

УДК 577.

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И СВОЙСТВА МЕТЦИНКИНОВ

### Обзор

© 2012 г. Н.П. Балабан, Н.Л. Рудакова\*, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
420008 Казань, ул. Кремлевская, 18; факс: (843)292-4448,  
электронная почта: public.mail@ksu.ru,  
natalialrudakova@gmail.com

Поступила в редакцию 23.01.11  
После доработки 21.06.11

Рассмотрены сведения об основных семействах эндопептидаз клана метцинкинов цинкзависимых металлопротеиназ у организмов широкого эволюционного ряда от бактерий до млекопитающих. Приведены данные о классификации, физико-химических свойствах, субстратной специфичности, особенностях структуры этой группы ферментов. Обсуждаются механизмы активации метцинкинов, роль этих белков в организмах и их участие в различных физиологических процессах.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** металлопротеиназы, метцинкины, астацины, адамализины/репролизины, матриксин, серрализины.

Протеолитические ферменты представлены в геномах организмов широкого эволюционного ряда от прокариот до высших эукариот. Будучи стратегическими ферментами клеток, они играют ведущую роль в жизнедеятельности организмов, о чем свидетельствует тот факт, что в геноме человека идентифицировано более 640 генов, кодирующих пептидазы или их гомологи [1]. Эти ферменты функционируют в клетках не только как ферменты деградации, но участвуют в регуляторных процессах, нарушение которых приводит к возникновению и развитию патологии [2]. Изучение физико-химических и энзиматических свойств этих ферментов, их структурно-функциональной роли *in vivo* позволяет систематизировать эти белки, определить их практическую значимость и перспективы использования.

Протеолитические ферменты (КФ 3.4) по механизму катализа принято классифицировать на шесть классов: аспартатные, глутаматные, металлопротеиназы, цистеиновые, сериновые и треониновые, среди которых металлопротеиназы (эндопептидазы, металлоэндопептидазы) представляют наиболее многочисленный и разнообразный класс ферментов (КФ 3.4.24) [3, 4]. По этой классификации все цинкзависимые металлопротеиназы с мотивом активного центра

НEXXH распределяются по семействам от M1 до M13 в зависимости от структурных особенностей молекулы белка, каталитических и энзиматических свойств ферментов и объединяются в клан MA. Ферменты, имеющие другой мотив активного центра, относятся к другим семействам [5, 6]. Многие цинкзависимые металлоэндопептидазы содержат ионы кальция, играющие важную роль в стабилизации пространственной структуры фермента. Эти ферменты обнаружены у человека и животных, они продуцируются бактериями, актиномицетами и микроскопическими грибами.

В 2003 г. цинкзависимые металлопептидазы были разделены на две большие группы: цинкины, обладающие консервативной последовательностью активного центра НEXXH с двумя гистидинами в качестве цинковых лигандов и глутаматом в качестве каталитического основания, и инверцинкины, имеющие обратную последовательность аминокислотных остатков активного центра НХХЕН (рис. 1) [2, 7]. Предложенная схема разделения протеиназ в зависимости от положения и контекста цинковых лигандов согласуется с общепринятой классификацией, представленной в базе данных пептидаз MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>).

В зависимости от природы и положения третьего цинкового лиганда цинкины, в свою очередь, разделяются на три клана: глущинки-

\* Адресат для корреспонденции.

ны, аспинкины и метцинкины (рис. 1) [7]. Типичным представителем глущинкинов является термолизин, имеющий второй консенсусный мотив **NEXXSD**, расположенный близко от C-конца мотива **HEXXH** активного центра, и содержащий остаток глутамата в качестве третьего цинкового лиганда. Структура активного центра ферментов клана аспинкинов похожа на такую глущинкинов, в которой остаток глутамата второго мотива заменен на аспарат, в связи с чем высказано предположение, что аспинкины могут быть субкланом глущинкинов. Среди цинкинов самым представительным является клан метцинкинов, содержащий продленный мотив активного центра **HEXXHXXGXXH/D** с тремя гистидинами в качестве цинковых лигандов [2, 7]. Уникальным признаком этого клана является наличие в структуре молекулы Met-поворота с консервативным метионином, локализованным в 1,4-β-петле, который используется для корректной классификации этой группы ферментов. Соответствующие эндонуклеазы получили название метцинкины, благодаря присутствию в этой последовательности консервативного остатка метионина.

### ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ КЛАНА МЕТЦИНКИНОВ

Клан метцинкинов (MEROPS клан MA(M)) включает следующие семейства эндопептидаз: астацины, серрализины, матриксины, адамализины/репролизины, снапализины, лейшмано-

лизины и другие с общими особенностями структуры, указанными выше (рис. 1). Достаточно хорошо изучены физико-химические свойства этих ферментов, субстратная специфичность, структурные особенности каталитического домена и мультидоменная структура белков. Кроме указанных семейств, обнаружены эндопептидазы с неизвестной пока пространственной структурой. К ним относятся фрагилизины (MEROPS M10C), паппализины (MEROPS M46), гаметолизины (MEROPS M11), тюрингилизины (MEROPS M6), архаметцинкины, коелизин, хеликолизины и другие [8]. Биохимические свойства, субстратная специфичность, субстраты и ингибиторы этих протеиназ изучены довольно хорошо. Эти ферменты также содержат продленный цинксвязанный мотив активного центра с консервативными аминокислотными остатками, характерными для метцинкинов, и последовательность Met-поворота с инвариантным метионином. На этом основании они отнесены к клану метцинкинов и включены в базу данных пептидаз MEROPS.

