глуцинкины* [6].

Металлоэндопептидазы, имеющие протяженный мотив активного центра **HEXXHXXGXXH/D** и характерный Met-поворот с инвариантным метионином в третичной структуре белка, относятся к клану метцинкинов. Все эндопептидазы этого клана синтезируются как неактивные предшественники, но имеют разные механизмы активации. В клан метцинкинов включены ферменты семейств M6, M7, M10, M11, M12 и, предположительно, M8, у которого отсутствует протяженный мотив каталитического центра. Его активный центр похож на каталитический центр термолизина **HEXXH**. Тем не менее это семейство включено в клан метцинкинов из-за схожести механизмов активации предшественника фермента. Семейство M6 содержит металлоэндопептидазы из *B. thuringiensis*, известные как иммунные ингибиторы А и В. Иммунный ингибитор А гидролизует антибактериальные белки насекомых и внутриклеточные пептиды личинок [7, 8]. Фермент стабилен в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , но высокие концентрации  $Ca^{2+}$  ингибируют его активность. Фермент ингибируется ЭДТА, 1,10-фенантролином, фосфорамидоном, но не ингибиторами сериновых и аспартатных протеиназ. Представителем семейства M7 является снапализин из *Streptomyces* sp. Разные

виды *Streptomyces* секретируют белок с молекулярной массой от 16 до 24 кДа. Третичная структура фермента похожа на структуру астацина.

## 2. Характеристика эндопептидаз семейства M10

Семейство M10 клана метцинкинов содержит секретируемые металлоэндопептидазы, которые называются внутритканевыми коллагеназами. Между собой они отличаются по источнику происхождения (прокариотические и эукариотические), по строению мультидоменной структуры молекулы белка, по механизму активации и секреции ферментов. В связи с этим их разделяют на два подсемейства. В подсемейство А входят эукариотические энзимы, называемые матриксными металлопротеиназами, или матриксинами, подсемейство В содержит бактериальные ферменты – серрализины *Serratia marcescens* и родственные им ферменты, выделенные из других бактериальных источников (M10A и M10B MEROPS). Оба подсемейства в основном имеют мультидоменную структуру (так называемые мозаичные белки). В протеазном домене этих ферментов единственный каталитический ион цинка связан с тремя гистидиновыми остатками протяженного мотива активного центра **HEXXHXXGXXH**.

В структуре ферментов имеется высококонсервативная последовательность AL(V)MYP (для матриксинов) или SL(V,I)MSY (для серрализинов), называемая метиониновым поворотом, в которой остаток метионина инвариантен у всех ферментов семейства M10, а также семейства M12. Наличие консервативного Метповорота позволило назвать эту группу ферментов *метцинкинами*. Особенностью ферментов подсемейств А и В M10 являются различия в механизме активации. Ферменты подсемейства А активируются по механизму *цистеинового переключателя*, ферменты подсемейства В – по механизму *тирозинового переключателя*.

**2.1. Свойства и структурные особенности матриксинов (подсемейство M10A).** Подсемейство M10A (матриксины) включает эндопептидазы животного происхождения: внутритканевые коллагеназы 1, 2, 3 и 4, желатиназы А (КФ 3.4.24.24) и В (КФ 3.4.24.35), матрилизин (КФ 3.4.24.23), стромелизины 1 (КФ 3.4.24.17) и 2 (КФ 3.4.24.22) и другие. Внутритканевые коллагеназы, выделенные из тканей разных животных, упоминаются в литературе под разными названиями, поэтому в 1998 г. было введено общее обозначение – MMP<sub>s</sub> (матриксные металлопротеиназы) [3]. Внутритканевая коллагеназа 1 (MMP-1, КФ 3.4.24.7), нейтрофильная коллагеназа 2 (MMP-8, КФ 3.4.24.34), коллагеназы 3 (MMP-13) и 4 (MMP-18) участвуют в деградации экстрацеллюлярных матриксных белков, таких, как различные типы коллагенов и желатины. Они вовлечены также в патологические процессы, такие, как ревматоидные артриты и остеоартриты, язвенные заболевания роговицы глаза, различные воспалительные процессы, в том числе кишечные, атеросклероз, карциномы человека и другие [9]. Высокую степень проникновения в соединительные ткани имеет нейтрофильная матриксная коллагеназа MMP-8, выделенная из человеческих лейкоцитов, где она накапливается в виде латентного проэнзима.

Матриксины произошли от простых, немозаичных белков, но в ходе эволюции к С-концу пептидазного домена присоединились дополнительные домены. Самым маленьким немозаичным белком является матрилизин; коллагеназы и

желатиназы имеют уже многодоменную структуру. Удивительным является тот факт, что желатиназы человека имеют внутри протеазного домена три дополнительных домена, которых нет у других матриксинов. Все матриксины синтезируются как препробелки и активируются при отщеплении N-концевого пропептида.

Коллагеназа MMP-1 (M10.001 MEROPS) синтезируется так же, как препро-энзим с 469 аминокислотными остатками. Сигнальный пептид имеет 19 аминокислот, пропептидный домен – 80 аминокислот, каталитический домен – 162 аминокислоты, С-концевой домен – 192 аминокислоты. Между N- и С-концевыми доменами находится связывающий пептид в виде петли из 16 аминокислотных остатков. Похожая аминокислотная последовательность характерна также для нейтрофильной коллагеназы 2 (MMP-8, M10.002 MEROPS), коллагеназы 3 (MMP-13, M10.013 MEROPS) и других матриксинов. Молекулярная масса про-энзима MMP-1 составляет 51929 кДа, зрелой формы – 42570 кДа. Сравнение аминокислотных последовательностей протеазных доменов показало существенную гомологию, свидетельствующую о том, что эти ферменты эволюционировали от общего предка [10].

Изучение кристаллической структуры протеазного домена коллагеназы MMP-1 показало, что каталитический цинк связан с тремя гистидиновыми остатками His218, His222 и His228 в консервативном мотиве активного центра **HELGHSLGLSH**. MMP-1, MMP-8 и MMP-13 активируются при протеолитическом отщеплении пропептида по связи Gln99–Phe100 (нумерация по MMP-1) трипсином, химотрипсином, плазмином, катепсином G, стромелизином 1 или 2, при этом снимается ингибирующий эффект тиоловой группы цистеина, так как нарушается ковалентная связь между каталитическим цинком и консервативным цистеином Cys92 в пропептидной последовательности (рис. 1) [3, 11]. После удаления пропептида фенилаланин Phe100 становится в протеазном домене N-концевой аминокислотой [12].



Рис. 1. Доменная структура матриксной металлопротеиназы (MMP-1) [11]

Аминогруппа Phe100 формирует солевой мостик с карбоксильной группой строго консервативного Asp252, что приводит к стабилизации в активном центре соседнего аспартата, образующего водородную связь в Met-повороте. Это создает благоприятные условия для связывания фермента с субстратом на первой ступени каталитического акта, чем и объясняется высокая протеолитическая активность [13]. Такой же механизм активации установлен для коллагеназы MMP-8.

