

УДК: 577.152.3

©Семенова, Руденская

СЕМЕЙСТВО АСТАЦИНОВЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ

С.А. Семенова*, Г.Н. Руденская

МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3.; тел.: (495) 939-55-41; факс: (495) 939-31-81; эл. почта: proteazniki2005@yahoo.com.

В обзоре рассмотрены свойства цинковых металлопротеиназ, принадлежащих к семейству астацина. Эти ферменты обладают ариламидазной активностью, нехарактерной для металлопротеиназ. Особое внимание уделено физиологическим функциям протеиназ семейства астацина и влиянию доменного состава и посттрансляционных модификаций на активность и стабильность этих ферментов.

Ключевые слова: астацин, металлопротеиназа, межклеточный матрикс.

ВВЕДЕНИЕ. Астациновые протеиназы – это цинковые металлопротеиназы, встречающиеся в различных организмах (от бактерий до млекопитающих) и участвующие в процессах формирования межклеточного матрикса, морфогенеза, пищеварения. В 90-х годах XX века эти ферменты были выделены в самостоятельное семейство, получившее свое название от пищеварительной металлопротеиназы речного рака *Astacus astacus*. Астациновые протеиназы обладают ариламидазной активностью, нехарактерной для металлопротеиназ. Субстратная специфичность и доменный состав ферментов семейства астацина значительно более разнообразны, чем у представителей семейства термолитина или тканевых металлопротеиназ.

Классификация металлопротеиназ, основанная на структуре цинк-связывающего мотива, относит астацины к цинкинам. В этой группе, в которую входят хорошо изученные семейства термолитина и тканевых металлопротеиназ, по современной классификации MEROPS, выделяют кланы глюцинкинов и метцинкинов (рис. 1).

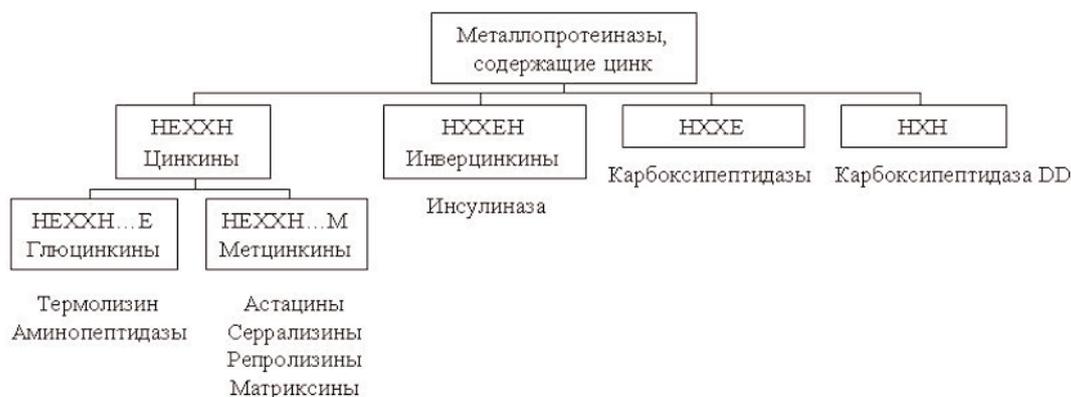


Рисунок 1.

Классификация металлопротеаз, основанная на структуре цинк-связывающих мотивов (по [1]).

* - адресат для переписки

В ферментах клана глюцинкинов цинк-связывающими лигандами являются остатки гистидина, входящие в состав мотива HEXXH, и остаток глутаминовой кислоты, расположенный ближе к карбоксильному концу молекулы, чем мотив HEXXH. К этому клану относятся термолизин, тимет-олигопептидаза, нейротоксины возбудителей столбняка и ботулизма, ангиотензин-превращающий фермент.