**Семейство астацинов.** Астацин, выделенный в 1967 г. из пищеварительного тракта речного рака *Astacus astacus* L., стал первым изученным ферментом семейства астацинов, которые встречаются, в основном, у представителей животного мира [9]. До сих пор эти ферменты не обнаружены у растений и грибов, но один астациноподобный фермент (флавастацин) обнаружен у грамотрицательных бактерий [10]. К семейству астациноподобных металлоэндопептидаз относятся секретируемые и мембраносвязанные меприны α и β человека и грызунов,

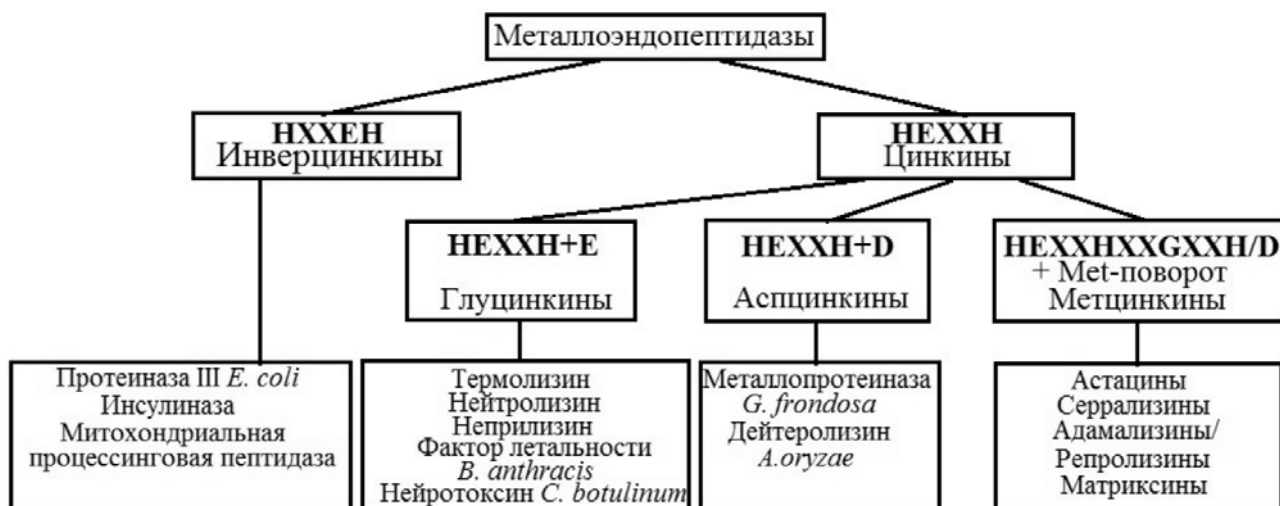


Рис. 1. Схема классификации металлоэндопептидаз на основе структуры активного центра

проколлагеновая С-эндопептидаза мышей, костный морфогенетический белок 1 (BMP1) человека, хориолизины L и H лососевых рыб и другие эндопептидазы [11–15].

Астациноподобные эндопептидазы синтезируются в виде неактивных предшественников с сигнальным пептидом и пропептидом на N-конце молекулы. При протеолитическом удалении N-концевого пропептида происходит активирование зимогена по механизму «тирозинового переключателя», который отличается от механизма «цистеинового переключателя» матриксинов и адамализинов [16].

Зрелая молекула астацина (MEROPS M12.001) представляет собой протеазный домен, состоящий из 200 аминокислотных остатков (а.о.) с молекулярной массой 20,3 кДа с характерным продленным мотивом активного центра и консервативной структурой Met-поворота SXMNY [17]. Астацин стабилен в нейтральных и слабощелочных условиях, но при pH ниже 4,0 белок необратимо инактивируется. Оптимум pH действия фермента лежит в интервале pH 7,5–9,5 и частично зависит от субстрата. Субстратами астацина являются казеин, азоказеин, желатин, коллаген, В-цепь окисленного инсулина, при гидролизе которых фермент проявляет предпочтение к аминокислотным остаткам с короткими боковыми цепями (Ala, Thr, Ser, Gly) в положении P1', к пролину в положении P2 и P3 и гидрофобным остаткам в положении P3' и P4'. Синтетическими субстратами для астациноподобных эндопептидаз служат нитроамидоподобные субстраты длиной 5–7 а.о. и флуоресцентные субстраты. Астацин и астациноподобные эндопептидазы не чувствительны к ингибиторам сериновых, цистеиновых и аспартатных протеиназ, фосфорамидону (ингибитору термолизиноподобных протеиназ) и тканевым ингибиторам металлопротеаз (TIMP<sub>s</sub>). Активность этих ферментов подавляется 1,10-фенантролином и ЭДТА, но ингибирующее действие 1–10 мМ ЭДТА проявляется при больших сроках инкубации [18, 19].

Кроме астацина, изучены свойства и структура многих астациноподобных протеиназ (меприны, BMP1, TLD-толлоидная эндопептидаза из *Drosophila melanogaster* и другие). Эти белки, в отличие от простой структуры астацина речного рака, имеют мультидоменную структуру, но протеазный домен схож со структурой астацина. Дополнительные непротеазные домены (CUB-домен, EGF-домен и др.) участвуют в мультимеризации, но не являются необходимыми для катализа и секреции. Они способствуют клеточной адгезии, обеспечивают белок-белковое взаимодействие и/или связывание с ионами каль-

ция, формируя жесткие структуры на отдельных участках белковой молекулы, что влияет на структурные и функциональные особенности этих ферментов [7, 18, 19].

В 1995 г. из культуральной жидкости грамотрицательных бактерий *Flavobacterium meningosepticum* выделена астациноподобная эндопептидаза – флавастацин (MEROPS M12.066) [10]. Ген флавастацина клонирован, секвенирован и изучена его экспрессия [20]. Молекулярная масса фермента 38,8 кДа, в молекуле белка отсутствуют цистеиновые остатки, N-концевая пропептидная последовательность и сигнальный пептид находятся на N-конце протеазного домена. Аминокислотная последовательность протеазного домена на 20% идентична с астацином и на 24–29% – с меприном. Протеазный домен флавастацина имеет высококонсервативный мотив активного центра HEIMHSMGIMHE и метионинный поворот SVMMY. Наличие глутамата, расположенного после третьего цинкового лиганда гистидина и остатка тирозина в Met-повороте, позволили отнести его к семейству астациноподобных эндопептидаз [19]. Обнаружение микробной астациноподобной эндопептидазы дало возможность предположить существование общего предкового гена этого белка, существовавшего до начала дивергенции этого семейства ферментов.