Кроме каталитического иона цинка, протеазный домен коллагеназ MMP-1 и MMP-8 имеет ещё дополнительный ион цинка, а также один или два иона кальция, необходимых для стабильности домена, в котором отсутствуют дисульфидные связи. Биохимические исследования показали, что дополнительный ион цинка не является абсолютно необходимым для стабилизации структуры этого домена и может быть заменен на ионы других металлов [14]. Коллагеназы содержат несколько ионов кальция, в частности коллагеназа MMP-1 имеет 3 иона кальция, два из которых находятся в протеазном домене. Для MMP-8 также показано наличие двух ионов кальция, которые важны для поддержания стабильной структуры домена. Рентгеноструктурные исследования протеазного домена MMP-1 выявили интересные особенности. Этот домен соединен с C-доменом петлеобразным неструктурированным пролин-богатым линкерным пептидом, наличие которого может объяснить высокую чувствительность коллагеназы MMP-1 из лейкоцитов человека к аутокаталитическому расщеплению. Это расщепление может произойти по связи Pro269-Ile270-Gly, при этом протеазный домен приобретает протеолитическую активность и может действовать как активатор проэнзима. Однако соответствующая последовательность Pro-Ser-Gly коллагеназы MMP-1, выделенной из тканей свиньи, устойчива к ауторасщеплению [15].

Коллагеназы осуществляют ограниченный протеолиз, расщепляя трехспиральные  $\alpha$ -цепи коллагена типов I, II, III только по связи Gly775-Leu776 или Gly775-Ile776 [16, 17]. Субстратами коллагеназ кроме коллагенов являются желатин, протеогликаны,  $\alpha_1$ -антихимотрипсин и другие. Среди синтетических субстратов лучшим для матриксинов оказался октапептид Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln. Кроме того, в синтетических субстратах ферменты могут гидролизовать также пептидные связи, если в положении P1 находится Ala, а в положении P1' – Tug или Phe. Матриксины проявляют высокую протеолитическую активность, если в реакционной среде (pH 7.0) присутствуют ионы цинка (0.5 мМ), кальция (5 мМ), а также NaCl (100 мМ). Активность ферментов ингибируется TIMP<sub>s</sub> – тканевыми ингибиторами металлопротеиназ [18, 19],  $\alpha_2$ -макроглобулином [20], тетрациклином [21], доксициклином [22] и хелатирующими агентами (1,10-фенантролином и ЭДТА) [3].

**2.2. Характеристика сerratилинов (подсемейство M10B).** Подсемейство M10B включает сerratилины *Serratia*, аеругинолизины *Pseudomonas* и мирабилизины *Proteus*. Название ферментов складывается из двух слов, названия вида и названия фермента, например *Serratia* и *lysin*. Сerratилин (M10.051 MEROPS) и другие члены этого подсемейства имеют похожие физико-химические свойства, структурную организацию, механизм секреции белков и активации протеазного домена.

Ферменты проявляют протеолитическую активность в широком диапазоне pH от 6.0 до 10.0 с оптимумом pH 8.0, поэтому их часто называют щелочными металлопротеиназами. Субстратами служат казеин, азоказеин, флуоресцирующие изотиоцианатпроизводные желатина, а также различные синтетические *n*-нитроанилиды, причем величина последних значима для процесса связывания с активным центром фермента и составляет не менее 4 аминокислотных остатков.

Серрализин и аеругинолизин (M10.056 MEROPS) проявляют широкую специфичность с предпочтением к небольшим остаткам Gly и Ala, а также к гидрофобным остаткам в положении P1', причем в положении P2 и P2' предпочтительнее наличие гидрофобных остатков, чем других аминокислотных [23]. Кроме того, ферменты гидролизуют в *p*-нитроанилидах и метилкумариламидах связи после Arg [24, 25].

Активность серрализинов подавляется ЭДТА, 1,10-фенантролином, пептидил-меркаптоанилидами, такими, как Br-Phe-Arg-SH, но серрализины не ингибируются классическим ингибитором сериновых протеиназ DFP и фосфорамином – ингибитором термолизина. После обработки ЭДТА активность может быть восстановлена при добавлении ионов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и в меньшей степени  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . Серрализины ингибируются маленьким белком-ингибитором (10 кДа), выделенным из тех же штаммов *Serratia*, *Pseudomonas* и *Erwinia* [26].

Серрализины – это одноцепочечные белки. Молекулярная масса серрализина *Serratia* sp. *E-15* около 55 кДа, *pI* между 4.5 и 5.5, аеругинолизина – 49.5 кДа, *pI* = 4.1, мирабилизина – 55 кДа, *pI* = 4.3, аминокислотные последовательности протеазного домена этих ферментов на 50–55% идентичны между собой [27, 28]. Определены третичные структуры серрализинов *Serratia* sp. *SM6* и *E-15*, аеругинолизина *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia chrysanthemi* и *Proteus mirabilis* [29–31].

Строго консервативной для всех ферментов клана метцинкинов является структура мотива активного центра. Каталитический ион цинка связан с тремя гистидиновыми остатками активного центра **HEXXHXUGUXH**, где X – любая аминокислота, U – объемный гидрофобный остаток. Кроме того, белки могут содержать до 7–8 ионов кальция. В структуре всех серрализинов имеется консервативный мотив – метиониновый поворот, характерный для ферментов группы метцинкинов. Наличие тирозина в Met-повороте серрализинов позволило отнести эти ферменты к группе эндопептидаз, активация которых осуществляется по механизму *тирозинового переключателя*, когда тирозин при активации фермента становится пятым цинковым лигандом и включается в субстратное связывание и/или в стабилизацию переходного состояния во время катализа [29, 32, 33].

Молекула серрализина состоит из отдельных структурных доменов (N- и C-домены). N-домен – это протеазный домен с правильным фолдингом, он похож на протеазный домен астацина. C-домен – это специальный домен, необходимый для секреции фермента, так как серрализины синтезируются без сигнального пептида. Протеиназы серрализинового подсемейства содержат в C-домене шесть (или больше) повторов консервативной аминокислотной последовательности GGXGXD, в которой локализованы несколько Ca-связывающих сайтов. C-концевой сегмент, содержащий 29 аминокислотных остатков, действует как транслокационный сигнал, в котором консервативный C-концевой мотив DXXX (X – любая гидрофобная аминокислота) является необходимым для секреции. У серрализинов и мирабилизинов C-концевой мотив содержит последовательность DFIV [27]. Этот C-домен не удаляется протеолитически из серрализинов при их секреции в среду. Активация фермента осуществляется при удалении N-концевого пропептида.

Эндопептидазы подсемейства серрализинов могут быть причиной возникновения ряда патогенных инфекций, которые проявляются в следующем: деградация тканей и мембран кишечных эпителиальных клеток, заражение крови, инактивация защитных белков, в том числе иммуноглобулинов, лизоцима и трансферрина, а также диареи у крупного рогатого скота.

### 3. Характеристика эндопептидаз семейства M12

Семейство M12 клана метцинкинов объединяет эндопептидазы, выделенные из источников животного происхождения, которые имеют много общего с эндопептидазами семейства M10. Металлопротеиназы содержат в пептидазном домене один каталитический ион цинка, который связан с тремя гистидиновыми остатками консервативного мотива активного центра. Они, так же как и члены семейства M10, имеют в структуре метиониновый изгиб с консервативным Met. Этот Met-изгиб играет важную роль в активации большого числа ферментов семейства M12. Однако ферменты семейства M12 имеют значительные различия по аминокислотной последовательности, механизму активации, субстратной специфичности, поэтому их подразделяют на два подсемейства.