Клан метцинкинов включает астациновые металлопротеиназы, сепрализины (ферменты бактерий из родов *Serratia*, *Erwinia* и *Pseudomonas*), тканевые металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMP) и семейство адамализинов/ADAM (обозначение образовано от словосочетания *a disintegrin and metalloprotease*) [1]. В ферментах этого клана цинк координирован тремя остатками гистидина, два из которых входят в состав мотива HEXXH, и остатком глутаминовой кислоты (через молекулу воды). В астацинах и сепрализинах лигандом для цинка также является остаток тирозина. Общий структурный элемент всех метцинкинов - метиониновый поворот (1,4- β -поворот, включающий строго консервативный остаток метионина). Семейства астацинов, MMP и сепрализинов достаточно близки друг к другу по первичной структуре, а семейство адамализинов занимает обособленное положение [2]. Некоторые структурные особенности метцинкинов – например, топология аминоконцевого домена – сближают их с ферментами семейства термолизина.

Астацин – пищеварительный фермент из речного рака – был впервые описан в 1967 году. Термин “астацины” также обозначает пигменты – производные β -каротина, впервые полученные из речного рака [3].

К настоящему времени выделено и изучено более двадцати астацинов из бактерий, беспозвоночных и позвоночных животных. При анализе базы данных аминокислотных последовательностей NCBI в 2006 году было обнаружено более 900 последовательностей, сходных с онхоастацином – ферментом паразитического червя *Onchocerca volvulus* [4]. Следует отметить, что у растений и вирусов не было обнаружено ни протеиназ, относящихся к семейству астацина, ни генов, кодирующих такие ферменты [5].

Астацины участвуют в различных физиологических процессах – пищеварении, процессинге внеклеточных белков, морфогенезе, вылуплении мальков рыб (ферменты, участвующие в этом процессе, называются хориолизинами) [6].

1. СТРУКТУРА, ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА И ЛОКАЛИЗАЦИЯ АСТАЦИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ.

1.1. Пространственная структура астациновых металлопротеиназ.

В настоящее время пространственная структура известна только для одного представителя семейства – астацина речного рака. Она была установлена методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,18 нм (рис. 2). Молекула фермента имеет почкообразную форму; активный центр расположен в глубокой впадине между субдоменами. В состав аминоконцевого субдомена входят протяженные α -спиральные участки и β -тяжи. Карбоксиконцевой субдомен в основном состоит из участков нерегулярной структуры и включает много поворотов.

Аминный конец молекулы погружен внутрь карбоксиконцевого субдомена, а карбоксильный конец сближен с аминоконцевым субдоменом и ковалентно связан с ним дисульфидным мостиком между остатками цистеина Cys-42 и Cys-198. Эта дисульфидная связь имеет большое значение для поддержания пространственной структуры фермента, так же как и связь Cys-64-Cys-84, необходимая для формирования субстрат-связывающей зоны [7] (рис. 2). Протеолитический домен белка морфогенеза костной ткани-1 (BMP-1) и родственных ему белков содержит три дисульфидные связи: связь Cys-63-Cys-66, отсутствующая в других астациновых протеиназах, играет важную роль в формировании структуры S1-участка связывания субстрата [8].

