

УДК 577.152.34:599.3

©Немова, Бондарева

К ВОПРОСУ ОБ ЭВОЛЮЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Н.Н. Немова, Л.А. Бондарева*

Институт биологии Карельского научного центра РАН
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11; тел.: (8142)78-36-15;
факс: (8142)76-98-10; эл. почта: nemova@krc.karelia.ru

Приведены данные литературы и собственных исследований авторов о возможном ходе эволюционирования протеолитических ферментов. Изложены современные принципы классификации пептидаз, основанные на оценке гомологии свыше 66 тысяч генных последовательностей и сходства общей структурной организации почти 2,5 тысяч известных ферментов. Рассмотрены не только эволюционные взаимоотношения внутри выделенных семейств родственных пептидаз, возможный ход их эволюционной истории, но также эволюционно обусловленные различия в предпочтении того или иного пути протеолиза у организмов различных таксонов.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, классификация, молекулярная эволюция.

ВВЕДЕНИЕ. Протеолиз (ферментативный гидролиз пептидных связей в белках и пептидах) – один из универсальных процессов живой природы, - играет важную роль в поддержании стационарных концентраций белков в живой клетке и зачастую (в силу своей необратимости) является прерогативой выживания организмов [1-5]. Наибольшая интенсивность протеолиза отмечается в активно растущих или пролиферирующих клетках желез и других органов, характеризующихся повышенным белковым синтезом. Хорошо изучена функция протеиназ в процессах, контролируемых реакциями ограниченного протеолиза (посттрансляционном расщеплении предшественников биологически активных белков, образовании полипептидных гормонов, участии в “пусковых механизмах” ряда каскадных процессов), а также в передаче клеточных импульсов, контроле качества белков, презентации антигенов, клеточном цикле, апоптозе, индивидуальном развитии и других физиологических и патологических процессах [2, 3, 5-11]. Характерными чертами регуляторного действия протеолитических ферментов является быстрота осуществления и высокая экономичность. При действии экстремальных факторов часто повышается активность внутриклеточных протеолитических ферментов, образуются биологически активные вещества, которые, в свою очередь, влияют на синтез белка и нуклеиновых кислот. Так индуцируются структурные перестройки, характерные для долговременной адаптации, что, по-видимому, является проявлением общего адаптационного синдрома. Следует отметить, что протеолитические ферменты действуют на первом, ключевом этапе мобилизации белковых резервов клетки, и поэтому их роль в механизмах биохимических адаптаций невозможно

* - адресат для переписки

переоценить. Клеточный протеолитический аппарат должен быть высокоселективным и жестко регулируемым, так как усиленная деструкция жизненно необходимых белков или замедленная деградация короткоживущих регуляторных белков могут существенно изменить клеточные функции. Эти процессы требуют наличия в клетке достаточно тонких и надежных механизмов контроля, обеспечивающих максимальную эффективность и в то же время высокую избирательность внутриклеточного протеолиза. Жизненную важность протеолитических ферментов иллюстрирует также тот факт, что продукты 18% последовательностей базы данных SwissProt [12] впоследствии подвергаются протеолитическому процессингу. Установлено, что не менее 5% генома человека отвечают за кодирование компонентов протеолитических систем, включая собственно пептидазы (примерно 2% всех генных продуктов), их ингибиторы и кофакторы [13, 14].

Задача создания механизма быстрого и селективного расщепления белков без существенных затрат энергии, по-видимому, была решена на очень ранних этапах развития жизни [3]. У живых организмов появились протеолитические ферменты, которые обычно в литературе обозначают как протеазы, протеиназы или пептидазы, последний термин предпочтительнее [12, 13, 15]. Для катализа одной и той же реакции (гидролиза пептидной связи) природа создала множество различных биокатализаторов. Причина такого разнообразия протеолитических ферментов, очевидно, связана с различиями в специфичности, а также с тем, что, ферменты функционируют в разных значениях pH, температуры, состава среды, в разных клеточных структурах [3-5]. Достаточно трудно установить иерархию механизмов, то есть утверждать, что один механизм совершеннее другого. По-видимому, если использовать в каждом случае “идеальный” субстрат, существенная разница в эффективности катализа разными пептидазами отсутствует.

1. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ.

Химизм протеолиза, в целом, очень сходен для всех или для большинства протеолитических ферментов. Их относят к группам аспартатных, цистеиновых, глутаматных, металлопротеиназ, сериновых, треониновых и пептидаз с неизвестным типом катализа. К настоящему времени идентифицированы 66524 последовательности и 2403 белка пептидаз (эндопептидаз, экзопептидаз и омегапептидаз). Сведения, содержащиеся в базах данных полипептидов SwissProt, PIR-Protein, MEROPS, базы данных нуклеотидных последовательностей EMBL, а также в первичных литературных источниках были проанализированы создателями базы данных пептидаз и их ингибиторов MEROPS (<http://www.merops.fc.uk>) Rowlings et al. [12, 13, 15] с целью выявления различных эволюционных линий. В результате была разработана классификация пептидаз, в основе которой – их эволюционное происхождение, установленное по аминокислотной последовательности. Свойства пептидаз каждого семейства рассматриваются с двух основных позиций: *во-первых*, учитывается, насколько широки различия их каталитической активности и, *во-вторых*, насколько высока степень конвергентности пептидаз, произошедших из различных эволюционных источников. В заключение, авторы проанализировали, насколько совместима разработанная ими классификация с широко распространенной ранее классификацией пептидаз по типу и механизму катализа.

К терминам, используемым в современной классификации протеолитических ферментов, относят следующие: **тип** – используется для разделения пептидаз по типу химических групп, существенных для катализа, а именно: аспартатные, цистеиновые, глутаматные, металлопротеиназы, сериновые, треониновые и протеиназы с неизвестным типом катализа; **семейство** объединяет группы белков с гомологичными пептидазными единицами и обладающие статистически достоверным сходством аминокислотных последовательностей, по крайней мере, в области протеолитического модуля; в основе каждого семейства – “типичный” представитель; **клан** объединяет

пептидазы, которые предположительно имеют единое эволюционное происхождение, что устанавливается, главным образом, на основании сходства третичной структуры, несмотря на возможное отсутствие статистически значимой гомологии последовательностей. Базы данных постоянно пополняются, что отражено в таблице 1, суммирующей объем базы данных MEROPS за последние годы [12]. В качестве примера ниже приведена сводная таблица кланов, семейств и типичных представителей одного из типов пептидаз – аспартатных (табл. 2).

Таблица 1. Количество идентифицированных пептидаз, их семейств, кланов, а также ингибиторов пептидаз в базе данных MEROPS [12, 13].

	MEROPS 6.3 2003 г.		MEROPS 7.1 2005 г.		MEROPS 7.7 2006 г.	
	пептидазы	ингибиторы	пептидазы	ингибиторы	пептидазы	ингибиторы
последовательности	18076	2651	30909	3690	55133	4731
белки	1711	318	2053	532	2330	563
семейства	172	48	180	53	185	53
кланы	33	25	39	32	51	33

Таблица 2. Аспартатные пептидазы в базе данных MEROPS [12]. Кланы, семейства, типичные представители.