Изучены некоторые свойства гомогенного препарата флавастацина. Это – фермент с оптимумом действия в нейтральной области pH, осуществляющий ограниченный протеолиз пептидов по остаткам аспарагиновой кислоты в P1' положении, подтвержденный гидролизом серии синтетических пептидов типа FA-Leu-Ala-Asp-Ala-Ser-NH<sub>2</sub>. Гидролиз этих же субстратов с остатком Glu вместо Asp осуществлялся только при высоких концентрациях фермента и длительном времени инкубации.

Астациноподобные эндопептидазы участвуют *in vivo* в процессах развития, включая дифференцировку зародыша и морфогенез, ремоделирование и дифференцировку тканей и содействуют образованию хрящевой ткани и костей, а также биосинтезу коллагена [7]. Большая группа астациноподобных протеиназ (протеиназа BMP1 – костный морфогенетический белок 1 и коллоидные эндопептидазы *Drosophila melanogaster*) выполняет ключевую роль в формировании и сборке экстрацеллюлярного матрикса [21]. Группа ферментов, называемых hatching энзимами, ответственна за деградацию эмбриональной пленки при вылуплении эмбриона из яйца ракообразных, рыб, лягушек, птиц и животных [2]. Функция мепринов связана с развитием организмов. Уровень кишечного меприна  $\alpha$  у мыши

в период вскармливания выше, чем меприна  $\beta$ . Окончание вскармливания и переход на твердую пищу характеризуется понижением уровня меприна  $\alpha$  и повышением уровня меприна  $\beta$ . Уровень меприна катастрофически падает при возникновении и развитии таких болезней человека, как гидронефрит, нефропатия, нефрит, а также при почечной трансплантации, ведущих к гибели клеток ткани, и может служить диагностическим тестом при этих заболеваниях [2].

**Семейство серрализинов (MEROPS M10B).** Включает бактериальные ферменты: серрализин *Serratia* (MEROPS M10.051), аеругинолизин *Pseudomonas* (MEROPS M10.056), мирабилизин *Proteus* (MEROPS M10.057), эндопептидазы А, В, С *Erwinia* (MEROPS M10.052, M10.53, M10.054 соответственно), эндопептидазу PrtA *Photobacterium* (MEROPS M10.063) и другие эндопептидазы. Название ферментов в большинстве случаев формируется из названия вида микроорганизмов и названия фермента, например, *Serratia* и *lysin*. Представители этого семейства белков имеют похожие физико-химические свойства, структурную организацию, механизмы секреции белков и активации протеазного домена.

Серрализины часто называют щелочными металлопротеиназами, так как они активны в широком диапазоне pH от 6,0 до 10,0 с оптимумом pH 8,0. Субстратами серрализинов являются казеин, азоказеин, желатин и его производные. Синтетические *p*-нитроанилиды длиной 6–8 остатков являются также хорошими субстратами для этих ферментов. Серрализин и аеругинолизин гидролизуют эти субстраты с предпочтением к остаткам Gly, Ala и Arg, а также к гидрофобным остаткам в P1', P2 и P2' положении [22]. Эндопептидаза PrtA патогенного насекомого *Photobacterium luminescens* гидролизует как синтетические гексапептиды, так и природные субстраты по связям Val, Ala и Leu. Природными субстратами для этой протеиназы являются А и В-цепи окисленного инсулина, IgA и IgG, защитные и цитоскелетные белки, компоненты системы комплемента, экстрацеллюлярные матриксные белки, причем скорость гидролиза этих субстратов эндопептидазой PrtA выше, чем другими серрализинами [23].

Активность серрализинов подавляется ЭДТА, 1,10-фенантролином, пептидилмеркаптоанилидами, белковыми ингибиторами (10–11 кДа), выделенными из тех же штаммов *Serratia*, *Pseudomonas* и *Erwinia* [7, 24]. Ферменты не ингибируются диизопропилфторфосфатом и фосфорамидоном.

Молекулярная масса ферментов семейства серрализинов 49–55 кДа, рI 4,1–4,5, первичные

структуры протеазных доменов на 50–55% идентичны между собой. Известны третичные структуры серрализинов *Serratia* sp. SM6 и E-15, аеругинолизина *Pseudomonas aeruginosa*, мирабилизина *Proteus mirabilis* и протеиназы *Erwinia chrysanthemi* [25–28]. Ферменты имеют продленный мотив активного центра с тремя гистидиновыми лигандами и консервативный метиониновый поворот SXXMX, содержащий остаток тирозина. При активации серрализинов тирозин становится пятым цинковым лигандом и включается в субстратное связывание и/или в стабилизацию переходного состояния во время катализа. Серрализины секретируются как аутоактивирующиеся зимогены с пропептидом в 9–20 а.о. на N-конце протеазного домена.

Структурные домены серрализинов (N- и C-домены) содержат каждый ~220 а.о. [7]. N-домен схож с протеазным доменом астацина и нуждается в корректном фолдинге. Важную роль в связывании ионов кальция играет аминокислотная последовательность Gly-Gly-Хаа-Gly-Asn-Asp, расположенная в C-концевом домене. C-домен необходим для секреции фермента, так как серрализины синтезируются без сигнального пептида [7]. На C-конце этого домена содержится от 20 до 50 а.о., действующих как сигнал для транслокации, в котором консервативный C-концевой мотив DXXX (X – любая гидрофобная аминокислота) необходим для инициации секреции. Для серрализинов и мирабилизинов эта последовательность – DFIV, которая не удаляется протеолитически при секреции серрализинов в среду [26].

Полагают, что одна из функций серрализинов связана с фактором вирулентности, вызывающим различные инфекции у новорожденных и после хирургических операций. Эти ферменты участвуют в возникновении таких заболеваний как эндокардит, пиелонефрит, дерматит, сепсис, пневмония, приводят к деградации мягких тканей и мембран кишечных эпителиальных клеток, а также участвуют в развитии заболеваний, похожих на заболевания при бактериальной инфекции: воспалительные процессы, столбняк, ботулизм, газовая гангрена, бактериальный менингит, сибирская язва [7, 8]. Обладая вирулентным потенциалом, серрализины, с одной стороны, могут действовать, подобно плазмин(оген)у как противосвертывающий фактор крови, в связи с чем могли бы использоваться для лечения тромбозов. С другой стороны, эти ферменты могут инактивировать защитные белки (иммуноглобулины, гамма-интерферон), белковые ингибиторы, лизоцим, трансферрин, белки комплемента, что приводит к истощению защитных сил хозяина [29]. Эти свойства серрализинов

затрудняют разработку лекарственных препаратов на их основе.