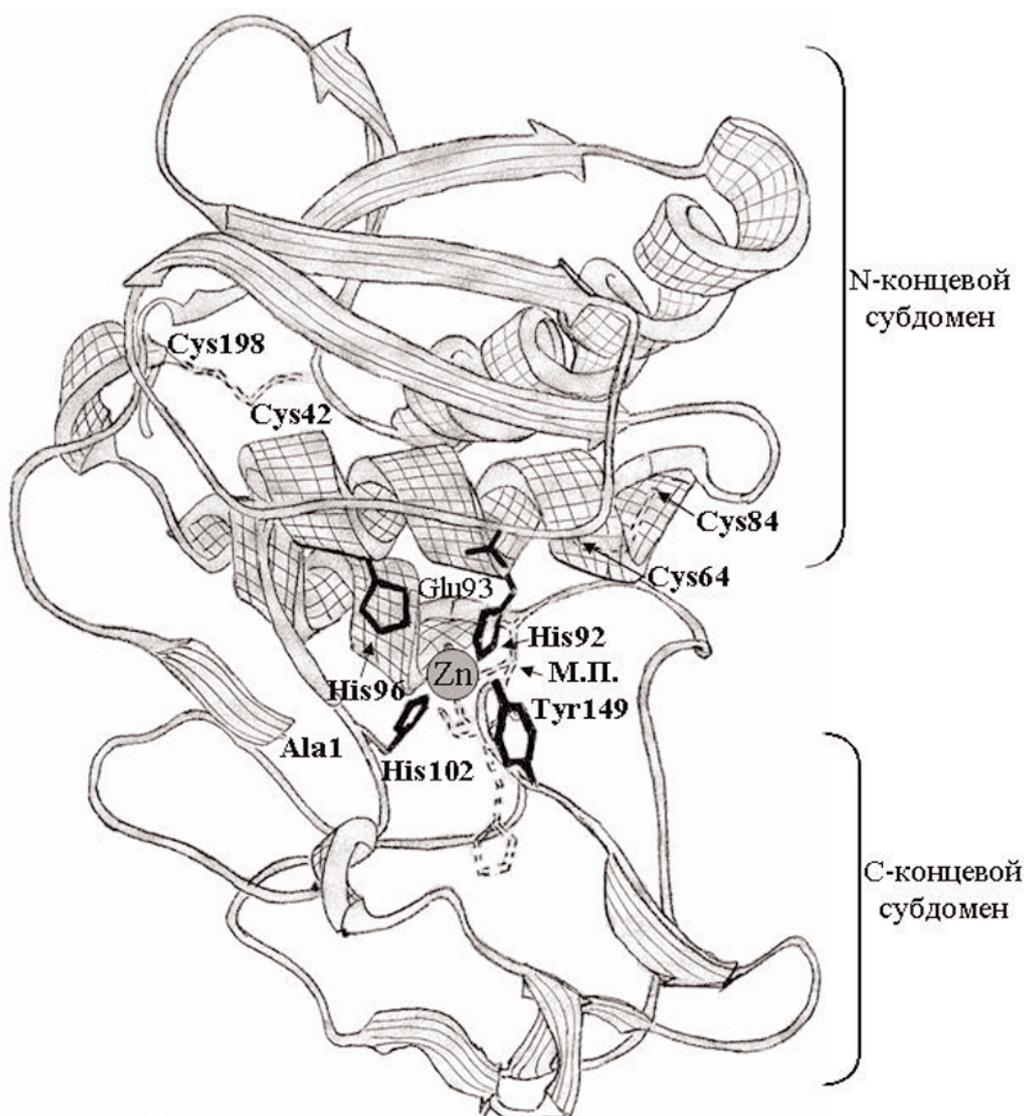


Рисунок 2.

Ленточная модель структуры астацина рака (модель построена с помощью программы SwissPDB Viewer на основе структуры астацина (LAST) из базы данных Protein Data Bank).

Участки β -структуры отмечены продольной штриховкой, α -спиральные участки отмечены сетчатой штриховкой; боковые цепи остатков, координирующих катион цинка, показаны черным цветом. “М.П.” - метиониновый поворот (показан пунктирными линиями). Дисульфидные связи показаны пунктирными линиями.

Роль консервативного остатка метионина, входящего в состав “метионинового поворота”, представляет большой интерес, так как метионин обычно не является консервативным. Анализ структуры астацина речного рака [7], а также эксперименты по замене консервативного остатка метионина в молекулах желатиназы А [9] и металлопротеиназы *Erwinia chrysanthemi* [10], относящихся, как и астациновые протеиназы, к клану метцинкинов, не позволили однозначно установить, с какими участками молекулы взаимодействует этот остаток. Необходимо отметить, что в ферментах кальмара *Todarodes pacificus* ALSM-II и ALSM-III, относящихся к семейству астацина, консервативный остаток метионина заменен треонином [11].

АСТАЦИНОВЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ

При активации предшественников астациновых металлопротеиназ возможно погружение N-концевой аминокислотной группы в полость С-концевого субдомена протеолитического домена и образование “солевого мостика” между этой аминокислотной группой и карбоксигруппой остатка глутаминовой кислоты (Glu103 в астацине рака), расположенного рядом с остатком гистидина, координирующим ион цинка (His102 в астацине рака). Эксперименты с мутантными формами α -субъединицы меприна человека показали, что нарушение этого “солевого мостика” путем замены остатка глутаминовой кислоты или удлинения N-конца белка уменьшает активность фермента, но не приводит к полной инактивации. Нарушение “солевого мостика” в молекуле астацина рака приводит к уменьшению термостабильности фермента [12].