КЛАН	СЕМЕЙСТВО	ТИПИЧНАЯ ПЕПТИДАЗА
<u>AA</u>	<u>A1</u>	пепсин A (<i>Homo sapiens</i>)
	<u>A2</u>	ретропепсин ВИЧ-1 (вирус иммунодефицита человека 1)
	<u>A3</u>	пептидаза вируса мозаики цветной капусты (вирус мозаики цветной капусты)
	<u>A9</u>	спумапепсин (спумаретровирус человека)
	<u>A11</u>	кннн трансоин пептидаза (<i>Drosophila melanogaster</i>)
<u>AB</u>	<u>A6</u>	пептидаза нодавируса (вирус flock house)
	<u>A21</u>	пептидаза тетравируса (омега вирус <i>Nuckmirelia capensis</i>)
<u>AC</u>	<u>A8</u>	сигнальная пептидаза II (<i>Escherichia coli</i>)
<u>AD</u>	<u>A22</u>	пресенилин 1 (<i>Homo sapiens</i>)
	<u>A24</u>	тип 4 препилин пептидазы 1 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
<u>AE</u>	<u>A25</u>	пептидаза гри (<i>Bacillus megaterium</i>)
	<u>A31</u>	пептидаза HybD (<i>Escherichia coli</i>)
<u>AF</u>	<u>A26</u>	омитин (<i>Escherichia coli</i>)
<u>A-</u>	<u>A5</u>	термопсин (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)

2. ТИПЫ ПЕПТИДАЗ.

2.1. Аспаргатные пептидазы.

В настоящее время очевидно, что всем аспаргатным пептидазам свойственна эндопептидазная активность, они широко распространены среди низших грибов, млекопитающих, рыб и других животных, а также встречаются у некоторых цветковых (насекомоядных) растений [3, 16]. Среди аспаргатных пептидаз широко изучены ферменты желудка (пепсин, гастрицин, химозин), почек (ренин), лизосом (катепсины D и E), секретируемые пептидазы дрожжей и грибов (ризопуспепсин, пенициллопепсин и эндотиапепсин) [16]. Все аспаргатные пептидазы животных синтезируются в виде зимогенов и впоследствии активируются [16]. Несмотря на то, что зимогены аспаргатных пептидаз еще не выделены из грибов, их ДНК последовательности, например, последовательность ризопуспепсина, свидетельствуют о присутствии профермента [17]. Вероятно, и другие аспаргатные пептидазы грибов также синтезируются в виде зимогенов.

Среди аспаргатных пептидаз наиболее многочисленно семейство пепсина A1 (936 последовательностей, 69 известных белков), представители которого обнаруживаются только у эукариотических организмов (табл. 2) [13, 16]. Двухцепочечные пепсины эукариот, предположительно, образовались в результате генной дупликации (рис. 1) единого предшественника с вирусными ретропепсинами, которые, в отличие от пепсинов, имеют мономерную структуру и содержат только по одному каталитическому остатку Asp активного центра, вследствие этого необходимый этап активации ретропепсина – его димеризация. В клан AA на основании сходства третичной структуры и чувствительности к ингибитору (пепстатину) объединены семейства A1-3, A9 и A11. Среди аспаргатных пептидаз есть и пепстатин-резистентные, например, представители семейства термопсина A5.

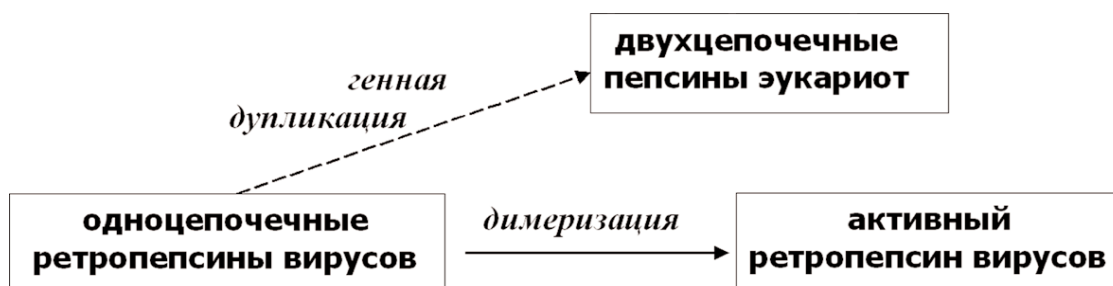


Рисунок 1.

Эволюционное происхождение аспаргатных пептидаз семейства пепсина A1, клан AA.

Можно полагать, что аспаргатные пептидазы возникли на более поздних этапах эволюции, чем другие типы, например, сериновые, но не потому, что этот тип катализа более совершенен, а потому, что он приспособлен к определенным условиям, с которыми не сталкивались примитивные организмы. Сравнение структуры аспаргатных пептидаз из различных источников и их активных центров, включающих аминокислотные остатки Asp215, Asp32 и Ser35, свидетельствует о высокой степени сходства их первичной и третичной структуры. Одной из причин высокой гомологии может являться довольно протяженный субстрат-связывающий участок, который обеспечивает широкую вариабельность субстратной специфичности. Таким образом, широкая субстратная специфичность достигается незначительными изменениями стерического соответствия и не требует приобретения дополнительных доменов, как это наблюдается в эволюции

сериновых пептидаз. Несмотря на широкое разнообразие выполняемых функций, очевидная высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей аспартатных пептидаз указывает на их происхождение от общего предшественника путем эволюционной дивергенции [16].

2.2. Цистеиновые пептидазы.

Протеолитические ферменты, активность которых зависит от остатка цистеина, происходят как минимум из 8 различных эволюционных источников, каждый из которых формирует группу цистеиновых пептидаз с различной структурой и свойствами [12]. Различия между этими линиями очевидны не только в трехмерной, но даже в двумерной структуре ферментов. Хотя активность большинства цистеиновых пептидаз зависит от каталитической диады Cys108 и His265, им присущи выраженные отличительные особенности, обусловленные происхождением от различных предковых пептидаз. Белки наиболее широко распространенного семейства папаина C1 (1652 последовательности, 132 белка) обнаруживаются от вирусов до высших эукариот. Типичные представители семейства кальпаинов C2 состоят из четырех доменов, включая Ca^{2+} -связывающий кальмодулин-подобный домен (рис. 2), они могут экспрессироваться повсеместно (μ - и m -кальпаины) или тканеспецифично (кальпаин 3a в скелетных мышцах, кальпаин 9 в желудке, кальпаин 3b в хрусталике и некоторых других тканях) [9, 11]. Атипичные кальпаины вместо Ca^{2+} -связывающего домена могут содержать ряд специфичных доменов, обнаруживаемых как у примитивных, так и у высших эукариот. Учитывая сходство кальпаинов в области каталитического центра с папаином, указанные семейства объединяют в клан CA.

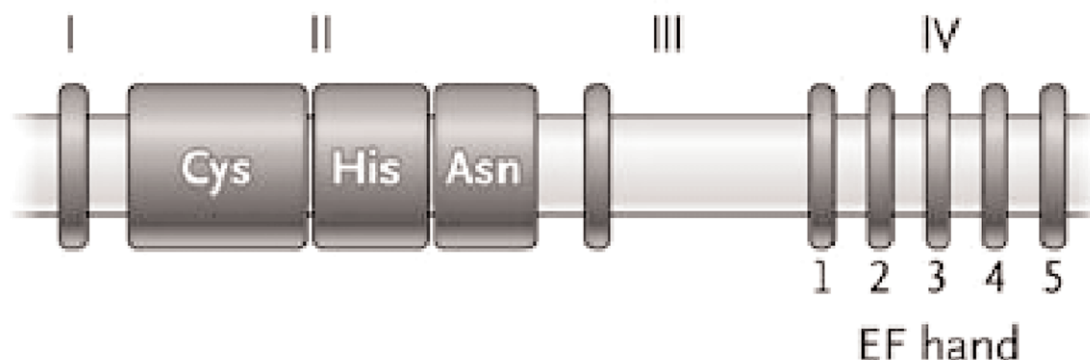


Рисунок 2.