**Семейство матриксных металлопептидаз** (матриксины) (MEROPS M10A) — это секретируемые или мембраносвязанные эндопептидазы, обнаруженные у высших млекопитающих, рыб, амфибий, насекомых, растений, прокариот и вирусов [8]. Эти ферменты разделены на три группы: истинные коллагеназы, способные вести ограниченный протеолиз тройной цепи коллагена; желатиназы, гидролизующие коллаген и желатин; стромелизины с выраженной протеолитической активностью и деградирующие протеогликаны [7]. Выделенные из тканей разных животных эти эндопептидазы имеют разные названия, поэтому было введено общее обозначение — MMP<sub>s</sub> (матриксные металлопротеиназы). Внутритканевая коллагеназа 1 (MMP-1, MEROPS M10.001), нейтрофильная коллагеназа 2 (MMP-8, MEROPS M10.002), коллагеназы 3 (MMP-13, MEROPS M10.015) и 4 (MMP-18, MEROPS M10.018), желатиназа А (MEROPS M10.033) и В (MEROPS M10.034), стромелизины 1, 2 и 3 участвуют в деградации экстрацеллюлярных матриксных белков.

В протеазном домене матриксинов идентифицированы структура активного центра с тремя гистидиновыми остатками для взаимодействия с каталитическим ионом цинка и Met-поворот с высококонсервативной последовательностью AL(V)MYR.

Среди матриксинов самым маленьким белком является матрилизин, остальные ферменты — это мозаичные белки, имеющие дополнительные домены на С-конце протеазного домена. Матриксины синтезируются в виде предшественников с сигнальным пептидом из 20 а.о. и пропептидом, содержащим до 80 а.о., расположенными на N-конце молекулы фермента. Протеазный домен длиной в 160–170 а.о. содержит ионы кальция и каталитически активного цинка. Активирование ферментов происходит по механизму «цистеинового переключателя» при протеолитическом отщеплении пропоследовательности трипсином, плазмином и другими белками [7, 18]. Сравнение аминокислотных последовательностей протеазных доменов разных матриксинов показало существенную гомологию, свидетельствующую, что эти ферменты эволюционировали от общего предка [30].

В протеазном домене некоторых коллагеназ (MMP-1, MMP-8) отсутствуют дисульфидные связи и обнаружены несколько ионов кальция, необходимых для стабилизации этого домена, а также дополнительный не каталитический ион цинка, который не участвует в стабилизации структуры и может быть заменен на ионы других металлов [8, 18].

Коллагеназы MMP-1 и MMP-8 осуществляют ограниченный протеолиз коллагенов типа I, II и III, желатинов, протеогликанов и др. [31]. Среди синтетических субстратов оптимальным является октапептид Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln. Ферменты гидролизуют в синтетических субстратах связи, если в положении P1 находится Ala, в положении P1' — Tug или Phe. Присутствие в реакционной смеси с нейтральным рН ионов цинка (0,5 мМ), кальция (5 мМ), NaCl (100 мМ) значительно увеличивает протеолитическую активность матриксинов. Ингибиторами этих ферментов являются α<sub>2</sub>-макроглобулин, некоторые антибиотики, хелатирующие агенты, а также тканевые ингибиторы, избирательность которых низка [7].

Матриксные металлопротеиназы способны разрушать структурные компоненты экстрацеллюлярного матрикса и осуществлять внутриклеточную регуляцию различных патологических процессов. Они способствуют метастазированию раковых клеток путем уничтожения матриксных барьеров, обострению хронических заболеваний, разрушению коллагена при ревматоидном артрите, развитию язвенной болезни роговицы глаза, воспалительных процессов, в том числе кишечных, атеросклеротических, менингита, болезни Альцгеймера, активации различных факторов роста и моделированию сигналов хемотаксиса [29].

**Семейство адамализинов/репролизинов** (MEROPS M12B) образуют две группы ферментов: адамализины и репролизины. Репролизины выделены из яда различных змей и называются металлопротеиназами SVMP<sub>s</sub> (snake venom metalloproteinases). В настоящее время обнаружены более 200 видов змеиного яда, содержащих 50–60 белков и пептидов с различными структурами и функциями. В состав яда входят нейротоксины, кардиотоксины, различные факторы роста, дезинтегрины, брадикинин—потенциальные белки, ферменты (протеазы, фосфолипазы, фосфодиэстеразы, холинэстеразы, аминотрансферазы, каталаза, АТФаза, гиалуронидаза и др.) и белковые ингибиторы. Многие репролизины являются изоэнзимами, выделенными из одного вида змей. Так, из 13 репролизинов яда *Crotalus atrax* половина является изоэнзимами, у которых аминокислотные последовательности идентичны на 98%.

Репролизины — мультидоменные белки, на С-конце которых содержится большой набор непептидазных доменов [32]. Все репролизины разделяются на четыре класса по количеству доменов и молекулярной массе [33, 34].

Класс 1. Репролизины с молекулярной массой 20–30 кДа, зрелая форма которых состоит

из одного протеазного домена. Представители класса – адамализин II, атролизины В, С, акутолизины А, В, С.

Класс 2. Репролизины с молекулярной массой 30–50 кДа, имеющие кроме протеазного домена дезинтегриновый домен (атролизин Е, билитоксин, акутолизин D) для взаимодействия с рецепторами клеток.

Класс 3. Репролизины и большинство геморрагических токсинов с молекулярной массой 50–80 кДа, содержащие протеазный домен, дезинтегриновый домен и цистеин-содержащий домен (атролизин А).

Класс 4. Репролизины с молекулярной массой 80–100 кДа, содержащие четвертый лектиноподобный домен (металлопротеиназа из яда *Vipera russelli*).