Молекулы многих астациновых металлопротеиназ содержат по несколько доменов [6]. Каталитический и субстрат-связывающий домены в молекулах этих ферментов не обособлены: многие пищеварительные протеиназы из семейства астацина содержат лишь один домен, называемый протеолитическим. Функции дополнительных доменов включают взаимодействие с регуляторными белками и закрепление белка в мембране (в случае β -субъединицы меприна); некоторые аминокислотные остатки, расположенные в этих доменах, участвуют в связывании протяженных субстратов, влияя таким образом на специфичность ферментов.

Схема расположения доменов в различных ферментах семейства астацина представлена на рисунке 3.

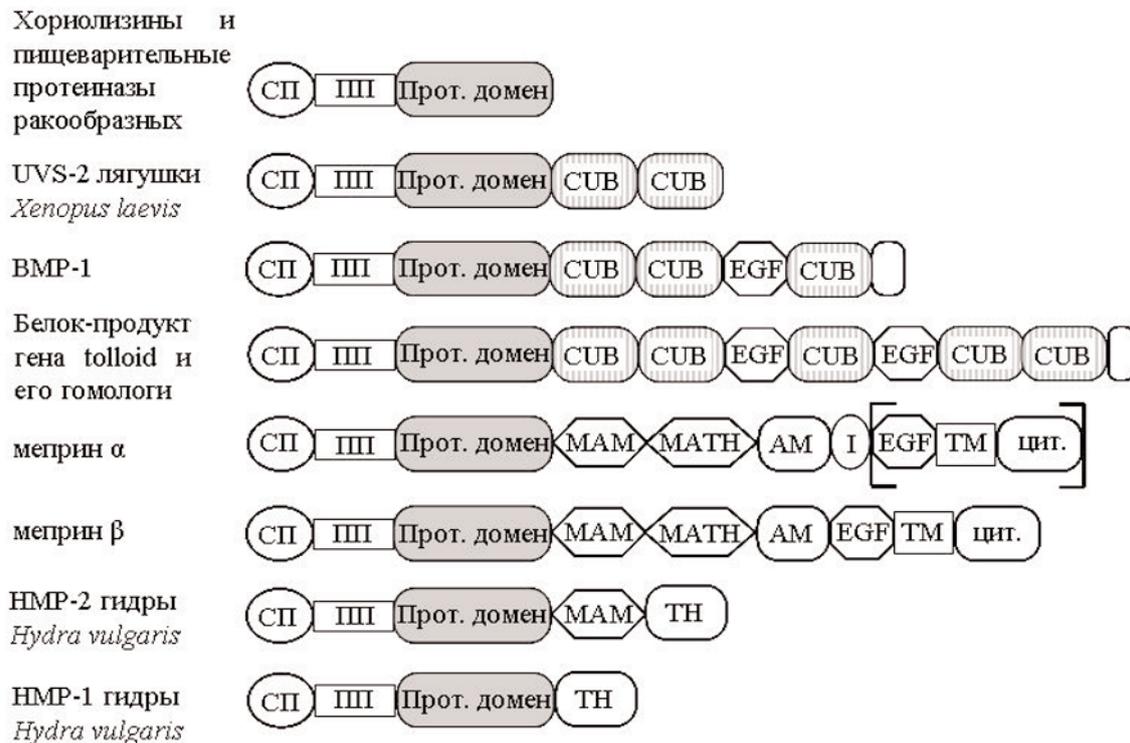


Рисунок 3.

Домены в молекулах проферментов астациновых протеиназ.

Квадратными скобками отмечены домены меприна α , отщепляемые при посттрансляционной модификации (в эндоплазматическом ретикулуме [6]).

СП – сигнальный пептид; ПП – пропептид; прот. домен – протеолитический домен,

ТМ – трансмембранный домен, цит. – цитоплазматический домен.

Протеолитический домен является N-концевым доменом в зрелых ферментах. Первичная структура этого домена не менее чем на 30% совпадает с первичной структурой астацина речного рака [13].