Доменная организация типичного полипептида семейства кальпаина C2, клан CA: I – продомен; II – протеолитический модуль цистеиновой пептидазы, включающий остатки каталитической триады Cys105-His262-Asn286; III – C2-подобный домен, передает и усиливает конформационное изменение, индуцированное связыванием Ca^{2+} доменом IV, на каталитический домен II; IV – Ca^{2+} -связывающий домен, несущий пять EF-hand-мотивов.

Филогенетический анализ цистеиновых протеиназ эукариот показывает, что причина разнообразия ферментов внутри этой группы – множественные генные дубликации, ряд которых произошел на очень ранних этапах эволюционной истории эукариот.

2.3. Глутаматные пептидазы.

Глутаматные пептидазы, содержащие в активном центре остатки Glu190 и Gln107, характерны только для царства грибов. Шестнадцать последовательностей глутаматных пептидаз, для пяти из которых установлены белковые продукты, составляют единственное семейство G1, типичный фермент которого – циталидоглутаминовая пептидаза из гриба *Scytalidium lignicolum* [18] (рис. 3). Ранее эндопептидазы G1 были описаны как “пепстатин-нечувствительные карбоксилпротеиназы”.

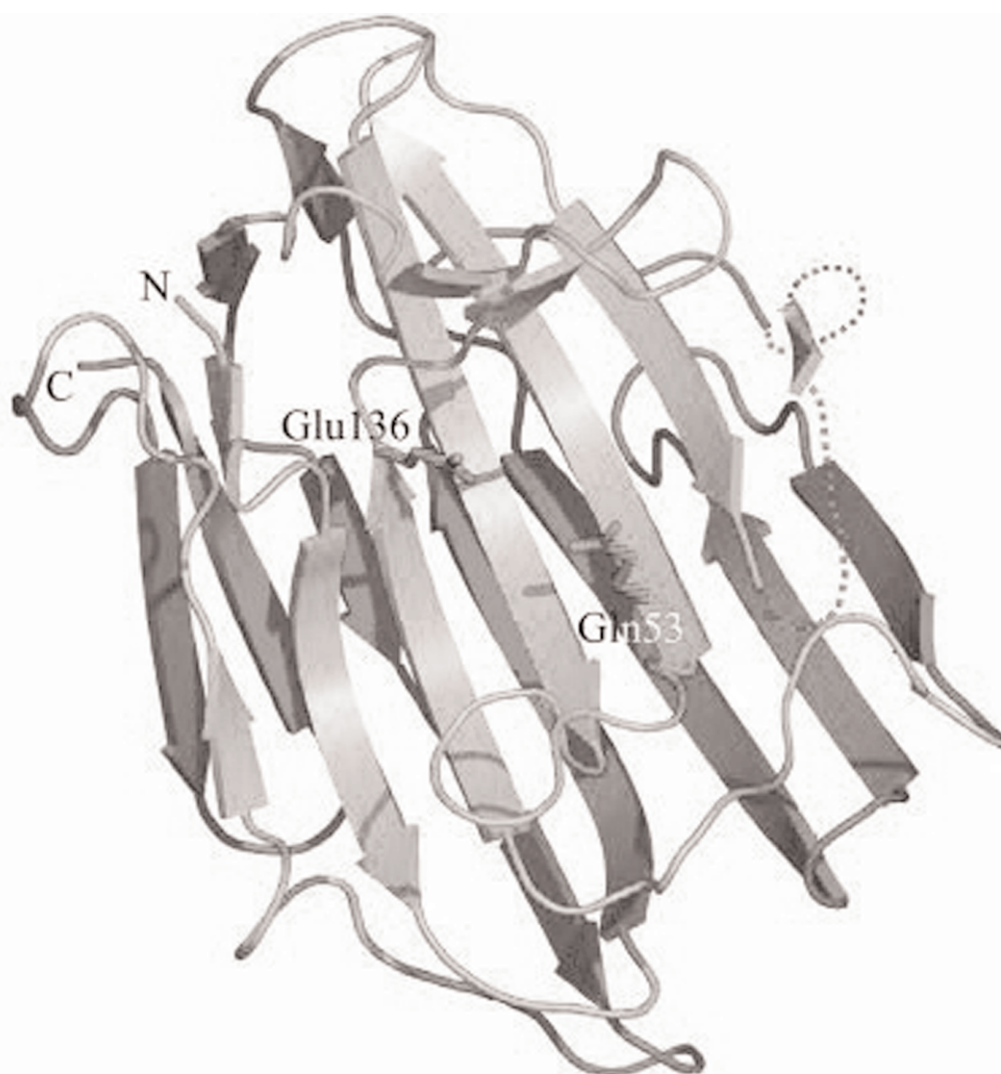


Рисунок 3.

Ленточная диаграмма глутаматной пептидазы из *Scytalidium lignicolum*, семейство циталидоглутаматной пептидазы G1, клан GA. Отмечены остатки активного центра, Gln53 и Glu136, а также верхний и нижний слои, образованные семью антипараллельными β -тяжами каждый (по [18]).

2.4. Металлопептидазы.

Широко распространены металлопептидазы (более 23 тысяч идентифицированных последовательностей), среди которых встречаются и ферменты микробов, и ферменты мозговой ткани [3, 19]. Зачастую физиологическое значение ферментов бактерий и беспозвоночных не установлено. Так, хорошо изучена роль ангиотензин-превращающего и эндотелин-превращающего ферментов (металлопептидаз семейств M2 и M13, соответственно), ключевых компонентов регуляции кровяного давления и баланса электролитов у млекопитающих, но не ясно значение гомологов этих пептидаз для беспозвоночных, в отсутствие замкнутой кровеносной системы и, как следствие, потребности в регуляции кровяного давления. Из общих соображений заманчиво отнести именно этот тип пептидаз к эволюционно древнейшему. Сходство структуры активных центров металлзависимых и сериновых пептидаз, с одной стороны, и металлзависимых и аспартатных – с другой, наводит на мысль о том, что металлопептидазы могут быть общим эволюционным предшественником этих двух типов ферментов.