Подсемейство M12A – астациновое подсемейство – содержит в консервативном Met-повороте каталитический Туг, выполняющий роль *тирозинового переключателя* при активации фермента. В это подсемейство входят выделенные из разных источников животного происхождения астацины, хориолизины H и L, меприны A и B, проколлагеновые N- и C-эндопептидазы и другие ферменты, а также единственный в этом подсемействе бактериальный флавастацин. Подсемейство M12B обладает другим механизмом активации протеазного домена, называемого *цистеиновым переключателем*. Это подсемейство, в свою очередь, подразделяется на две большие группы ферментов: репролизины, выделенные из яда различных змей, и металлопротеиназы, выделенные из различных животных, в основном мышей, крыс, кроликов, и человека. В эту группу входят ферменты ADAM<sub>s</sub>, атролизины A, B, C, E, атроксазы и другие. Почти все эти ферменты представляют собой мозаичные белки, состоящие из протеазного домена, к C-концу которого присоединяются различные непротеазные домены [3]. Эндопептидазы подсемейств A и B имеют в протеазном домене дисульфидные связи.

#### 3.1. Астацин и астациноподобные металлопротеиназы (M12A MEROPS).

Хорошо изученным ферментом подсемейства A является астацин, выделенный в 1967 г. из содержимого пищеварительного тракта пресноводного речного рака *Astacus astacus* L. и названный сначала *маленькой молекулой протеиназы речного рака* [34]. Позднее, когда в молекуле белка был обнаружен каталитически важный ион цинка, этот фермент был отнесен к цинкзависимым металлопротеиназам и назван астацином [35, 36]. Астацины встречаются в основном в царстве животных, но обнаружены и у одного вида бактерий [37].

Астацин может служить прототипом для семейства экстрацеллюлярных цинковых эндопептидаз [38]. К близкородственным астациноподобным эндопептидазам относятся секретлируемые и мембраносвязанные меприны A и B, выделенные из почек грызунов [39, 40] и кишечника человека [7], хориолизины L и H, обнаруженные в лососевых рыбах, необходимые для лизиса внутренней оболочки

яйца, который способствует облегчению выхода эмбриона [41, 42], проколлагеновая С-эндопептидаза, выделенная из фибробластов мышей [43] и сухожильный зародыша цыпленка [44], идентичная ей ВМР-1, выделенная из ткани человека [45], флавастацин бактериального происхождения [37] и некоторые другие астациновые гомологи. Физиологическая роль этих металлоэндопептидаз состоит не только в осуществлении функции пищеварения. Эти ферменты играют важную роль в процессинге пептидов в эмбриональном развитии и дифференцировке тканей [46, 47].

Астацин синтезируется как неактивный предшественник, активация которого включает в себя протеолитическое удаление N-концевого пропептида; зрелый белок на N-конце содержит Ala. Авторы предполагают, что при синтезе астацина возникают значительные конформационные изменения, позволяющие осуществить процессинг проэнзима [48]. Астацин стабилен в физиологических условиях, он устойчив против самопереваривания, но при pH ниже 4 быстро и необратимо инактивируется [49].

Нативная молекула астацина состоит из 200 аминокислотных остатков, имеет  $pI = 3.5$ , для денатурированного мочевиной белка  $pI = 4.8$ . Оптимум pH действия астацина находится в интервале pH 6–8 и зависит от субстрата [50]. Активность астацина определяется по гидролизу казеина, азоказеина, желатина, коллагена при нейтральном значении pH. При расщеплении пептидных связей в белковых субстратах астацин проявляет предпочтение к аминокислотным остаткам с короткими боковыми цепями (Ala, Thr, Ser, Gly) в положении P1', к пролину в положениях P2' и P3', к гидрофобным остаткам в положениях P3' и P4' [51, 52]. Субстратами служат также синтетические нитроамидоподобные соединения  $\text{Suc-Ala-Ala-Ala-NHPhNO}_2$  и очень чувствительные флуоресцентные агенты [53, 54]. Анализ гидролиза некоторых синтетических олигопептидов различной длины и состава показал, что астацин обладает протяженным субстратсвязывающим сайтом. Эффективный гидролиз наблюдается на пептидах длиной не менее пяти аминокислотных остатков. Оптимальная длина синтетических субстратов – семь или более аминокислотных остатков [53]. Астацин и астациноподобные эндопептидазы не ингибируются фосфорамидоном (ингибитором термолизиноподобных протеиназ клана MA), тканевыми ингибиторами металлопротеаз (TIMP<sub>s</sub>). У ферментов этого подсемейства есть один очень сильный природный ингибитор –  $\alpha_2$ -макроглобулин. Эти ферменты ингибируются также белковыми ингибиторами, выделенными из семян растения Средиземного моря *Ecballium elaterum* и клубней картофеля. Кроме того, к ингибиторам астацина относятся дипикалиновая кислота, аминокислотные гидроксаматы, тиоловые компоненты и др. [54]. Сильным ингибитором астацина является синтетическое псевдопептидоподобное вещество FMOC-Pro-Lys-Phe- $\psi$ (PO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-Ala-Pro-Leu-Val-OH ( $K_i = 42$  нМ) [55]. Металхелатирующие ингибиторы (1,10-фенантролин и ЭДТА) тоже ингибируют астацин, но ЭДТА действует очень слабо, что явилось причиной поздней идентификации астацина как цинкового энзима [52].

Астациноподобная эндопептидаза – меприн – впервые была выделена из почек мыши как мембраносвязанная металлопротеиназа [56]. Молекулы меприна представляют собой олигомеры, которые состоят из эволюционно родственных



$\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Меприн А (КФ 3.4.24.18) состоит из двух  $\alpha$ -субъединиц (гомоолигомеры) или из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц (гетероолигомеры), меприн В (КФ 3.4.24.63) содержит гомоолигомеры из двух  $\beta$ -субъединиц [57, 58]. Установлено, что меприн А существует не только как мембраносвязанная форма, состоящая из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц и называемая эктоэнзимом. Известна секретируемая форма меприна А, содержащая только  $\alpha$ -субъединицы. Меприн В является интегральным мембраносвязанным белком и обнаруживается исключительно на поверхности клетки. Все астациноподобные протеиназы имеют мультидоменную структуру, но третичная структура протеазного домена похожа на структуру астацина.

В 1995 г. в культуральной жидкости *Flavobacterium meningosepticum* была обнаружена новая астациноподобная эндопептидаза – флавастацин (M12.066 MEROPS) [37]. Ген флавастацина клонирован, секвенирован, изучена его экспрессия [59]. Фермент синтезируется с N-концевым пропептидом, не содержит дисульфидных связей, содержит 352 аминокислотных остатка с молекулярной массой 38843 Да [37]. Аминокислотная последовательность протеазного домена на 20% идентична с астацином и на 24–29% – с меприном. Обнаружение бактериальной астациноподобной эндопептидазы предполагает наличие общего предка, существовавшего до начала дивергенции этого семейства ферментов.

Флавастацин – нейтральная эндопептидаза, осуществляющая ограниченный протеолиз пептидов по связям, образованным остатками Asp. Для определения специфичности фермента была синтезирована серия пентапептидов типа FA–Leu–Ala–Asp–Ala–Ser–NH<sub>2</sub>. Этот субстрат был расщеплен на FA–Leu–Ala и Asp–Ala–Ser–NH<sub>2</sub>. В этих же условиях субстрат с Glu-остатком вместо Asp не был расщеплен. Однако высокие концентрации фермента при длительном времени инкубации гидролизуют субстраты с глутаминовой кислотой [59].