В состав молекул многих астациновых протеиназ входят CUB- и EGF-домены; для мепринов характерно присутствие МАМ- и МАТН-доменов. Все эти домены состоят в основном из участков β -структуры и чаще всего входят в состав секретируемых белков или внеклеточных участков трансмембранных белков.

CUB-домены, содержащие 100–110 аминокислотных остатков, получили свое название от протеиназ - компонентов комплемента C1r/C1s, белка Uegf - аналога фактора роста эпидермиса из морского ежа и ферментов, родственных BMP-1. Эти домены встречаются в белках, участвующих в ангиогенезе, регенерации тканей и передаче нервных импульсов. EGF-домены, гомологичные фактору роста эпидермиса, содержат 30–40 аминокислотных остатков и стабилизированы тремя дисульфидными связями. Эти домены могут связывать катионы Ca^{2+} и участвуют в белок-белковых взаимодействиях [6].

МАМ-домены входят в состав мепринов, белка А-5 лягушки *Xenopus laevis* и тирозинфосфатазы μ . Остатки цистеина, входящие в состав этих доменов, участвуют в образовании дисульфидных связей между субъединицами меприна. МАТН-домены, содержащие около 180 аминокислотных остатков, встречаются в мепринах и белке TRAF (TNF receptor associated factor) [6]. МАМ- и МАТН-домены участвуют в гомоолигомеризации белков и их взаимодействии с рецепторами.

В астацинах нематоды *Caenorhabditis elegans* обнаружены тромбоспондин-подобные повторы типа I, характерные для металлопротеиназ семейства ADAM-TS и не входящие в состав молекул других изученных к настоящему времени астацинов [14]. Функция этих мотивов в ферментах семейства ADAM-TS – связывание протеогликанов межклеточного матрикса [15]; вероятно, в ферментах нематоды эти мотивы выполняют сходные функции.

В молекуле флавастацина – секретируемой протеиназы бактерии *Flavobacterium meningosepticum* [16] – присутствует домен, гомологичный ризицину – токсичному лектину клещевины *Ricinus communis*. Карбоксиконцевой домен овастацина – фермента из яичников человека, крыс и мышей [17] – гомологичен одному из белков вируса ТТ, поражающего человека.

В состав металлопротеиназ нематоды *C. elegans* (NAS-6, NAS-15, NAS-31, NAS-32), пресноводной гидры *Hydra vulgaris* [18], актинии *H. echinata* [19], медузы *Podocoryne carnea* [20] и устрицы *Pinctada fucata* [21] входит небольшой домен, содержащий 6 остатков цистеина, и гомологичный токсину морской анемоны, действующему на натриевые каналы. Этот (ТН, toxin homology) домен не идентичен EGF-подобному домену или другим Cys-богатым доменам. Возможно, взаимодействие этого домена, входящего в состав протеиназы медузы, с белками жертвы приводит к ее парализации [20]. ТН-домен астацина устрицы необходим для участия фермента в пролиферации клеток [21].

1.2. Влияние доменной структуры на транспорт и процессинг астациновых протеиназ.

Удаление некаталитических доменов из молекул многодоменных астациновых протеиназ в большинстве случаев приводит к нарушению процессинга, внутриклеточного транспорта и секреции ферментов, а также к уменьшению их стабильности.

Мутантные формы α -меприна, не содержащие одного или нескольких карбоксиконцевых доменов, подвержены протеолитической деградации. Отсутствие МАМ или МАТН-доменов отрицательно сказывается на формировании третичной структуры белков и приводит к быстрому разрушению мутантных белков протеасомой (при отсутствии МАМ-домена) или невозможности активации проферментов (при отсутствии МАТН-домена). Функция АМ (“after МАТН”)-домена не установлена: возможно, он просто увеличивает расстояние между активным центром фермента и клеточной мембраной [22].

Обе субъединицы меприна мыши синтезируются как трансмембранные белки, но α -субъединица теряет трансмембранный и цитоплазматический домены при посттрансляционной модификации и секретируется. Возможность процессинга

зависит от наличия в молекуле I(“insertion”)-домена: мутантная α -субъединица, в которой I-домен отсутствует, удерживается в клетке, а встраивание I-домена в молекулу β -субъединицы приводит к ее расщеплению и секреции [23].