Структура металлопептидаз разнообразна, и на ее основе выделяют 53 семейства [12]. Пептидазы разных семейств различаются по способу связывания металлов. Большинство ферментов содержат атомы Zn^{2+} , и в их структуре с помощью рентгеноструктурного анализа идентифицированы остатки, участвующие в их связывании. За связывание атомов цинка в структуре металлопептидаз семейств M1-13 ответственны два остатка His в составе HEXXH-мотивов и вариабельный третий лиганд Glu/Asp/His, в семействе цинковой D-Ala-D-Ala карбоксипептидазы M15 – два остатка His и Asp, в пептидазах семейства карбоксипептидазы A M14 один атом цинка удерживается координационными взаимодействиями двумя остатками His, Glu и молекулой воды. Белки большого семейства термолизина M4 присутствуют у бактерий, археев и грибов, в то время как члены семейства астацина/адамализина M12 обнаруживаются преимущественно у животных. Обширное семейство металлопротеиназы матрикса (МПП) M10, или матриксинов, характеризуется присутствием общих структурных и функциональных элементов. У человека идентифицированы свыше 24 генов, кодирующих ферменты семейства МПП [20]. Имеются основания предполагать, что они являются продуктами экспрессии одного генного суперсемейства. Более того, предполагают, что в процессе эволюции гены МПП, вероятно, образовывались путем дивергенции единого генного кластера (рис. 4). Первичные структуры МПП обладают высоким сходством, почти все МПП имеют мультидоменную организацию, при этом различные домены выполняют определенную функцию: сохранение фермента в латентной форме, секрецию, латентное узнавание и катализ [19, 21]. Все члены семейства содержат как минимум сигнальный пептид, пропептид и каталитический домен. Ассоциация доменов МПП в мультидоменные комплексы – раннее эволюционное событие. Генные последовательности сложных мультидоменных ферментов подвергались усечению с образованием менее сложных белков, утративших некоторые домены. Далее эволюционный процесс МПП в этих группах проходил независимо, возможно, параллельно. Предполагают, что МПП различной структуры произошли ранее дивергенции линий позвоночных и беспозвоночных. Это утверждение лучшим образом демонстрирует существование трех МПП у растений и только одной – у нематод.



Рисунок 4.
Варианты структурной организации ферментов семейства матриксных металлопептидаз M10, клан MA.

К металлопептидазам семейства астацина/адамализина M12 принадлежит также недавно охарактеризованная группа внеклеточных матриксных ферментов ADAMTS, содержащих специфичные С-концевые непептидазные домены (тромбоспондин-, дезинтегрин-подобные) [22, 23]. Филогенетический анализ и сравнение экзон-интронной организации гомологов ADAMTS у позвоночных, низших хордовых и беспозвоночных выявили эволюционные связи этого важного генного семейства, 19 представителей которого идентифицированы у человека [24].

2.5. Сериновые пептидазы.

Наиболее многочисленно среди всех пептидаз семейство химотрипсина S1 (4875 последовательностей, 459 известных белков) [12]. Семейство включает многие ферменты коагуляции, фибринолизиса и системы комплемента, обнаруживаемые в плазме крови. Представители семейства обнаружены во всех царствах живого, от вирусов до животных, тогда как прочие сериновые пептидазы наиболее характерны для вирусов, реже – бактерий и грибов. Каталитическая триада белков семейства S1 включает остатки His, Asp, Ser. Тот же порядок остатков характерен, по-видимому, и для белков семейства тогавирусной эндопептидазы S3, при этом члены этого семейства обладают третичной структурой, подобной химотрипсину. Ферменты семейства субтилизина S8 отличаются порядком остатков в триаде – Asp, His, Ser, а также им присуща особая третичная структура, поэтому очевидно, что это семейство эволюционно отлично от линии сериновых пептидаз типа химотрипсина. Семейство пролил олигопептидазы S9, значительно отличающееся от S1 и S8, представляет собой отдельную эволюционную линию с характерным порядком остатков в каталитической триаде – Ser554, Asp641 и His680. Аналогичен порядок остатков в каталитической триаде пептидаз семейства карбоксипептидазы Y S10 – Ser257, Asp449, His508, но при этом им свойственна особая третичная структура, а pH оптимум (5,0) значительно отличается от присущего ферментам других сериновых пептидаз. Имеется определенное сходство в структуре активных центров этих ферментов с липазой и ацетилхолинэстеразой. У бактерий обнаружены ферменты трех различных семейств D-Ala-D-Ala карбоксипептидаз серинового типа, S11, S12 и S13. По составу каталитической триады их объединяют в клан SE, в который также входят другие пенициллсвязывающие белки. Типичная пептидаза семейства S14 – АТР-зависимый олигомерный фермент из *E. coli*, состоящий из субъединиц двух типов – АТР-связывающего и пептидазного. Семейство также включает некоторые эндопептидазы хлоропластов растений, для которых характерен активный центр из Ser111 и His136, а третий член триады – Asp185 – отсутствует.

2.6. Треониновые пептидазы.

Треониновые пептидазы семейств T1-3 широко распространены среди всех живых организмов, исключая вирусы. Вместе с сериновыми (семейство S45) и цистеиновыми (семейства C44, 45, 59, 69) пептидазами они объединены в общий клан PB, отличительной особенностью которого является N-концевое положение каталитического нуклеофила и сходная третичная организация, независимо от свойственного ферменту механизма катализа [12]. Семейство T1 включает один из пептидазных компонентов относительно хорошо охарактеризованного протеолитического комплекса – протеасомы, в каталитическом коре β-субъединицы которой обнаруживается активный остаток Thr9.

Многочисленные белки семейств гликозиласпарагиназы T2 (идентифицированы 192 последовательности, выделены четыре белка) и орнитин ацетилтрансферазы T5 (253 последовательности, один белок) распространены только среди археев, бактерий, грибов, растений, при этом пептидазной активностью обладают только предшественники, но не зрелые ферменты.

2.7. Пептидазы с неизвестным типом катализа.

Современная классификация пептидаз [12] включает 9 семейств (2061 последовательность, 20 известных белковых продуктов), тип катализа для которых пока не установлен. Главным образом, это пептидазы вирусов и бактерий.

Заключая рассмотрение классификации пептидаз, следует отметить, что лишь небольшое их число происходит из независимых эволюционных источников (клан представлен одним семейством) [12]. Анализ баз данных обнаруживает 185 различных семейств пептидаз, многие из которых обладают значительным сходством и объединены в кланы (всего 51). Наиболее многочисленны пептидазы семейств химотрипсина, субтилизина, папаина, кальпаина, пепсина, термолизина. Пептидазы трех крупных семейств папаина С1, кальпаина С2 и пепсина А1 не представлены или имеют малое количество гомологов у прокариот. Большинство пептидаз вирусов не имеют близкого родства с пептидазами других организмов, среди них отсутствуют металлопептидазы.

Для уточнения и расширения классификации пептидаз необходимы дальнейшие исследования, которые дополняют ранее общепринятую классификацию по типу катализа.

3. ИНГИБИТОРЫ ПЕПТИДАЗ.

В предложенной классификации пептидаз учитываются различные аспекты каталитической активности, в том числе и чувствительность к ингибиторам. В основу классификации ингибиторов пептидаз положены те же принципы, что и в классификацию самих пептидаз. Ингибиторы не так широко распространены, как пептидазы, всего один-два в геноме бактерии или архея. У человека обнаружена активность 105 ингибиторов, в геноме идентифицированы еще 176 гомологичных последовательностей, ингибирующая активность которых пока не показана. В наиболее широко распространенной группе ингибиторов цистеиновых пептидаз выделяют суперсемейство цистатинов, белков, обладающих высокой степенью сходства и присутствующих у млекопитающих, птиц, рыб, насекомых, растений и некоторых простейших. К настоящему времени известно 12 функциональных белков цистатинов у человека, кроме того, несколько эволюционно связанных генов продуктов еще не идентифицированы [25]. Тип 1 цистатинов (А и В) – главным образом внутриклеточные белки, тип 2 (С, D, Е/М, F, G, S, SN, SA) – внеклеточные, тип 3 (L- и H-кининогены) – интраваскулярные белки. Все цистатины ингибируют цистеиновые пептидазы семейства папаина С1, а некоторые ингибируют также белки семейства легумаина С13. Гены суперсемейства серпинов одинаково широко представлены как в трех основных царствах живого (бактерий, археев, эукариот), так и у некоторых вирусов эукариот. В геноме человека обнаружены последовательности, по крайней мере, 35 членов этого семейства, на основании эволюционного родства объединенных в 10 различных монофилетических линий. Большинство серпинов линии В ингибируют сериновые и/или цистеиновые протеиназы семейства папаина, предохраняя тем самым клетки от повреждений, вызываемых экзогенными и эндогенными ферментами. Для серпинов изученных видов характерно значительное структурно-функциональное сходство [26].

4. ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ОРГАНИЗАЦИИ СИСТЕМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА.

Большинство исследований внутриклеточного белкового обмена проведено на млекопитающих, для которых характерно выраженное разделение внутри- и межклеточного путей белкового обмена. В различных клеточных локусах присутствуют протеолитические ферменты всех рассмотренных выше типов. Выделяют эндосомно-лизосомальную систему и действующие в цитоплазме и ядре клетки убиквитин- и АТР-зависимую (протеасомную) и кальций-зависимую (кальпаиновую) системы [11, 27, 28]. У млекопитающих значение того или иного пути деградации белков в значительной степени зависит от типа ткани. Например, в печени большей интенсивностью обладает лизосомальная система, а в мышцах – убиквитин-зависимый путь. Кроме того, существуют эволюционно обусловленные различия в предпочтении того или иного пути протеолиза. Известно, что общая протеолитическая активность во внутренних органах беспозвоночных значительно выше, чем у позвоночных. Протеолитические ферменты

беспозвоночных, являясь эволюционными предшественниками ферментов высших животных, обладают, как правило, более широкой специфичностью [29, 30], при этом в экологических условиях холодных морей, при низких температурах гомологичные пептидазы имеют более высокую активность.

5. ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ.

Роль лизосомального протеолитического аппарата приобретает особенное значение в метаболических ситуациях, связанных с преобладанием катаболических реакций, мобилизацией белковых и других ресурсов организма, которые уместно обозначить термином “метаболический стресс”. Известно, что лизосомы функционально удалены от основных метаболических реакций, связанных с такими проявлениями жизнедеятельности, как энергообеспечение, биосинтез белка, нуклеиновых кислот и многие другие. Однако блокирование или ослабление даже какой-либо одной лизосомальной ферментной системы или, напротив, ее патологическая активация приводят к подавлению защитной функции лизосом и к тяжелым патологическим состояниям, связанным с утратой способности к расщеплению чужеродных или утративших свое значение клеточных компонентов, поддержанию гомеостаза и определенного метаболического порядка [30, 31]. В лизосомах обнаруживаются преимущественно цистеиновые и аспартатные пептидазы (исключение составляют только специализированные органеллы гранулоцитов и сперматозоидов) [32-35]. Около 90% активности катепсина D (клан AA, семейство пепсина A1), основной аспартатной эндопептидазы лизосом, обнаруживается в растворимой фракции, 20% ассоциировано с мембранами эндосом [16]. Значение молекулярной массы катепсина D из разных источников варьирует в диапазоне 44–68 кДа, при этом последовательности в области протеолитического модуля высокоомологичны [16]. Аминокислотные последовательности внутриклеточного катепсина D и внеклеточных аспартатных пептидаз высокоомологичны в N-концевой и в области активного центра; также сходна четвертичная структура этих ферментов. Однако в C-концевой области катепсина D присутствует уникальный гидрофобный “хвост”, включающий около 100 аминокислотных остатков. Предшественник катепсина D имеет молекулярную массу 100 кДа, что отличает его от зимогенов аспартатных пептидаз желудка (около 40 кДа). Конформация полипептидной цепи аспартатных пептидаз включает две симметричные области, каждая из которых, в свою очередь, состоит из двух гомологичных структурных единиц. Эта особенность указывает на то, что предковый ген кодировал 80-членный полипептид, и что генная дупликация и слияние происходили дважды с образованием одноцепочечной аспартатной пептидазы, включающей четыре основные структурные единицы. Образование зимогенов и “хвоста” катепсина D – результат слияния различных генов. Анализ последовательностей также свидетельствует о том, что катепсин D может быть эволюционным предшественником аспартатных ферментов желудка [16].

Наиболее полно охарактеризованная цистеиновая эндопептидаза лизосом – катепсин В, обладающий также карбоксипептидазной активностью [35-37]. Эта последняя способность последовательно высвобождать дипептиды с C-конца белков-субстратов, предположительно, обусловлена наличием 20-аминокислотной инсерции, называемой блокирующей петлей, которая блокирует пропептид в щели активного центра. Результаты экспрессии мутантных белков [38] свидетельствуют о том, что эндопептидазная активность катепсина В – эволюционно архаичная черта, поскольку, вследствие принадлежности катепсина В к семейству папаина, пропептид должен связываться по всей длине щели активного центра [39].

Исследования протеолитического аппарата лизосом эукариот, различающихся филогенетическим положением (гидра, планария, беззубка, форель, лягушка, кура, крыса), показали, что у организмов ранних ступеней эволюционного развития с преобладающим внутриклеточным типом пищеварения (гидроиды, турбеллярии) протеолитическая активность в лизосомах принадлежит

почти исключительно катепсину D, в то время как на более поздних этапах развития квота активности катепсина D снижается (в 4-10 раз), наряду с этим, возрастает уровень активности других пептидаз (катепсинов A, B1 и C) [40]. Увеличение “квоты” протеиназ с более узкой субстратной специфичностью является, по-видимому, отражением участия лизосом в реализации специализированных физиологических функций.

В цитоплазме клетки протекает так называемый “нелизосомальный” путь деградации белков, включающий Ca^{2+} -активируемую и убиквитин- и АТР-зависимую системы.

6. КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ.

Кальпаины, или внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеолитические ферменты, участвуют в регуляции различных клеточных путей, включая передачу сигналов, процессинг, динамику цитоскелетных белков и гомеостаз мышечной ткани [41]. Кальпаиновая система позвоночных включает три повсеместно экспрессируемые молекулы: две Ca^{2+} -зависимые пептидазы, μ -кальпаин и m -кальпаин (требуют 40-100 мкМ и 1-5 мМ Ca^{2+} для проявления максимальной активности *in vitro* соответственно) и полипептид кальпаистатин - специфичный ингибитор обоих кальпаинов. Аминокислотные последовательности μ - и m -кальпаинов позвоночных животных высоко консервативны (гомология кальпаинов млекопитающих составляет более 90%), а спектр расщепляемых ими субстратов сходен, если не идентичен [9, 11]. С учетом данных ингибиторного анализа, ферменты относят к клану цистеиновых пептидаз CA, а гомология аминокислотной последовательности и общий план структурной организации позволяют выделить кальпаины в индивидуальное семейство C2 [11, 12, 42]. Структурный анализ m -кальпаина показал, что он и, по всей видимости, μ -кальпаин, каталитически неактивны в отсутствие Ca^{2+} , поскольку три остатка, составляющие каталитическую триаду кальпаинов, Cys, His и Asn, в свободном от Ca^{2+} состоянии разобщены так, что формирование функционально активного центра невозможно [43]. Сравнительные исследования чувствительности кальпаинов к активатору, Ca^{2+} , показали, что она повышается среди позвоночных по мере их эволюционного развития [44].