Протеазный домен флавастацина содержит высококонсервативный цинксвязанный мотив **HEXXHXXGXXHEXXRXDRD** и характеризуется наличием метионинового изгиба **SVMMY**, благодаря которому флавастацин был отнесен к астациновому подсемейству [48].

Флавастацин получен в гомогенном состоянии из культуральной жидкости *F. meningosepticum* за одну стадию очистки с помощью гидрофобной хроматографии. Из 1 л культуральной жидкости получено около 4 мг гомогенного белка. Чтобы избежать слабого аутопротеолиза, очистку фермента проводят в присутствии 10 мМ ЭДТА с последующим диализом против 1 мМ ацетата цинка для активирования фермента.

**3.2. Репролизины и адамализины (подсемейство M12B).** К подсемейству M12B относятся две большие группы ферментов – репролизины яда змей (SVMP<sub>s</sub>)<sup>1</sup> и эндопептидазы, выделенные из репродуктивных тканей животных, – которые имеют общее название ADAM металлопротеиназы (ADAM<sub>s</sub>)<sup>2</sup>, или адамализины [3]. Эти ферменты синтезируются как препробелки и подвергаются протеолитическому процессингу.

<sup>1</sup> SVMP<sub>s</sub> (snake venom metalloproteases)

<sup>2</sup> ADAM<sub>s</sub> (a disintegrin and metalloprotease)

Обнаружено более 100 репролизинов у 36 видов змей и установлено, что многие из них являются изоэнзимами. Так, из яда *Crotalus atrax* было выделено 13 репролизинов, половина из которых является изоэнзимами, как это показано для атролизинов В, С и атраксаз, у которых аминокислотные последовательности практически идентичны (98%).

Репролизины и адамализины представляют собой мозаичные белки, в которых пептидазный домен похож на таковой в астадине: имеется характерный длинный С-конец, состоящий из набора непептидазных доменов, аналогичных для высокомолекулярных астаиноподобных эндопептидаз. Все репролизины разделяются на классы, имеющие различную доменную структуру и молекулярную массу [3].

Класс 1. Маленькие репролизины с молекулярной массой 20–30 кДа, зрелая форма которых содержит только протеазный домен. Представители класса – атролизины В, С.

Класс 2. Энзимы средних размеров с молекулярной массой 30–50 кДа, имеющие кроме протеазного домена также дезинтегриновый домен (атролизин Е, билитоксин).

Класс 3. Репролизины и большинство геморрагических токсинов с молекулярной массой 50–80 кДа, содержащие протеазный домен, дезинтегриновый домен и *цистеин-богатый* домен (атролизин А). Все репролизины этого класса являются потенциальными геморрагическими токсинами [60].

Класс 4. Энзимы с молекулярной массой 80–100 кДа, содержащие четвертый лектиноподобный домен (металлопротеиназа из *Vipera russelli venom*) [61].

В группу ферментов ADAM<sub>s</sub> входит большое количество эндопептидаз млекопитающих. Они имеют глобулярную форму, характеризуются наличием протеолитической активности и большого набора дополнительных доменов, находящихся на С-конце протеазного домена. Доменная структура ферментов ADAM<sub>s</sub> состоит из продомена, металлопротеазного домена, уникального дезинтегринового домена, отвечающего за связывание с интегрином или другими рецепторами клеточной поверхности, цистеин-богатого домена, EGF-подобного домена, трансмембранного домена и цитоплазматического якоря.

Ферменты ADAM<sub>s</sub> вовлечены в разнообразные биологические процессы: разрушение факторов роста, клеточную миграцию, в процессы развития мышц и оплодотворения. Они играют важную роль в возникновении и развитии некоторых болезней: воспалительные процессы, артриты, онкологические заболевания [62, 63].

Эти ферменты обнаружены у позвоночных, а также у *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* и *Xenopus*, но отсутствуют у *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и растений [63]. Почти все ферменты имеют несколько изоформ, у которых практически нет каких-либо функциональных различий, но они могут иметь разную локализацию. Так, у эндопептидазы ADAM 12 обнаружено 2 изоформы, одна из которых – мембраносвязанный белок, другая – секретируемый. Человеческая эндопептидаза ADAM 28 тоже имеет две изоформы, одна секретируется в селезенке, вторая, мембраносвязанная форма, специфична для лимфатических узлов [63].

Эндопептидазы ADAM<sub>s</sub> содержат на N-конце сигнальную последовательность, необходимую для секреции белка, и пропоследовательность (продомен), функционирующую при созревании фермента. Основная функция продомена *in vivo* состоит в поддержании фермента в неактивном состоянии с помощью механизма цистеинового переключателя. При протеолитическом отщеплении пропептида протеазный домен приобретает протеолитическую активность. Однако для некоторых ферментов ADAM<sub>s</sub> показано, что они могут подвергаться аутокаталитической активации. Второй функцией продомена является участие его в качестве шаперона в правильном фолдинге металлопротеазного домена и структурировании его активного центра [63].

Свойства ферментов ADAM<sub>s</sub> хорошо изучены. pH-Оптимум активности находится в интервале pH 7–9 и незначительно изменяется при добавлении миллимолярных количеств Ca<sup>2+</sup>. Протеолитическая активность подавляется цинковыми хелаторами (1,10-фенантролин, ЭДТА), неселективными пептидными гидроксаматами, конкурентно связывающимися с активным центром эндопептидаз, и дитиотреитолом, но не фосфорамидоном – ингибитором металлопротеаз класса MA [63]. Тканевые ингибиторы металлопротеаз (TIMP<sub>s</sub>), проявляющие высокую эффективность при ингибировании матриксинов (MMP<sub>s</sub>) семейства M10, ингибируют также активность многих эндопептидаз ADAM<sub>s</sub>. К активаторам ферментов ADAM<sub>s</sub> относится аминофенилмеркуриацетат (APMA) с неустановленным механизмом активации. Сначала предполагали, что механизм активации связан с цистеиновым переключателем. Однако изучение мутаций в продоменах показало, что механизм активации более сложен и может быть связан с конформационными изменениями в продоме [63].

### 3.3. Структурные особенности металлоэндопептидаз семейства M12.

Известны третичные структуры некоторых представителей семейства M12. Третичная структура астацина, полученная с разрешением в 1.8 Å, является основной моделью для изучения других астациноподобных эндопептидаз [35]. Молекулы эндопептидаз семейства M12 имеют форму глобулы, разделяющуюся на два субдомена (N- и C-домены) глубокой узкой и длинной щелью, на дне которой находится каталитически активный цинк. N-домен астацина представляет собой N-концевую часть полипептидной цепи, имеет упорядоченную структуру, состоящую из четырех изогнутых широких параллельных и одной антипараллельной β-полосок и двух длинных α-спиралей (рис. 2).

Второй субдомен, C-домен, варьирует по величине и форме у разных астациноподобных энзимов. Он начинается после консервативного глицинового остатка Gly99, при этом формируется менее упорядоченная структура, содержащая, однако, одну α-спираль.

Оба домена ковалентно связаны дисульфидным мостиком Cys42–Cys198, другой консервативный дисульфидный мостик Cys64–Cys84 располагается рядом с активным центром белковой глобулы. Консервативность цистеиновых остатков, формирующих внутримолекулярные связи в протеазном домене астацина и астациноподобных эндопротеиназ, подтверждает предположение о том, что эти связи необходимы для поддержания третичной структуры белка [35].