Трансмембранный и цитоплазматический домены α - и β -субъединиц мепринов содержат сигнальные последовательности, регулирующие внутриклеточный транспорт этих белков [24, 25]. Замена трансмембранного и цитоплазматического доменов α - или β -субъединицы на соответствующий фрагмент другой субъединицы приводит к уменьшению эффективности процессинга мутантных белков в эндоплазматическом ретикулуме, скорости их транспорта и секреции [24].

Цитоплазматический домен β -субъединицы меприна человека содержит участки фосфорилирования для протеинкиназы C (TRR) и кальмодулин-киназы (RANT) [25]. Фосфорилирование этого белка под действием протеинкиназы C подтверждено экспериментально [26].

1.3. Влияние доменной структуры на энзиматические свойства астацинов.

В большинстве случаев удаление одного или нескольких некаталитических доменов из молекул астациновых металлопротеиназ приводит к снижению активности ферментов, вплоть до полной инактивации [4, 11]. Потеря протеолитической активности белком-продуктом гена *tolloid* может быть вызвана заменой отдельных остатков Asp или Glu в некаталитических CUB-доменах на незаряженные остатки или остатки Lys [6]. Удаление некаталитических доменов особенно сильно влияет на гидролиз протяженных субстратов: так, протеиназа UVS-2 лягушки *X. laevis*, подвергаясь аутолизу (при котором, вероятно, происходит отщепление двух CUB-доменов), сохраняет протеолитическую активность, но теряет способность расщеплять белок вителлин, входящий в состав оболочки икринки [27]. Мутант меприна A, в субъединицах которого отсутствуют MATH- и AM-домены, не расщепляет азоказеин, хотя его удельная активность по брадикинину такая же, как у белка дикого типа [22].

Положительное влияние удаления некаталитических доменов отмечено лишь в случае ферментов mTld и BMP-1. Рекombинантный протеолитический домен последнего обладает широкой субстратной специфичностью: он расщепляет коллаген IV типа и фибронектин, устойчивые к действию BMP-1, и полностью гидролизует проколлаген VII типа, который под действием BMP-1 подвергается лишь ограниченному протеолизу [28]. Активность фермента mTld по отношению к проколлагену и хордину повышается при удалении одного или обоих EGF-доменов, поскольку при этом конформация белка становится менее жесткой, а связывание субстрата - более эффективным [29]. Следует отметить, что мутантные формы BMP-1, содержавшие протеолитический домен и один из доменов CUB1 или CUB3, не расщепляли проколлаген [30].

1.4. Активация предшественников астациновых протеиназ.

Анализ аминокислотных последовательностей предшественников астациновых протеиназ показал, что активация большинства этих проферментов может происходить в результате действия трипсина или трипсиноподобных протеиназ после секреции белков в межклеточное пространство. На C-конце пропептидов некоторых астацинов содержатся мотивы RXXR, что указывает на возможность внутриклеточной активации в результате отщепления пропептида фурином. Исключениями являются нефрозин карпа *Cyprinus carpio* [31], протеиназа гидры *H. vulgaris* HMP-1, протеиназа PMP-1 медузы *P. carnea*, астацин и эмбриональный астацин речного рака [32], а также белок CG11864 плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (однако вблизи C-конца пропептида находятся остатки аргинина [33]). Секретируемая протеиназа BMP-1 активируется фурином, но отщепление пропептида не является необходимым условием секреции [34]. Активация проферментов хориолизинов японской рисовой рыбки *Oryzias latipes* не происходит в присутствии ингибитора металлопротеиназ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) [35, 36].

Трипсин активирует гомоолигомеры обеих субъединиц мепринов, а плазмин – только олигомеры α -субъединиц, что указывает на различную доступность

пропептидов в олигомерах и объясняет существование гетеродимеров меприна, состоящих из активных α - и неактивных β -субъединиц [37]. Меприн В, выделенный из организма мышей, находится преимущественно в неактивной форме, что, вероятно, связано с очень строгой регуляцией активности этого фермента [38].