К настоящему времени у млекопитающих идентифицированы 12 дополнительных мРНК, которые кодируют гомологи каталитической субъединицы μ - и m -кальпаинов, экспрессия большинства из них тканеспецифична [9, 11, 42]. Эти гомологи кальпаинов отличаются структурой, способом экспрессии и энзиматической активностью. Некоторые из них вовлечены в важные биологические процессы. Например, кальпаин 3а млекопитающих (или p94), преимущественно синтезируемый в скелетных мышцах, имеет первостепенное значение в обмене миофибриллярных белков, а его функциональный дефект приводит к развитию генетически детерминированной мышечной дистрофии типа 2А [9, 14].

Генные последовательности кальпаин-подобных молекул были обнаружены и у других организмов: дрозофилы, нематоды *C. elegans*, паразитарных кинетопластид, грибов, растений *Arabidopsis thaliana* и других [9, 45, 46]. Большинство молекул, кодируемых этими мРНК, еще не выделены, поэтому об их свойствах известно очень немного [11]. Высоко вариабельная структура обнаруженных последовательностей кальпаинов и кальпаин-подобных молекул свидетельствует о широком разнообразии выполняемых ими клеточных функций.

Проведены филогенетические исследования эволюционного источника разнообразия белков семейства кальпаинов. Предполагают [41, 47], что классический четырехдоменный полипептид кальпаинов эволюционно произошёл в результате слияния генов протеолитического модуля цистеиновой пептидазы (домен II), протеинкиназа С-подобной последовательности (C2-подобный домен III) и кальмодулин-подобной последовательности (домен IV, несущий пять

ЭВОЛЮЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Ca²⁺-связывающих EF-hand-мотивов) (рис. 5). В структуре атипичных кальпаинов консервативный Ca²⁺-связывающий домен IV замещен на специфичные домены (гомологи Tra-3, PalB, SOL).

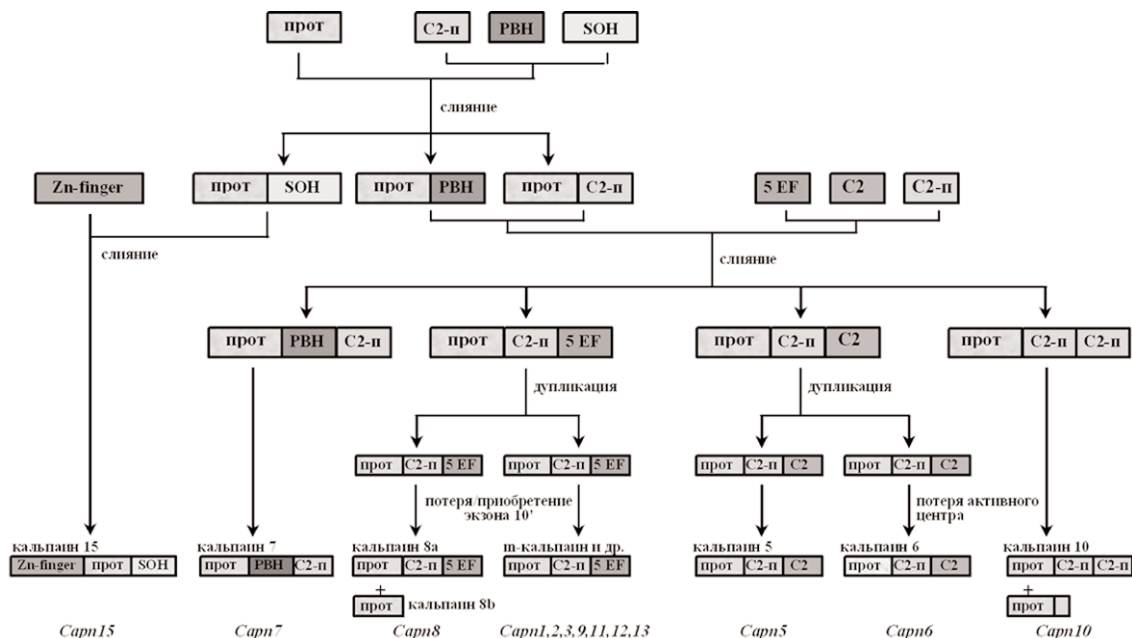


Рисунок 5.

Предполагаемая эволюция ферментов семейства кальпаина C2 млекопитающих (по [47], адаптировано и дополнено). Сокращения названий доменов: прот – каталитический (домен II), C2-п – C2-подобный (домен III), 5EF – Ca²⁺-связывающий домен, содержащий 5EF-hand-мотивов (домен IV), C2 – C2-домен (или T-домен), Zn-finger – Zn-finger-подобный домен, PVB – PalB-гомологичный, SOH – SOL-гомологичный. Каталитический домен кальпаина 6 предположительно не обладает каталитической активностью.

Протеолитический модуль кальпаин-подобных молекул высоконсервативен, хотя критические остатки активного центра в ряде молекул замещены. Отсутствие одного или более остатков типичной каталитической триады цистеиновых пептидаз – Cys, His, Asn, указывает на выполнение этими гомологами кальпаинов определенной функции, отличной от протеолитической [48].

Показано, что эндогенный ингибитор кальпаинов – кальпастатин – Ca²⁺-зависимым образом связывается только с гетеродимерными молекулами кальпаинов (μ-, m-кальпаины, кальпаин 9) [11]. Одноцепочечные кальпаины не инактивируются кальпастатином из-за отсутствия одного из кальпастатин-связывающих сайтов [11]. Единый ген кальпастатина является источником восьми и более полипептидов [46], физиологическое значение которых остается неизвестным. Кальпастатин, в свою очередь, подвергается деградации внутриклеточной протеолитической системой, являясь субстратом пептидаз, включая кальпаины. Характерно, что у беспозвоночных не обнаружены ни активность, ни генные последовательности кальпастатина [11]; по всей видимости, кальпастатин присутствует только у позвоночных.

Анализ филогенетического дерева кальпаинов и хромосомной локализации генов кальпаинов у человека показал, что отдельные акты генной дупликации произошли ранее дивергенции линий первично- и вторичноротых [49], а другие,

приведшие к образованию специфичных для позвоночных форм кальпаинов, – в ранней эволюции хордовых. Обобщая данные филогенетического анализа, сведения о периодах геной дупликации и о локализации генов кальпаинов, авторы [41] предложили модель тандемных и хромосомных дупликаций в эволюции форм кальпаинов, специфичных для позвоночных. Модель согласуется с предполагаемыми сценариями эволюции других мультигенных семейств.

7. АТР-ЗАВИСИМЫЙ ПРОТЕОЛИЗ. ПРОТЕАСОМА.

Все про- и эукариотические клетки содержат протеасомы, осуществляющие селективную энергозависимую деградацию белков и регулирующие важнейшие клеточные процессы [27, 50-54]. Термин “протеасома” отражает как протеолитическую функцию, присущую этому мультисубъединичному комплексу, так и его природу как дискретной частицы – сомы [53].

Известно несколько форм протеасом, различающихся структурно и по своей физиологической роли. 26S протеасома осуществляет АТР-зависимый гидролиз убиквитинированных белков. Она образована протеолитическим “ядром” (или 20S протеасомой) и двумя регуляторными частицами 19S (или PA700). 20S протеасома – это полая цилиндрическая структура, состоящая из четырех лежащих друг на друге 7-членных колец, образованных белковыми субъединицами α - и β -типов (молекулярная масса 20–35 кДа). Гидрофобные N-концы α -колец препятствуют случайному проникновению белков во внутреннюю полость цилиндра, а β -субъединицы содержат каталитические центры, обращенные внутрь камеры. Протеасома архебактерии *Thermoplasma acidophilum* – прототип четвертичной структуры и топологии фермента. Ее 28 субъединиц представлены гомологичными продуктами (α и β) двух генов, каждый из которых представлен в 14 копиях на частицу (рис. 6). У эукариот субъединицы являются продуктами 14 разных генов, из которых 7 гомологичны α -субъединице и 7 – β -субъединице архебактерии. Вариабельным β -субъединицам протеасом эукариот свойственны три основные пептидазные активности (трипсин-, каспаза- и химотрипсин-подобная), в то время как предковым протеасомам археев и бактерий – только химотрипсин-подобная [12, 28, 54].