Некоторые ферменты класса 1 можно назвать геморрагическими токсинами, они делятся на два подкласса: подкласс 1А с выраженной геморрагической активностью и подкласс 1Б со слабой или без геморрагической активности. Так, адамализин II *Crotalus adamanteus* не обладает геморрагической активностью, атролизин С имеет слабую геморрагическую активность и оба относятся к подклассу 1Б, в то время как акутолизин А обладает высокой геморрагической активностью и называется геморрагической протеиназой. Оптимальная протеолитическая активность этих ферментов проявляется в слабощелочных условиях (рН 7,5) и в 100 раз выше, чем при рН 5,0. Хелатирующие агенты ингибируют протеолитическую и геморрагическую активности [32]. Кроме каталитически важного цинка у этих ферментов имеется ион кальция на поверхности молекулы, который связывается с атомами кислорода, способствуя структурной стабильности каталитического домена [33]. Репролизины синтезируются и хранятся в ядовитой железе змеи как неактивные зимогены. Ферменты имеют три остатка цистеина, один из которых участвует в активации этих эндопептидаз по механизму «цистеинового переключателя» [34]. Субстратная специфичность репролизинов определяется по гидролизу казеина, В-цепи инсулина, фибриногена. Эти ферменты осуществляют ограниченный протеолиз природного субстрата по одной-двум пептидным связям. Так, тримерелизины 1 и 2 предпочтительно расщепляют  $\alpha$ -цепь фибриногена по связи Pro516-Met517, металлопротеиназа из яда кобры *Naja* при длительной инкубации осуществляет ограниченный протеолиз  $\alpha$ -цепи человеческого фибриногена по двум связям Lys412-Leu413 и Phe501-Asp502 [32].

Репролизины ответственны, главным образом, за геморрагические эффекты и тканевые некрозы при змеиных укусах. Некоторые репро-

лизины с высокой геморрагической активностью (геморрагические токсины) способны разрушать мембраны клеток капилляров, вызывая локальное кровоизлияние, приводят к деструкции компонентов экстрацеллюлярного матрикса у жертв и ответственны за клеточную адгезию [32].

В группу адамализинов входит большое количество эндопептидаз, выделенных из репродуктивных тканей млекопитающих, в основном, мышей, крыс, кроликов и человека. Их третичная структура, как и репролизинов, представляет собой эллипсоидную форму. Они характеризуются наличием большого набора дополнительных доменов, находящихся на С-конце протеазного домена (уникальный дезинтегриновый домен, отвечающий за связывание с интегрином или другими рецепторами клеточной поверхности, цистеин-богатый домен, EGF-подобный домен и другие).

Сигнальная и пропоследовательность находятся на N-конце адамализинов. Функция продомена состоит в поддержании фермента в неактивном состоянии *in vivo*. Протеолитическое отщепление пропептида активирует фермент, в некоторых случаях эти ферменты могут подвергаться аутокаталитической активации. Установлено, что продомен может выполнять функцию шаперона для корректного фолдинга протеазного домена и структурирования активного центра [35].

Физико-химические свойства ферментов хорошо изучены. Оптимальная активность адамализинов проявляется в широком диапазоне рН от 7,0 до 9,0. Субстратами являются фибронектин, ламинин, желатин, коллаген, ингибиторами – хелатирующие агенты, неселективные пептидные гидроксаматы и тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP<sub>s</sub>). Активация адамализинов происходит по механизму «цистеинового переключателя», но может быть связана с конформационными изменениями в продоме [18, 35].

Адамализины участвуют в процессах оплодотворения, нейрогенезе, протеолизе клеточных поверхностных белков и других физиологических процессах. Наиболее изучен ADAM-17, который регулирует активность  $\alpha$ -фактора опухолевого некроза. Адамализины способны расщеплять и ремоделировать структуру внеклеточного матрикса и факторы роста, ассоциированные с матриксом, обуславливая такие физиологические процессы, как миграция и рост [36, 37]. Локализация адамализинов различна. Установлено, что одна изоформа эндопептидазы ADAM-12 – мембраносвязанный белок, другая – секретиремый. Также показано, что одна изоформа эндопептидазы ADAM-28 человека экспрессируется в селезенке, вторая, мембраносвязанная форма, специфична для лимфатических узлов [35].

Из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* нами выделена новая бактериальная адамализиноподобная металлопротеиназа *B. intermedius* 3–19 (MprBi). Ген белка клонирован, последовательность нуклеотидов установлена и зарегистрирована в Международном банке генов под номером AN EU678894. Анализ последовательности гена *mprBi* позволил установить присутствие сигнального пептида на *N*-конце молекулы белка, что свидетельствует о внеклеточной локализации зрелого белка [38]. Фермент очищен до гомогенного состояния и определена первичная структура белка MALDI-TOF спектрометрией [39]. С помощью метода Эдмана установлена *N*-концевая последовательность зрелой молекулы фермента – ASTGSQKVTV, которая показала, что *N*-концевой аминокислотой зрелой молекулы является аланин. В аминокислотной последовательности MprBi идентифицирован фрагмент 126HEYGH-NFGLPH136, в котором расположены три консервативных гистидиновых остатка His126, His130 и His136, остаток глутамата E127 рядом с первым гистидином His126 и остаток глицина Gly133 между вторым и третьим гистидиновыми остатками (рис. 2). Структура этого фрагмента полностью совпадает с консервативной структурой продленного мотива активного центра метцинкиновых эндопептидаз (рис. 2) [8]. Кроме того, идентифицирован единственный в структуре этого белка остаток метионина Met147 и расположенные близко от него остатки цистеина Cys145 и тирозина Tyr149, характерные для разных семейств клана метцинкинов. Наличие этих консервативных остатков позволяет утверждать, что фрагмент CLMNY представляет собой последовательность Met-поворота (рис. 2). Две маркерные последовательности в первичной структуре MprBi позволяют классифицировать внеклеточную бациллярную протеиназу как фермент, относящийся к клану метцинкинов. Фермент принадлежит к семейству адамализинов/репролизинов, так как в мотиве активного центра MprBi после третьего гистидина (His136) расположен Asp, а в Met-повороте находится остаток Cys145, что характерно только для ферментов этого семейства [18].

### СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТЦИНКИНОВ

Третичные структуры некоторых представителей клана метцинкинов хорошо изучены. Молекула астацина является признанной моделью при изучении структуры метцинкинов. Показано, что молекула астацина имеет форму глобу-

лы, разделенную на два субдомена (*N*- и *C*-домены) глубокой, узкой и длинной щелью, на дне которой находится каталитически активный цинк. Структура *N*-домена состоит из четырех изогнутых широких параллельных и одной антипараллельной  $\beta$ -полос и двух длинных  $\alpha$ -спиралей [40].

*C*-домен начинается после консервативного глицинового остатка Gly99, он менее упорядочен, чем *N*-домен, содержит только одну  $\alpha$ -спираль и варьирует по величине и форме у разных астацिनотипных ферментов.

В структуре зрелого астацина имеются консервативные цистеиновые остатки, образующие два дисульфидных мостика, один из которых (Cys42-Cys198) связывает *N*- и *C*-домены, второй мостик (Cys64-Cys84) находится рядом с активным центром. Эти мостики определяют общую стабильность и жесткость белковой молекулы [41].

У всех ферментов клана метцинкинов, а также термолизина и термолизиноподобных эндопроотеиназ цинк-связывающие регионы схожи между собой, что позволяет предположить общую модель связывания иона цинка в этих белках. В мотиве активного центра астацина 92HELMHAIGFYH102 расположение первых двух цинковых лигандов His92 и His96 аналогично расположению гистидиновых остатков в активном центре термолизина HELTH, что указывает на сходство каталитически активных центров астацина и термолизина.

Консервативный остаток глицина Gly99 осуществляет поворот полипептидной цепи в направлении к иону цинка и играет важную роль в укладке активного центра. В результате имидазольное кольцо His102 располагается напротив иона цинка и формирует третий цинковый лиганд (рис. 3) [40, 42].

Остаток глутаминовой кислоты Glu93, расположенный рядом с первым гистидиновым лигандом (His92) в молекуле астацина, участвует в акте катализа в роли каталитического основания аналогично тому, как это происходит в процессе катализа у термолизина. Для подтверждения этого положения был получен мутантный белок с заменой Glu93 на Ala, у которого не обнаружено протеолитической активности по гидролизу желатина и высокочувствительного флуоресцентного субстрата. Этот эксперимент подтвердил статус Glu93 как каталитического основания в молекуле астацина. Являясь акцептором протона, Glu93 поляризует молекулу воды, которая становится дополнительным четвертым цинковым лигандом и участвует в каталитическом акте [43].

Рентгеноструктурный анализ показал, что в зрелой молекуле астацина остаток Glu103, рас-

Метцинкиновые металлопротеиназы	мотив активного центра	Met-поворот
<b>АСТАЦИНЫ</b>		
Астацин (речной рак)	H E L M H A I G F Y H E	S I M H Y
$\alpha$ -МЕР (мышь)	H E I L H A L G F F H E	S L M H Y
$\beta$ -МЕР (крыса)	H E F L H A L G F W H E	S V M H Y
ВМР1/проколлаген С- протеиназа (человек)	H E L G H V V G F W H E	S I M H Y
SPAN/ВР10 (морской ёж)	H E I G H A I G F H H E	S I M H Y
Толлоид-протеиназа ( <i>Dr. melanogaster</i> )	H E L G H T I G F H H E	S I M H Y
Флавастацин ( <i>F. meningosepticum</i> )	H E I M H S M G I M H E	S V M M Y
<b>СЕРРАЛИЗИНЫ</b>		
Протеиназа <i>Serratia</i>	H E I G H A L G L S H P	S L M S Y
Протеиназа В ( <i>E. chrysanthemi</i> )	H E I G H A L G L S H P	S I M S Y
Протеиназа <i>P. aeruginosa</i> [47]	H E I G H T L G L S H P	S V M S V
<b>МАТРИКСИНЫ</b>		
ММР-1 (коллагеназа 1 фибробластов человека)	H E L G H S L G L S H S	A L M Y P
ММР-3 (человеческий стромелизин-1)	H E I G H S L G L F H S	A L M Y P
ММР8 (нейтрофильная коллагеназа 2)	H E F G H S L G L A H S	A L M Y P
<b>АДАМАЛИЗИНЫ/ РЕПРОЛИЗИНЫ</b>		
Адамализин II ( <i>C. adamanteus</i> )	H E L G H N L G M E H D	C I M R P
Атролизин С	H E L G H N L G M E H D	C I M R P
Тримерелизин	H E L G H N L G M E H D	C I M S D
Акутолизин А [39]	H E M A H N L G V S H D	C I M S P
<b>ТЕРМОЛИЗИН</b>		
Термолизин ( <i>B. thermoproteolyticus</i> ) [44]	H E L T H A V T D Y T A	нет
	126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137	145 146 147 148 149
МрВi ( <i>B. intermedius</i> )	H E Y G H N F G L P H D	C L M N Y

Рис. 2. Маркерные консервативные последовательности метцинкиновых металлоэндопептидаз: расширенный мотив активного центра и Met-поворот



положенный после третьего гистидинового лиганда, ориентирован с помощью молекулы воды так, что образуется солевой мостик с *N*-концевым остатком Ala1. Замены Glu103 на Gln или Ala оказывали незначительное влияние на катализ, но фермент становился нестабильным. Таким образом, связь между Glu103 и Ala1 является важной в стабилизации молекулы зрелого астацина [40–42]. Следует отметить, что остаток Glu103 характерен только для членов астаинового семейства (рис. 2). В связи с этим, некоторые исследователи считают, что Glu103 также относится к мотиву **HELMHAIGFYH**E активного центра астацина [40, 44, 45].