В норме проастина не накапливается в пищеварительной системе рака, но его накопление можно вызвать обработкой брэфельдином А - веществом, нарушающим транспорт вновь синтезированных белков из эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи. Зрелая форма фермента запасается в межклеточном пространстве [39]. Медленно распадающийся пропептид экранирует активный центр зрелого астацина и оказывает ингибирующее действие. Пропептид астациновой протеиназы червя *Trichinella spiralis* обладает более сильной ингибирующей активностью, чем пропептид астацина рака, так как содержит остатки цистеина, способные связывать ион цинка активного центра [40]. Ингибирование ферментов пропептидами, содержащими остатки цистеина ("cysteine switch") характерно для тканевых металлопротеиназ [2].

Изучение гидролиза пептида AstG, представляющего собой N-концевой фрагмент проастина, трипсином и астацином речного рака [32], а также эксперименты по ферментативному гидролизу неактивной мутантной формы проастина [39], позволили сделать вывод о том, что активация проастина рака *in vivo* является результатом совместного действия трипсина и зрелой формы астацина.

1.5. Гены астациновых протеиназ.

Наибольшее число генов протеиназ семейства астацина – 40 – было обнаружено в геноме нематоды *C. elegans* (Nematode AStacins, NAS). В геноме человека таких генов 10, у плодовой мушки *D. melanogaster* – 16, у морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* – 23 [41]. Многочисленность генов NAS является результатом дупликации генов и позволяет повысить надежность функционирования организма: подавление экспрессии индивидуальных генов с помощью РНК-интерференции не приводит к гибели червей [14].

Гены протеиназ семейства астацина, близких по числу аминокислотных остатков, значительно различаются по числу экзонов (табл. 1).

Таблица 1. Экзон-интронный состав генов, кодирующих астациновые протеиназы.

Фермент	Число аминокислот	Экзон-интронный состав гена
астацин <i>T. spiralis</i> [40]	605	10 экзонов
астацин речного рака [42]	251	5 экзонов и 4 интрона, 1 из которых – в сигнальном пептиде*
меприн человека [43]	α - 746 β – 701	α -субъединицу кодируют 14 экзонов, а β -субъединицу 15. Протеолитический домен в обоих случаях кодируют 5 экзонов
α -меприн мыши [44]	747	Протеолитический домен кодируют 4 экзона
продукт гена <i>tolloid</i> <i>D. melanogaster</i> [45]	1067	7 экзонов и 6 интронов, из которых 2 в пропептиде и 1 в протеолитическом домене
BP10 морского ежа <i>Paracentrotus lividus</i> [45]	597	7 экзонов и 6 интронов, из которых 1 в пропептиде и 3 в протеолитическом домене
хориолизин Н рыбы данио (<i>Danio rerio</i>) [46]	263/271 (2 изоформы)	5 экзонов
хориолизин L рыбы аю (<i>Plecoglossus altivelis</i>) [46]	256/270 (2 изоформы)	9 экзонов
хориолизин L рыбы <i>O. latipes</i> [35]	271	8 экзонов
хориолизин Н рыб <i>O. latipes</i> (изоформы 1 и 2), фундулоса (<i>Fundulus heteroclitus</i>), фугу (<i>Fugu rubripes</i>), и тетраодона чернотелого (<i>Tetraodon nigroviridis</i>) [46]	270 и 279 (2 изоформы), 265, 265, 261	Гены моноцистронные

Примечание: * - последовательности ДНК, кодирующие препропептид и другие структурные элементы белка, обозначены "препропептид" и т.п. для упрощения таблицы. Число аминокислот в белке указано для препроферментов.

Расположение экзонов и интронов в генах коррелирует с вторичной структурой белков, но границы экзонов в генах *BP10* и *tolloid* не совпадают с границами доменов, следовательно, развитие этого подсемейства астацинов не шло по пути “перестановки экзонов” [45]. Последовательности, кодирующие структурно и функционально важные элементы астацина рака (α -спирали, β -слои, цинк-связывающий мотив и метиониновый поворот), не прерываются интронами [42].