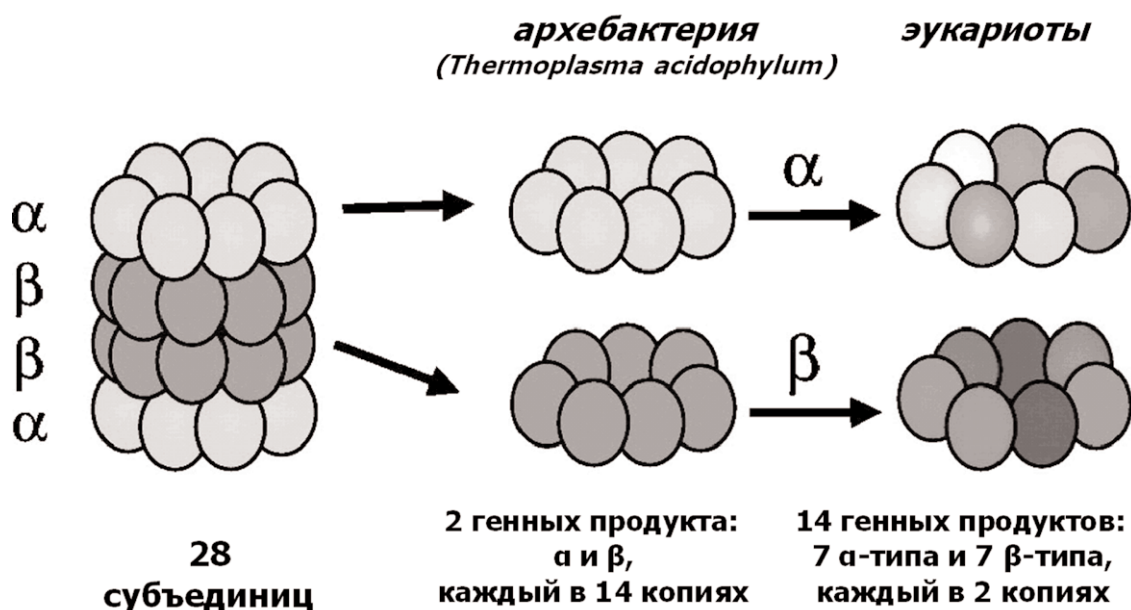


Рисунок 6.

Структурная организация протеолитического ядра – 20S протеасомы – археев и эукариот (по [54]).

Клетки эукариот содержат различные типы протеасом: 26S-протеасому, которая состоит из протеолитического ядра 20S и одной или двух регуляторных субъединиц PA700 и расщепляет белки по АТР- и убиквитин-зависимому пути; 20S-протеасому, которая, с одной стороны, является энзиматическим ядром 26S-протеасомы, а, с другой стороны, присутствует в клетках и как свободная частица, расщепляющая полипептиды АТР-независимым образом; гибридную протеасому, состоящую из ядра 20S и двух различных активаторов PA700 и PA28, а также 20S протеасому в комплексе с двумя молекулами активатора PA28. Эти формы протеасомы отличаются субстратной специфичностью (убиквитинированные белки, короткоживущий фермент орнитиндекарбоксилаза, казеин, модельные полипептиды) и зависимостью активности от АТР. Множественность форм протеасомы обуславливает, по всей видимости, разнообразие ее функций в клетке. Известно, что 26S протеасома, осуществляя убиквитин-зависимый протеолиз большинства белков в клетке (до 90% всех короткоживущих и около 70% долгоживущих белков), участвует в иммунном ответе, регуляции клеточного цикла и деления, уровня онкобелков и белков-супрессоров опухоли, процессах транскрипции, репарации ДНК, апоптозе, дифференцировке и эмбриогенезе [10]. Нарушения в протеасомной системе приводят к развитию многих заболеваний человека, как врожденных, так и приобретенных. Среди них известны различные формы мышечных дистрофий, мужская стерильность, некоторые формы злокачественного перерождения, нейродегенеративные заболевания (некоторые формы болезни Альцгеймера), нарушения иммунного и воспалительного ответа при вирусной и бактериальной инфекции. Полагают, что изменения в функциональной активности протеасомного пути деградации белков – причина накопления окисленных белков при старении [55]. Известно, что истощение пула АТР вызывает внутриклеточную аккумуляцию Ca^{2+} и, как следствие, активацию Ca^{2+} -зависимых протеиназ.

Таким образом, в процессе эволюции сформировалась система протеолиза, включающая комплекс протеолитических ферментов, выполняющих различные функции в организме. Трансформируя или отвечая на внешний сигнал запуском внутриклеточных каскадов реакций, пептидазы участвуют в осуществлении направленных изменений функций клеток, связанных с качественными изменениями обмена. Эти процессы могут лежать в основе клеточной дифференцировки и трансформации, адаптивной перестройки обмена и множества других биологических процессов.