Все метцинкины в структуре имеют метиониновый поворот, содержащий консервативный остаток метионина (рис. 3). Метионин – редко встречающаяся аминокислота, поэтому ее консервативное присутствие в структуре Met-поворота у метцинкинов является удивительным фактом [29]. Как показали эксперименты, эта аминокислота не играет ключевой роли в проявлении каталитической активности. Так, в эндопептидазе MMP2 (желатиназа А) при замене метионина в Met-повороте на лейцин или серин были отмечены минимальные изменения каталитической активности [46]. В эндопептидазе С из *Erwinia chrysanthemi* (PrtC) замены метионина на лейцин, аланин и изолейцин не привели к изменению стабильности, но обнаружено снижение активности мутантных белков. Кристаллографическое исследование мутантных белков показало изменение в геометрии имидазольного кольца боковой цепи, что, по предположению авторов, повлияло на связывание цинка с гистидинами активного центра [47]. Метионин в последовательности Met-поворота эндопептидазы ArgA *P. aeruginosa* был заменен на L-диформетионин, оказывающий, в отличие от лейцина и изолейцина, минимальное стерическое воздействие за счет двух атомов фтора. Эта замена привела к небольшому изменению каталитической активности мутантного белка по сравнению с диким типом, термостабильность белков при этом не изменилась. Аминокислотная последовательность Met-поворота SI(L,V)MHY у астаиноподобных ферментов высококонсервативна, однако остаток тирозина (Tyr149) обнаружен в этом повороте только у астаинов и сerratилинов. Tyr149, отдавая протон, образует водородную связь с цинком и становится пятым цинковым лигандом [18]. Авторы предположили, что уникальный «тирозиновый переключатель» может играть специфическую роль в процессе катализа. С помощью сайт-направленного мутагенеза был получен астаин с заменой Tyr149Phe, который имел невысокую протеоли-

тическую активность. Было сделано заключение, что Tyr149 не является критическим для катализа, но может быть ответственен за связывание фермента с субстратом и/или стабилизацию переходного состояния во время каталитического акта [43]. Изучение абсорбционных спектров Cu-астаинового мутанта подтвердило участие Tyr149 в субстратном связывании [48].

В 2010 г. предложен двухстадийный механизм активации астаина. На первой стадии активации проэнзима трипсин инициирует отщепление пропоследовательности из 34 аминокислот (Ala1<sup>P</sup>-Asp34<sup>P</sup>), подготавливая фермент к образованию зрелой формы. На этом этапе фермент становится активным. Второй этап активации характеризуется перестройкой структуры фермента, в результате чего оставшиеся шесть аминокислот пропептида (Asp34<sup>P</sup>-Ala1<sup>M</sup>), погруженные в молекулу белка, выходят на поверхность белковой глобулы и становятся доступными для расщепления. Последующее высвобождение *N*-концевого Ala1 с образованием зрелой молекулы может происходить либо аутокаталитически, либо с помощью того же трипсина [41].

Пятый цинковый лиганд, являющийся донором протона в реакции катализа, не известен для семейств матриксинов и адамализинов/репролизинов. У этих белков остаток Tyr в Met-повороте заменен, в основном, на нефункциональный остаток пролина, не принимающий участия в каталитическом акте (рис. 2). Пропептиды этих металлопептидаз содержат консервативные фрагменты с цистеиновым остатком, который связывается с цинком активного центра. Активация фермента происходит при протеолитическом отщеплении пропептида. Подобный механизм («цистеиновый переключатель») обнаружен в продомонах стромелизина-1 (про

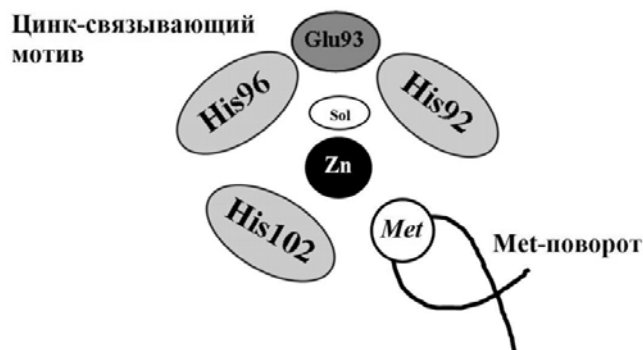


Рис. 3. Цинксвязанный мотив активного центра и Met-поворот в структуре молекулы астаина

ММР-3) и желатиназы А (про ММР-2 и других ферментах семейства матриксинов, а также у ферментов семейства адамализинов/репролизинов, у которых цистеин в составе консервативных последовательностей PRCGVPD и РКМ-CGVT связывался с цинком активного центра протеазного домена, поддерживая молекулу фермента в неактивном состоянии. Такой же механизм блокирования активного центра предполагают у лейшманолизина, продомен которого содержит консервативную последовательность HRCIND [7].

Таким образом, метцинкины представляют собой мультидоменные белки, имеющие цинксвязанный мотив активного центра с тремя