Рис. 2. Пространственная структура астацина. Каталитический ион цинка изображен в виде сферы [58]

Цинк-связанные регионы астацина, астациноподобных эндопептидаз, протеиназ змеиного яда и адамализинов, матриксных протеиназ семейства M10, а также термолизина и термолизиноподобных эндопротеиназ клана MA схожи между собой, что позволяет сделать предположение о существовании общей модели связывания цинка в этих белках. Аналогичное с термолизином расположение первых двух цинковых лигандов His92 и His96 (нумерация по астацину) и активированной молекулы воды, находящейся между ионом и остатком глутаминовой кислоты Glu93 в активном центре **HELMHAIQFYH**, указывает на сходство в каталитическом механизме астацина и термолизина.

Консервативный остаток глицина Gly99, осуществляющий резкий поворот полипептидной цепи к иону цинка, играет важную роль в правильном расположении третьего цинкового лиганда His102 [38] (рис. 3).

Рядом с цинковым лигандом His92 в активном центре астацина находится остаток глутаминовой кислоты Glu93, выполняющий важную функцию в процессе катализа. Ранее для термолизина (клан MA) было показано, что остаток глутаминовой кислоты Glu143, входящий в активный центр **HEXXH**, переносит протон от активированной молекулы воды к расщепляемой пептидной связи, участвуя в акте катализа. На этом основании предположили, что в молекуле астацина и астациноподобных протеиназ роль главного основания может выполнять остаток Glu93, находящийся в протяженном мотиве активного центра. Для выяснения роли остатка Glu93 сайт-направленным мутагенезом был получен астациновый мутант Glu93Ala, где остаток глутаминовой кислоты был заменен на нефункциональный остаток аланина.

Полученный мутантный белок в концентрации в 350 раз большей, чем исходный фермент, не обладал протеолитической активностью по гидролизу желатина и высоко чувствительного флуоресцентного субстрата Dns-Pro-Lys-Arg-Ala-Pro-Trp-Val. Этот эксперимент подтвердил предположение о важной роли

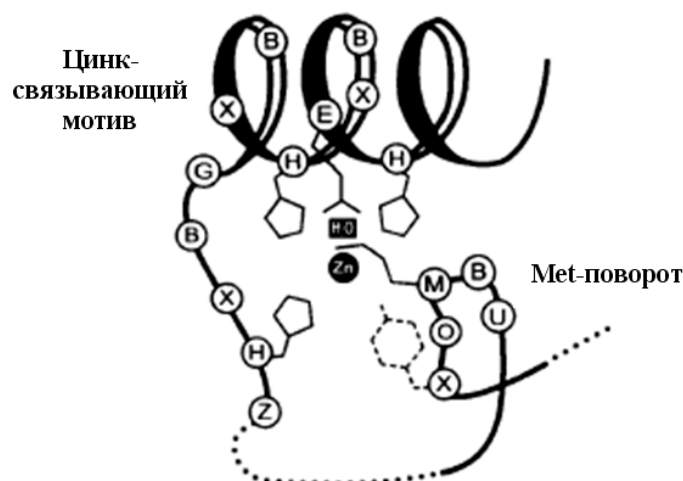


Рис. 3. Met-поворот в структуре молекулы астацина. Три имидазольные группы His92, His96 и His102, активированная молекула воды и Tyr149 являются цинковыми лигандами [67]

Glu93 как главного каталитического основания в молекуле астацина. Glu93, являясь акцептором протона, поляризует молекулу воды, которая образует четвертый цинковый лиганд и участвует в каталитическом акте [47].

С помощью рентгеноструктурного анализа установлено, что в зрелом астацине Glu103 ориентирован с помощью молекулы воды Sol501 таким образом, что образуется солевой мостик с N-концевой Ala1. В проэнзиме такая ориентация невозможна и фермент не активен.

Это подтверждает предположение о том, что эта связь является важной в структуре астацина, поскольку остаток Glu103 характерен только для членов астацинового подсемейства (рис. 4).

Таким образом, была установлена важная роль остатка Glu103 в стабилизации молекулы астацина. В связи с чем многие исследователи считают, что Glu103 тоже относится к продленному мотиву **HELMHNAIGFYHE** активного центра астацина [38, 64–66].

Металлоэндопептидазы семейств M10 и M12 формируют метиониновый изгиб, содержащий инвариантный остаток Met147 (нумерация по астацину) (рис. 3).

Аминокислотная последовательность Met-поворота SI(L,V)MHY высококонсервативна, но остаток тирозина Tyr149 обнаруживается в этом повороте только для астациноподобных эндопептидаз (M12A) и серрализинов (M10B). Tyr149, отдавая протон, образует водородную связь с цинком и становится пятым цинковым лигандом. Этот уникальный *тирозиновый переключатель* играет специфическую роль, участвуя в стабилизации переходного состояния во время связывания фермента с субстратом [10]. С помощью сайт-направленного мутагенеза был получен мутантный астацин Tyr149Phe, который сохранял небольшую протеолитическую активность. Это свидетельствует о том, что наличие Tyr149 не является критическим для катализа, но его присутствие в молекуле увеличивает каталитическую активность в 40 раз, то есть Tyr149, вероятно, ответствен за связывание фермента с субстратом и/или стабилизацию переходного

<b>Семейство M12</b>																			
<i>Астацины (А)</i>																			
AST (речной рак)	92	93			96			99			102	103		106		108		110	
	H	E	L	M	H	A	I	G	F	Y	H	E	H	T	R	M	D	R	D
MEP $\alpha$ (мышь)	H	E	I	L	H	A	L	G	F	F	H	E	Q	S	R	T	D	R	D
MEP $\beta$ (крыса)	H	E	F	L	H	A	L	G	F	W	H	E	Q	S	R	A	D	R	D
BMP1 (человек)	H	E	L	G	H	V	V	G	F	W	H	E	H	T	R	P	D	R	D
SPAN (морской еж)	H	E	I	G	H	A	I	G	F	H	H	E	Q	S	R	P	D	R	D
<i>Репролизины (В)</i>																			
тримерелизин I	H	E	M	G	H	N	L	G	I	P	H	D	G	N	S	C	T	C	G
атролизин	H	E	L	G	H	N	L	G	M	E	H	D	G	K	D	C	L	R	G
<b>Семейство M10</b>																			
<i>Матриксины (А)</i>																			
коллагеназа (человек)	H	E	L	G	H	S	L	G	L	S	H	S	T	D	I	G	A	L	M
стромелизин-1 (человек)	H	E	I	G	H	S	L	G	L	F	H	S	A	N	T	E	A	L	M
<i>Серрализины (В)</i>																			
протеиназа <i>Serratia</i>	H	E	I	G	H	A	L	G	L	S	H	P	G	D	Y	N	A	G	E
протеиназа В <i>Erwinia</i>	H	E	I	G	H	A	L	G	L	S	H	P	A	E	Y	N	A	G	E
<b>Семейство M4</b>																			
термолизин	H	E	L	T	H	A	V	T	D	Y	T	A	G	L	V	Y	Q	N	E
эластаза <i>Pseudomonas</i>	H	E	V	S	H	G	F	T	E	Q	N	S	G	L	I	Y	R	G	Q
	142				146														

Рис. 4. Мотивы активного центра цинковых металлоэндопептидаз. Выделены консервативные аминокислоты активного центра

состояния во время каталитического акта [33, 68]. Участие Tug149 в субстратном связывании подтверждено при изучении абсорбционных спектров Cu-астацинового мутанта [47].