Сравнение пептидаз с разными типами катализа показало существование эволюционных линий, различающихся организацией каталитического ядра и третичной структурой. Эволюционным источником многих пептидаз высших эукариот являются пептидазы прокариот. Для цистеиновых и аспартатных пептидаз такие примеры малочисленны. Повышение специализации пептидаз в ходе эволюции достигается как за счет усложнения структуры и регуляторных механизмов контроля активности пептидаз (слияние функционально различных доменов, усложнение субъединичного состава, повышение субстратной специфичности, приобретение эндогенных ингибиторов, повышение чувствительности к активаторам), так и за счет вторичного упрощения структурной организации. Существование пептидаз как с так называемыми “примитивными”, так и с “прогрессивными” характеристиками свидетельствует о разнородности среды их функционирования и уникальности выполняемых функций. К настоящему времени идентифицировано множество последовательностей пептидаз, белковые продукты которых еще не выделены, поэтому об их структурных и биологических характеристиках известно мало. Можно надеяться, что в дальнейших молекулярно-генетических, физиолого-биохимических исследованиях пептидаз у разных типов живых организмов будет получена новая информация о структурно-функциональной организации, механизмах катализа известных пептидаз и их гомологов, что позволит составить более полное представление об эволюции и функциях протеолиза.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (05-04-48729а), гранта Программы Президента РФ “Ведущие научные школы” (НШ-4310.2006.4), гранта ФЦП ГК №02.515.11.5054.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мосолов В.В. (1971) Протеолитические ферменты. Наука, М.
2. Мосолов В.В. (1988) Успехи биол. хим., **28**, 125–144.
3. Антонов В.К. (1983) Химия протеолиза. Мир, М.
4. Дин Р. (1981) Процессы распада в клетке. Мир, М.
5. Bohley P. (1987) in: *Hydrolytic Enzymes* (A. Neuberger and K. Brocklehurst eds.) Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), pp. 307–332.
6. Локишина Л.А. (1979) Мол. биол., **13**, 1205–1229.
7. Эпель Д. (1992) Онтогенез, **23**(3), 213–227.
8. Волкова Т.О., Немова Н.Н. (2005) Молекулярные механизмы апоптоза лейкозной клетки. Наука, М.
9. Бондарева Л.А., Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И. (2006) Внутриклеточная Ca^{2+} -зависимая протеолитическая система животных. Наука, М.
10. Mayer R.J., Arnold J., Laszlo L., Landon M., Lowe J. (1991) Biochim. Biophys. Acta, **1089**(2), 141–157.
11. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. (2003) Physiol. Rev., **83**(3), 731–801.
12. Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. (2006) Nucleic Acids Res., **34**, D270–D272.
13. Rawlings N.D., O’Brien E., Barrett A.J. (2002) Nucleic Acids Res., **30**(1), 343–346.
14. Richard I. (2005) J. Med. Genetics, **42**, 529–539.
15. Rawlings N.D., Barrett A.J. (1993) Biochem. J., **290**(1), 205–218.
16. Tang J., Wong R.N.S. (1987) J. Cell. Biochem., **33**(1), 53–66.
17. Panthier J.J., Foote S., Chambraud B., Strosberg A.D., Corvol P., Rougeon F. (1982) Nature, **298**(5869), 90–92.
18. Fujinaga M., Cherney M.M., Oyama H., Oda K., James M.N.G. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**(10), 3364–3369.
19. Massova I., Kotra L.P., Fridman R., Mobashery S. (1998) FASEB J., **12**, 1075–1095.
20. Harrison M., Abu-Elmagd M., Grocott T., Yates C., Gavrilovic J., Wheeler G.N. (2004) Dev. Dyn., **232**(1), 200–214.
21. Somerville R. P.T., Oblander A., Apte S.S. (2003) Gen. Biol., **4**(6), 216–221.
22. Tang B.L. (2001) Int. J. Biochem. Cell. Biol., **33**(1), 33–44.
23. Apte S.S. (2004) Int. J. Biochem. Cell. Biol., **36**, 981–985.
24. Nicholson A.C., Malik S.B., Logsdon J.M.Jr., Van Meir E.G. (2005) BMC Evol. Biol., **5**(1), 11.
25. Abrahamson M., Alvarez-Fernandez M., Nathanson C.-M. (2003) Biochem. Soc. Symp., **70**, 179–199.
26. Silverman G.A., Whisstock J.C., Askew D.J., Pak S.C., Luke C.J., Cataltepe S., Irving J.A., Bird P.I. (2004) Cell. Mol. Life Sci., **61**(3), 301–325.
27. Hershko A., Ciechanover A. (1998) Annu. Rev. Biochem., **67**, 425–479.
28. Lupas A., Zühl F., Tamura T., Wolf S., Nagy I., DeMot R., Baumeister W. (1997) Mol. Biol. Reports, **24**, 125–131.
29. Мухин В.А. (1998) Протеолитические ферменты в тканях некоторых морских беспозвоночных: Дисс. канд. наук. Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва.
30. Бондарева Л.А. (2004) Влияние некоторых факторов среды на внутриклеточный протеолиз у гидробионтов. Дисс. канд. наук. КГПУ, Петрозаводск.

ЭВОЛЮЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

31. *Hamazaki H.* (1996) FEBS Lett., **396**, 139-142.
32. *Немова Н.Н.* (1996) Внутриклеточные протеолитические ферменты рыб. Изд-во КарНЦ РАН, Петрозаводск.
33. *Немова Н.Н., Бондарева Л.А.* (2004) Протеолитические ферменты: Учебное пособие. Изд-во КарНЦ РАН, Петрозаводск.
34. *Короленко Т.А., Жанаева С.Я., Потеряева О.Н., Свечникова И.Г., Фаламеева О.В., Халикова Т.А., Ярыгина Е.С., Гончарова И.А.* (2004) Бюлл. СО РАМН, **2**, 130-134.
35. *Barrett A.J.* (1977) Proteinases in mammalian cells and tissues. Amsterdam, North Holland.
36. *Mort J.S., Buttle D.J.* (1997) Int. J. Biochem. Cell. Biol., **29**(5), 715-720.
37. *Song J., Xu P., Xiang H., Su Z., Storer A.C., Ni F.* (2000) FEBS Lett., **475**, 157-162.
38. *Chagas J.R., Di Martino M.F., Gauthier F., Lalmanach G.* (1996) FEBS Lett., **392**, 233-236.
39. *Illy C., Quaraishi O., Wang J., Purisima E., Vernet T., Mort J.S.* (1997) J. Biol. Chem., **272**(2), 1197-1202.
40. *Тутельян В.А., Васильев С.В.* (1982) Ж. эвол. биохим. физиол., **18**(2), 113-118.
41. *Jékely G., Friedrich P.* (1999) J. Mol. Evol., **49**(2), 272-281.
42. *Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H.* (2004) Diabetes, **53**(1), S12-S18.
43. *Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M., Huber R., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K., Bode W.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 588-592.
44. *Nemova N.N., Kaivarainen E.I., Bondareva L.A.* (2000) Vestn. Mosk. Univ. Khimia, **41**(6), 106-108.
45. *Sorimachi H., Suzuki K.* (2001) J. Biochem., **129**, 653-664.
46. *Croall D.E., Ersfeld K.* (2007) Genome Biol. **8**(6), 218.
47. *Hata S., Nishi K., Kawamoto T., Lee H.-J., Kawahara H., Maeda T., Shintani Y., Sorimachi H., Suzuki K.* (2001) J. Mol. Evol., **53**, 191-203.
48. *Бондарева Л.А., Немова Н.Н.* (2007) Биоорг. хим. (в печати).
49. *Hughes A.L.* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**(25), 8791-8792.
50. *Parr T., Sensky P.L., Bardsley R.G., Buttery P.J.* (2001) Arch. Biochem. Biophys., **395**, 1-13.
51. *Абрамова Е.Б., Шарова Н.П., Карпов В.Л.* (2002) Мол. биол., **36**(5), 761-776.
52. *Шарова Н.П., Астахова Т.М., Бондарева Л.А., Дмитриева С.Б., Ерохов П.А.* (2006) Биохимия, **71**(9), 1278-1286.
53. *Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L.* (1996) Annu. Rev. Biochem., **65**, 801-847.
54. *DeMartino G.N., Slaughter C.A.* (1999) J. Biol. Chem., **274**(32), 22123-22126.
55. *Keller J.N., Hanni K.B., Markesbery W.R.* (2000) Mech. Ageing Dev., **113**, 61-70.

Поступила: 06. 11. 2007.

TO THE PROBLEM OF PROTEOLYTIC ENZYME EVOLUTION

N.N. Nemova, L.A. Bondareva

Institute of Biology, Karelian Research Centre of RAS, Pushkinskaya ul., 11, Petrozavodsk,
185910 Russia; tel.: 8142 783615; fax: 8142 769810; e-mail: nemova@krc.karelia.ru

Own and literature data on putative evolution of proteolytic enzymes have been reviewed. Modern principles of peptidase classification based on evaluation of homology of more than 66 thousand gene sequences and similarity of general structural organization of almost 2.5 thousands of known enzymes are considered. The review highlights not only evolutionary interrelationships inside related peptidase families, their possible evolutionary background, but also evolutionary determined differences in certain proteolytic pathway in organisms belonging to different taxons.

Key words: proteolytic enzymes, classification, molecular evolution.