гистидиновыми лигандами и консервативным Met-поворотом. Активация ферментов происходит по механизму «тирозинового» или «цистеинового» переключателя. Участие метцинкинов в различных деструктивных и патологических процессах, влияющих на здоровье человека, создает необходимость всестороннего изучения их энзиматических свойств и функциональной роли для разработки диагностических тестов и новых лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. ГК № П406.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хофманн Э. (2001) *Биохимия*, **66**, 1415–1424.
2. Sterchi, E.E., Stucker, W., and Bond, J.S. (2008) *Molecular Aspects of Medicine*, **29**, 309–328.
3. Enzyme nomenclature 1992: recombination of the Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular biology and classification of enzymes. (1992) San Diego, P. 862.
4. Lopez-Otin, C., and Bond, J.S. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 30433–30437.
5. Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993) *Biochem. J.*, **290**, 205–218.
6. Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J., and Barrett, A.J. (2004) *Nucleic acid research.*, **32**, D160–D164.
7. Gomis-Ruth F.X. (2003) *Mol. Biotechnology*, **24**, 157–202.
8. Gomis-Ruth F.X. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 15353–15357.
9. Pfeleiderer, G., Zwilling, R., Soneborn, H.H. (1967) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1319–1331.
10. Plummer, T.H.Jr., Tarentino, A.L., and Hauer, C.R. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 13192–13196.
11. Jiang, W., Gorbea, C.M., Flannery, A.V., Beynon, R.J., Grant, G.A., and Bond, J.S. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 9185–9193.
12. Gorbea, C.M., Marchand, P., Jiang, W., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Bond, J.S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 21035–21043.
13. Yasumasu, S., Iuchi I., and Yamagami, K. (1988) *Zool. Sci.*, **5**, 191–195.
14. Kessler, E., Adar, R., Goldberg, B., and Niece, R. (1986) *Collagen Rel. Res.*, **6**, 249–266.
15. Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., and Greenspan, D.S. (1996) *Science*, **5271**, 360–362.
16. Yiallourous, I., Kappelhoff, R., Schilling, O., Wegmann, F., Helms, M.W., Auge, A., et al. (2002) *J. Mol. Biol.*, **342**, 237–246.
17. Titani, K., Torff, H.-J., Hormel, S., Kumar, S., Walsh, K.A., Rodl, J. et al. (1987) *Biochemistry*, **26**, 385–392.
18. Stocker, W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Ruth, F.-X., McKay, D.B., and Bode, W. (1995a) *Protein Sci.*, **4**, 823–840.
19. Bond, J.B., and Eynon, R.J. (1995) *Protein Science*, **4**, 1247–1261.
20. Tarentino, A.L., Quinones, G., Grimwood, B.G., Hauer, C.R., and Plummer, T.H.Jr. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 281–285.
21. Ge, G., Greenspan, D.S. (2006) *Birth Defects Research (Part C)*, **78**, 47–68.
22. Morihara, K., Tsuzuki, H., and Oka, T. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **309**, 414–429.
23. Marokhazi, J., Mihala, N., Hudecz, F., Fodor, A., Graf, L., and Venekei, I. (2007) *FEBS Journal*, **274**, 1946–1956.
24. Letoffe, S., Deleplaire, P., and Wandersman, C. (1989) *Mol. Microbiol.*, **3**, 79–86.
25. Baumann, U. (1994) *J. Mol. Biol.*, **242**, 244–251.
26. Hamada, K., Hata, Y., Katsuya, Y., Hiramatsu, H., Fujiwara, T., and Katsube, Y. (1996) *J. Biochem.*, **119**, 844–851.
27. Miyatake, H., Hata, Y., Fujii T., Hamada, K., Morihara, K., and Katsube, Y. (1995) *J. Biochem.*, **118**, 474–479.
28. Hege, T., and Baumann, U. (2001) *J. Mol. Biol.*, **314**, 187–193.
29. Walasek, P., and Honek, J.F. (2005) *BMC Biochemistry*, **6**:21 doi:10.1186/147–2091–6–21.
30. Bode, W., Grams, F., Reinmer, P., Gomis-Ruth, F.-X., Baumann, U., McKay D.B., and Stocker, W. (1996) *Advan. Exp. Med. Biol.*, **389**, 1–11.
31. Hasty, K.A., Jeffrey, J.J., Hibbs, M.S., and Welgus, H.G. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 313–318.
32. Matsui, T., Fujimura, Y., and Titani, K. (2000) *BBA*, **1477**, 146–156.
33. Gong, W., Zhu, X., Liu, S., Teng, M., and Niu, L. (1998) *J. Mol. Biol.*, **283**, 657–668.
34. Grams, F., Huber, R., Kress L.F., Moroder, L., and Bode, W. (1993) *FEBS Lett.*, **335**, 76–80.
35. Seals, D.F., and Courtneidge, S.A. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 7–30.
36. Blobel, C.P., and Apte, S.S. (2006) *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, 19–23.
37. Alfandari, D., Couin, H., Gaultier, A., Smith, K., White, J.M., Darribere, T., and DeSimone, D.W. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 918–930.
38. Sabirova, A.R., Rudakova, N.L., Balaban, N.P., Ilinskaya, O.N., Demiduyk, I.V., Kostrov, S.V., Rudenskaya, G.N., and Sharipova, M.R. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 4419–4425.
39. Рудакова Н.Л., Балабан Н.П., Данилова Ю.В., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. (2010) *Биохимия*, **75**, 1462–1470.
40. Bode, W., Gomis-Ruth, F.-X., Huber, R., Zwilling, R., and Stocker, W. (1992) *Nature*, **358**, 164–167.
41. Guevara, T., Yiallourous, I., Kappelhoff, R., Bissdorf S., and Stocker, W., F.-X. Gomis-Ruth (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 13958–13965.

42. Bode, W., Gomis-Ruth, F.-X., and Stocker, W. (1993) *FEBS Lett.*, **331**, 134–140.
43. Yiallourous, I., Berkhoff, E.G., and Stocker, W. (2000) *FEBS Lett.*, **484**, 224–228.
44. Jiang, W., and Bond, J.S. (1992) *FEBS Lett.*, **312**, 110–114.
45. Gomis-Ruth, F.X., Stocker, W., Huber, R., Zurilling, R., and Bode, W. (1993) *J. Mol. Biol.*, **229**, 945–968.
46. Butler, G.S., Tam, E.M., and Overall, C.M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 15615–15620.
47. Oberholzer, A.E., Bumann, M., Hege, T., Russo, S., and Baumann, U. (2009) *J. Biol. Chem.*, **390**, 875–881.
48. Gomis-Ruth, F.X., Grams, F., Yiallourous, I., Nar, H., Kusthardt, U., Zwilling, R., Bode, W., and Stocker, W. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 17111–17117.

## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND PROPERTIES OF METZINCINS

**N. P. Balaban, N. L. Rudakova\*, M. R. Sharipova**

*Kazan (Volga region) federal university, ul. Kremlevskaya 18,  
Kazan 420008, Russia; fax: (843 292-4448,  
E-mail: public.mail@ksu.ru*

Received January 23, 2011  
Revision received June 21, 2011

In this review the main families of the metzincins clan endopeptidases (zinc-dependent metalloproteinases) in a wide range of organisms from bacteria to mammals is considered. Data on classification, physical-chemical properties, substrate specificity, and structural features of this group of enzymes are given. The mechanisms of activation of metzincins, the role of these enzymes in organisms, and their involvement in various physiological processes are discussed.

*Key words:* metalloproteinases, metzincins, astacins, adamalysins/reprolysins, matrixins, serralysins