Наличие *тирозинового переключателя* является характерным признаком для астациноподобных и серрализиноподобных протеиназ. У эндопептидаз змеиного яда, адамализинов и матриксинов (M10) остаток Tug149 заменен на нефункциональный пролин (Pro), который не принимает участия в каталитическом акте. Эти эндопептидазы содержат цистеин в N-концевом пропептиде, который отщепляется при протеолитическом процессинге. Так, в пропептиде эндопептидазы змеиного яда Ht-e идентифицирована консервативная последовательность РКМСГVT, в которой тиоловая группа цистеина связывается с цинком активного центра зимогена (цистеиновый переключатель), предотвращая активацию фермента с помощью образования связи иона цинка с молекулой воды. При удалении пропептида снимается ингибирующее действие цистеина, возникает связь цинка с активированной молекулой воды (четвертый цинковый лиганд), необходимой для осуществления катализа [55].

При исследовании механизма катализа термолизина была выявлена важная роль иона цинка для поддержания координационной структуры в области активного центра белка. Активированная молекула воды, являясь четвертым цинковым лигандом, координирует ион цинка в области активного центра. Для выяснения взаимосвязи пространственной структуры Zn-астацина и каталитической активности фермента были проведены эксперименты по замене иона цинка на ионы двухвалентных металлов. Для этого сначала был получен апофермент, не содержащий иона цинка в активном центре,

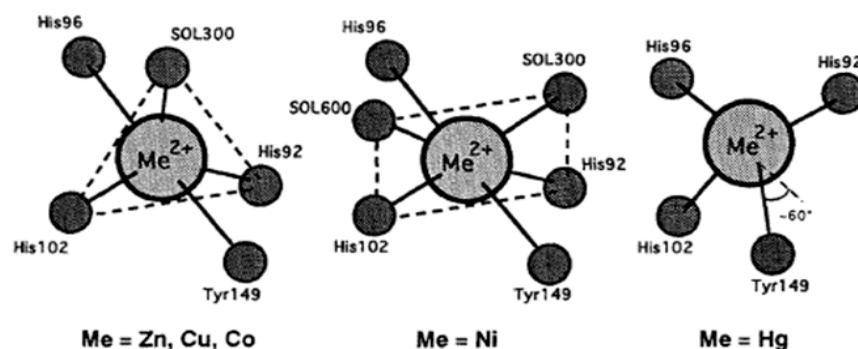


Рис. 5. Замещение иона цинка в активном центре астацина на ионы двухвалентных металлов [70]

протеолитическая активность которого по гидролизу *n*-нитроанилида отсутствовала. Затем в апофермент были введены ионы  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Hg}^{2+}$ . Активность Со-астацина составляла 140%, Cu-астацина – 37% по сравнению с Zn-астацином, активность которого была принята за 100%. Замена иона  $\text{Zn}^{2+}$  на ионы  $\text{Ni}^{2+}$  или  $\text{Hg}^{2+}$  приводила практически к полной инактивации фермента. Как показал спектральный анализ полученных кристаллов, в Cu- и Со-астацине обнаруживается пентавалентная координация ионов металла аналогично Zn-астацину, что способствует сохранению пространственной структуры активного центра и каталитической активности. Ион  $\text{Ni}^{2+}$  связывается с двумя молекулами воды (sol 300 и sol 600) в дополнение к четырем аминокислотным лигандам, а ион  $\text{Hg}^{2+}$  – только с четырьмя аминокислотными лигандами. Это приводит к искажению пространственной структуры активного центра фермента и, как следствие, к потере ферментативной активности (рис. 5) [69].

Выявленные различия в константах связывания субстрата с модифицированными ферментами ( $K_m$ ) показали, что ионы металла необходимы не только для связи с поляризованной каталитически важной молекулой воды, но и для участия в субстратном связывании благодаря своему влиянию на формирование геометрии активного центра.

Таким образом, установлена корреляция между пространственной геометрией активного центра и каталитической функцией астацина.

### Заключение

Итак, распределение цинкзависимых металлопротеиназ по кланам основывается на структуре каталитического центра. В настоящее время известны аминокислотные последовательности и пространственная структура многих ферментов клана метцинкинов, детально исследованы их физико-химические свойства, кинетические характеристики и субстратная специфичность. Ключевой особенностью ферментов этого клана является протяженный мотив активного центра, состоящий из 11 аминокислотных остатков, в отличие от термолизиноподобных ферментов, активный центр которых состоит из 5 аминокислотных остатков. Металлоэндопептидазы клана MB также схожи по организационной структуре каталитического центра, пространственной структуре молекулы белка, но различаются по физико-химическим свойствам, каталитическим

константам, субстратной специфичности, чувствительности к различным ингибиторам и механизмам активации и секреции. В первичной структуре метцинкинов имеется высококонсервативная область, называемая метиониновым поворотом, которая играет решающую роль в активации ферментов сerratилинового и астацинового подсемейств.

На основе анализа литературных данных можно сделать следующие выводы.

Классификация металлоэндопептидаз клана метцинкинов позволяет установить как основные различия между семействами этого клана, так и общие признаки, характерные для каждого из семейств.

В основе сходства пространственных структур и идентичности активных центров металлоэндопептидаз семейств M10 и M12 лежит общий для этих ферментов механизм связывания иона цинка для осуществления ферментативного катализа.

Активация метцинкинов осуществляется с помощью механизма тирозинового переключателя для сerratилиновых и астациноподобных энзимов и цистеинового переключателя для матриксинов и репролизинов/адамализинов.

Секреция метцинкинов осуществляется либо с помощью N-концевого сигнального пептида, либо с помощью высококонсервативной последовательности C-пептидазного домена.

Работа поддержана грантами РФФИ 09-04-99044 р-офи и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 гг. ГК № П344 от 7.05.2010, аналитической ведомственной целевой Федеральной программы РНП 2.11.1005.

### Summary

*N.P. Balaban, N.L. Rudakova, A.R. Sabirova, O.N. Ilyinskaya, M.R. Sharipova.* Metallo-endopeptidases of the Metzincins Clan: the Classification, Properties, Structure.

One of the most interesting and less known groups of zinc endopeptidases – the metzincins – is observed. These enzymes have the common active center motif and the Met-turn in amino acid sequence. Nevertheless they have different molecular structure, physical-chemical properties, and substrate specificity. Their activation and secretion mechanisms are different. The classification problems of metalloendopeptidases, properties and structural features of several metzincins subfamilies are discussed.

**Key words:** metzincins, matrixins, serrallysins, astacins, repropolysins, adamalysins.

### Литература

1. Enzyme nomenclature 1992: recommendation of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. – San Diego, 1992. – 862 p.
2. Rawlings N.D., Barrett A.J. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases // Meth. Enzymol. – 1995. – V. 248. – P. 183–228.
3. Handbook of proteolytic enzymes / Ed. by A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner. 1998. London: Acad. Press. – 1666 p.
4. Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. MEROPS: the peptidase database // Nucleic Acid Res. – 2006. – V. 34. – P. D270–D272.



5. *Matthews B.W.* Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases // *Accounts Chem. Res.* – 1988. – V. 21. – P. 333–340.
6. *Gomis-Rüth F.X.* Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases // *Mol. Biotechnol.* – 2003. – V. 24, No 2. – P. 157–202.
7. *Dalhammar G., Steiner H.* Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects // *Eur. J. Biochem.* – 1984. – V. 139, No 2. – P. 247–252.
8. *Lövgren A., Zhang M., Engström A., Dalhammar G., Landen R.* Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis* // *Mol. Microbiol.* – 1990. – V. 4, No 12. – P. 2137–2146.
9. *Mucha A., Cumiasso Ph., Kannan R., Beau F., Yiotakis A., Bassier P., Dive V.* Membrane type-1 matrix metalloprotease and stromelysin-3 cleave more efficiently synthetic substrates containing unusual amino acids in their P1' positions // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273, No 5. – P. 2763–2768.
10. *Bode W., Grams F., Reinemer P., Gomis-Rüth F-X., Baumann U., McKay D.B., Stöcker W.* The metzincins – superfamily of zinc-peptidases // *Advan. Exp. Med. Biol.* – 1996. – V. 389. – P. 1–11.
11. *Windsor J.L., Birkedal-Hansen H., Birkedal-Hansen B., Engler J.A.* An internal cysteine plays a role in the maintenance of the latency of human fibroblast collagenase // *Biochem.* – 1991. – V. 30. – P. 641–647.
12. *Cawston T.E., Barrett A.J.* A rapid and reproducible assay for collagenase using [ $^{14}\text{C}$ ] acetylated collagen // *Anal. Biochem.* – 1979. – V. 99, No 2. – P. 340–345.
13. *Reinemer P., Grams F., Huber R., Kleine T., Schnierer S., Pieper M., Tschesche H., Bode W.* Structural implications for the role of the N-terminus in the “superactivation” of collagenases. A crystallographic study // *FEBS Lett.* – 1994. – V. 338, No 2. – P. 227–233.
14. *Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H., Van Wart H.E.* Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a “cystein switch” mechanism for activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V. 87, No 1. – P. 364–368.
15. *Suzuki K., Enghild J.J., Morodomi T., Salvesen G., Nagase H.* Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) // *Biochem.* – 1990. – V. 29, No 44. – P. 10261–10270.
16. *Miller E.J., Harris E.D. jr., Chung E., Finch J.E., McCroskery P.A., Butler W.T.* Cleavage of type II and type III collagens with mammalian collagenase: site of cleavage and primary structure at the  $\text{NH}_2$ -terminal portion of the smaller fragment released from both collagens // *Biochem.* – 1976. – V. 15, No 4. – P. 787–792.
17. *Hasty K.A., Jeffrey J.J., Hibbs M.S., Welgus H.G.* The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262, No 21. – P. 10048–10052.
18. *Cawston T.E., Murphy G., Mercer E., Galloway W.A., Hazleman B.L., Reynolds J.J.* The interaction of purified rabbit bone collagenase with purified rabbit bone metalloproteinase inhibitor // *Biochem. J.* – 1983. – V. 211, No 2. – P. 313–318.
19. *Stetler-Stevenson W.G., Kruttsch H.C., Liotta L.A.* Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V. 264, No 29. – P. 17374–17378.
20. *Sottrup-Jensen L.*  $\alpha$ -Macroglobulins: structure, shape and mechanism of proteinase complex formation // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V. 264, No 20. – P. 11539–11542.
21. *Greenwald R.A.* Treatment of destructive arthritic disorders with MMP inhibitors. Potential role of tetracyclines // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1994. – V. 732. – P. 181–198.

22. Lauhio A., Konttinen Y.T., Salo T., Tschesche H., Nordström D., Lähdevirta J., Golub L.M., Sorsa T. The in vivo effect of doxycycline treatment on matrix metalloproteinases in reactive arthritis // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1994. – V. 732. – P. 431–432.
23. Morihara K., Tsuzuki H., Oka T. On the specificity of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase with synthetic peptides // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – V. 309, No 2. – P. 414–429.
24. Shibuya Y., Yamamoto T., Morimoto T., Nishino N., Kambara T., Okabe H. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – V. 1077, No 3. – P. 316–324.
25. Maeda H., Morichara K. Serralysin and related bacterial proteases // Methods Enzymol. – 1995. – V. 248. – P. 395–413.
26. Letoffe S., Delepelaire P., Wandersman C. Characterization of a protein inhibitor of extracellular proteases produced by *Erwinia chrysanthemi* // Mol. Microbiol. – 1989. – V. 3, No 1. – P. 79–86.
27. Nakahama K., Yoshimura K., Marumoto R., Kikuchi M., Lee I.S., Hase T., Matsubara H. Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene // Nucleic Acids Res. – 1986. – V. 14, No 14. – P. 5843–5855.
28. Braunagel S.C., Benedik M.J. The metalloprotease gene of *Serratia marcescens* strain SM6 // Mol. Gen. Genet. – 1990. – V. 222, No 2–3. – P. 446–451.
29. Baumann U. Crystal structure of the 50 kDa metalloprotease from *Serratia marcescens* // J. Mol. Biol. – 1994. – V. 242, No 3. – P. 244–251.
30. Hamada K., Hata Y., Katsuya Y., Hiramatsu H., Fujiwara T., Katsube Y. Crystal structure of *Serratia* protease, a zinc-dependent proteinase from *Serratia* sp. E-15, containing a beta-sheet coil motif at 2.0 Å resolution // J. Biochem. – 1996. – V. 119, No 5. – P. 844–851.
31. Miyatake H., Hata Y., Fujii T., Hamada K., Morihara K., Katsube Y. Crystal structure of the unliganded alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080 and its conformational changes upon ligand binding // J. Biochem. – 1995. – V. 118, No 3. – P. 474–479.
32. Baumann U., Bauer M., Letoffe S., Delepelaire P., Wandersman C. Crystal structure of a complex between *Serratia marcescens* metalloprotease and an inhibitor from *Erwinia chrysanthemi* // J. Mol. Biol. – 1995. – V. 248, No 3. – P. 653–661.
33. Grams F., Dive V., Yiotakis A., Yiallouros I., Vassiliou S., Zwilling R., Bode W., Stöcker W. Structure of astacin with a transition-state analog inhibitor // Nat. Struct. Biol. – 1996. – V. 3, No 8. – P. 671–675.
34. Pfeleiderer G., Zwilling R., Sonneborn H.H. Zur evolution der endopeptidasen III: eine protease vom molekulargewicht 11000 und eine trypsinähnliche fraktion aus *Astacus fluviatilis* // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. – 1967. – V. 348, No 10. – P. 1319–1331.
35. Dumermuth E., Sterchi E.E., Weiping J., Wolz R.L., Bond J.S., Flannery A., Beynon R.J. The astacin family of metalloendopeptidases // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266, No 32. – P. 21381–21385.
36. Barrett A.J., Rawlings N.D. Types and families of endopeptidases // Biochem. Soc. Trans. – 1991. – V. 19, No 3. – P. 707–715.
37. Plummer T.H. jr., Tarentino A.L., Hauer C.R. Novel, specific O-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270, No 22. – P. 13192–13196.
38. Gomis-Rüth F.X., Stöcker W., Huber R., Zurilling R., Bode W. Refined 1.8 Å X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus* L. Structure determination, refinement, molecular structure and comparison with thermolysin // J. Mol. Biol. – 1993. – V. 229, No 4. – P. 945–968.

39. Jiang W., Gorbea C.M., Flannery A.V., Beynon R.J., Grant G.A., Bond J.S. The alpha subunit of meprin A. Molecular cloning and sequencing, differential expression in inbred mouse strains, and evidence for divergent evolution of the alpha and beta subunits // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267, No 13. – P. 9185–9193.
40. Gorbea C.M., Marchand P., Jiang W., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Bond J.S. Cloning, expression and chromosomal localization of the mouse meprin beta subunit // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268, No 28. – P. 21035–21043.
41. Yasumasu S., Iuchi I., Yamagami K. Medaka hatching enzyme consists of two kinds of proteases which act cooperatively // *Zool. Sci.* – 1988. – V. 5. – P. 191–195.
42. Yasumasu S., Iuchi I., Yamagami K. Purification and partial characterization of high choriolytic enzyme (HCE), a component of the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes* // *J. Biochem.* – 1989. – V. 105, No 2. – P. 204–211.
43. Kessler E., Adar R., Goldberg B., Niece R. Partial purification and characterization of a procollagen C-proteinase from the culture medium of mouse fibroblasts // *Collagen Rel. Res.* – 1986. – V. 6, No 3. – P. 249–266.
44. Hojima Y., van der Rest M., Prockop D.G. Type 1 procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization // *J. Biol. Chem.* – 1985. – V. 260, No 29. – P. 15996–16003.
45. Kessler E., Takahara K., Biniaminov L., Brusel M., Greenspan D.S. Bone morphogenetic protein-1: the type 1 procollagen C-proteinase // *Science.* – 1996. – V. 271, No 5247. – P. 360–362.
46. Yiallourous I., Vassiliou S., Yiotakis A., Zwilling R., Stöcker W., Dive V. Phosphinic peptides, the first potent inhibitors of astacin, behave as extremely slow-binding inhibitors // *Biochem. J.* – 1998. – V. 331, No 2. – P. 375–379.
47. Yiallourous I., Berkhoff E.G., Stöcker W. The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 484, No 3. – P. 224–228.
48. Jiang W., Bond J.S. Families of metalloendopeptidases and their relationships // *FEBS Lett.* – 1992. – V. 312, No 2–3. – P. 110–114.
49. Titani K., Torff H.-J., Hormel S., Kumar S., Walsh K.A., Rödl J., Neurath H., Zwilling R. Amino acid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis* // *Biochem.* – 1987. – V. 26, No 1. – P. 222–226.
50. Stöcker W., Sauer B., Zwilling R. Kinetics of nitroanilide cleavage by astacin // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* – 1991. – V. 372, No 6. – P. 385–392.
51. Krauhs E., Dörsam H., Little M., Zwilling R., Ponstingl H. A protease from *Astacus fluviatilis* as an aid in protein sequencing // *Anal. Biochem.* – 1982. – V. 119, No 1. – P. 153–157.
52. Stöcker W., Wolz R.L., Zwilling R., Strydom D.J., Auld D.S. Astacus protease, a zinc metalloenzyme // *Biochem.* – 1988. – V. 27, No 14. – P. 5026–5032.
53. Stöcker W., Ng M., Auld D.S. Fluorescent oligopeptide substrates for kinetic characterization of the specificity of *Astacus* protease // *Biochem.* – 1990. – V. 29, No 45. – P. 10418–10425.
54. Stöcker W., Zwilling R. Astacin // *Methods Enzymol.* – 1995. – V. 248. – P. 305–325.
55. Grams F., Huber R., Kress L.F., Moroder L., Bode W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 335, No 1. – P. 76–80.
56. Beynon R.J., Shannon J.D., Bond J.S. Purification and characterization of a metalloendopeptidase from mouse kidney // *Biochem. J.* – 1981. – V. 199, No 3. – P. 591–598.

57. *Gorbea C.M., Flannery A.V., Bond J.S.* Homo- and heterotetrameric forms of the membrane-bound metalloendopeptidases meprin A and B // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1991. – V. 290, No 2. – P. 549–553.
58. *Bond J.S., Beynon R.J.* The astacin family of metalloendopeptidases // *Protein Sci.* – 1995. – V. 4, No 7. – P. 1247–1261.
59. *Tarentino A.L., Quinones G., Grimwood B.G., Hauer C.R., Plummer T.H. jr.* Molecular cloning and sequence analysis of flavastacin: an O-glycosylated prokaryotic zinc metalloendopeptidase // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1995. – V. 319, No 1. – P. 281–285.
60. *Hite L.A., Jia L.-G., Bjarnason J.B., Fox J.W.* cDNA sequence for four snake venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – V. 308, No 1. – P. 182–191.
61. *Takeya H., Nishida S., Miyata T., Kawada S.-L., Saisaka Y., Morita T., Iwanaga S.* Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X) // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267, No 20. – P. 14109–14117.
62. *Chang C., Werb Z.* The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis // *Trends Cell Biol.* – 2001. – V. 11, No 11. – P. S37–S43.
63. *Seals D.F., Courtneidge S.A.* The ADAM<sub>s</sub> family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions // *Genes Dev.* – 2003. – V. 17, No 1. – P. 7–30.
64. *Bode W., Gomis-Rüth F.-X., Stöcker W.* Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environment (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins” // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 331, No 1–2. – P. 134–140.
65. *Bode W., Gomis-Rüth F.-X., Huber R., Zwilling R., Stöcker W.* Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases // *Nature.* – 1992. – V. 358, No 6382. – P. 164–167.
66. *Yiallourou I., Kappelhoff R., Schilling O., Wegmann F., Helms M.W., Auge A., Brachtendorf G., Berkhoff E.G., Beermann B., Hinz H.-J., König S., Peter-Katalinic J., Stöcker W.* Activation mechanism of pro-astacin: role of the propeptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 342, No 2. – P. 237–246.
67. *Stöcker W., Bode W.* Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1995. – V. 5, No 3. – P. 383–390.
68. *Hede T., Baumann U.* Protease C of *Erwinia chrysanthemi*: the crystal structure and role of amino acids Y228 and E189 // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V. 314, No 2. – P. 187–193.
69. *Gomis-Rüth F.X., Kress L.F., Kellermann J., Mayr I., Lee X., Huber R., Bode W.* Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin // *J. Mol. Biol.* – 1994. – V. 239, No 4. – P. 513–544.
70. *Gomis-Rüth F.X., Grams F., Yiallourou I., Nar H., Küsthardt U., Zwilling R., Bode W., Stöcker W.* Crystal structures, spectroscopic features, and catalytic properties of cobalt (II), copper (II), nickel (II), and mercury (II) derivatives of the zinc endopeptidase astacin. A correlation of structure and proteolytic activity // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269, No 25. – P. 17111–17117.

Поступила в редакцию  
15.12.09

**Балабан Нэлли Павловна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *NellyBalaban@yandex.ru*

**Рудакова Наталья Леонидовна** – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *puphen@rambler.ru*

**Сабирова Альбина Рушановна** – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *albina-12@mail.ru*

**Ильинская Ольга Николаевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Olga.Ilinskaya@ksu.ru*

**Шарипова Маргарита Рашидовна** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Margarita.Sharipova@ksu.ru*