Различие в числе копий генов хориолизинов *O. latipes* (у гена хориолизина Н – 8 копий, у гена хориолизина L – 1 копия), вероятно, обусловлено тем, что для эффективного гидролиза оболочки икринки необходимо совместное действие хориолизинов L и H, причем оптимальное соотношение их количеств (найденное в экспериментах *in vitro*) – 3:20 [47].

1.6. Особенности биосинтеза.

Большинство пре-мРНК астациновых протеиназ не подвергаются альтернативному сплайсингу. Исключением является пре-мРНК BMP-1 животных. Белок mTld (mammalian tolloid) по числу и природе доменов аналогичен продукту гена *tolloid D. melanogaster*, в молекуле BMP-1 некоторые домены отсутствуют (мРНК, соответствующая этому белку – самый низкомолекулярный продукт альтернативного сплайсинга). Третий белок, обнаруженный в эмбриональных тканях и плаценте, аналогичен по первичной структуре BMP-1 и отличается только вставкой His-богатого домена вблизи С-конца молекулы [48].

Гены α - и β -субъединиц мепринов расположены на разных хромосомах. Благодаря этому возможна независимая экспрессия генов двух субъединиц в разных слоях эпидермиса [49] или на разных стадиях развития организма [50], что может иметь значение для регуляции ферментативной активности [6]. Димер β -субъединиц называется меприном В, а гомо- или гетероолигомер, содержащий α -субъединицы – меприном А.

Практически все гены астациновых протеиназ кодируют препробелки, на N-конце которых находятся гидрофобная сигнальная последовательность и пропептид. Исключениями являются SAM-1 перепела *Cortunix cortunix* и CG6974 плодовой мушки *D. melanogaster* [6]. В 9 из 40 последовательностей генов астациновых протеиназ *C. elegans* не были обнаружены участки, кодирующие сигнальные пептиды. Эти гены, вероятно, кодируют внутриклеточные протеиназы [14]. Белок-продукт гена *tlr-1 D. melanogaster* содержит пропептид из 519 аминокислот: возможно, такая структура гена позволяет предотвратить синтез белка на ранних стадиях эмбриогенеза, когда длительность клеточного цикла мала [6].

1.7. Гликозилирование астациновых металлопротеиназ.

Как показал анализ первичной структуры белков, определенной по кДНК или по генам, в молекулах большинства астациновых протеиназ присутствуют мотивы Asn-Xaa-Ser/Thr, содержащие остаток аспарагина, который может подвергаться гликозилированию. Последовательности, включающие остатки Ser и Thr, для которых вероятно O-гликозилирование, были обнаружены в структурах овастацинов человека, крысы и мыши [17] и ферментов морских ежей SpAN, suBMP и BP10 [41]. При исследовании BMP-1, мепринов и флавастацина [16] обнаружено, что эти ферменты являются гликопротеинами, причем в BMP-1 и мепринах олигосахариды составляют значительную часть массы молекулы (18 и 25% соответственно) [38, 48, 51]. Эстрогены подавляют гликозилирование мепринов *in vivo*, что приводит к различиям в молекулярной массе ферментов у мышей разного пола [52].

Влияние гликозилирования на активность протеиназ обнаружено лишь в случае α -субъединицы меприна (обработка белка гликозидазой F приводит к снижению активности на 75-100%) [53]. Значительно более важную роль гликозилирование играет в регуляции внутриклеточного транспорта и секреции протеиназ: мутантная форма BMP-1, у которой отсутствуют сайты N-гликозилирования в CUB-доменах, направляется клеткой на деградацию [54]. Мутантные формы меприна А [53] или BMP-1 [54], в которых отсутствует один из

сайтов гликозилирования, проявляют протеолитическую активность и секретируются (в случае поляризованных клеток – в том же направлении, что и белок дикого типа), но при отсутствии всех сайтов гликозилирования секреция белков не происходит. Присутствие О-гликозидных фрагментов в молекуле β -субъединицы меприна человека, наоборот, препятствует секреции, вероятно, потому, что эти фрагменты создают препятствия для протеиназ, расщепляющих трансмембранный домен молекулы белка [55].

1.8. Локализация астациновых металлопротеиназ.

Большинство ферментов семейства астацина секретируется в межклеточное пространство: исключение составляет лишь β -субъединица меприна, которая представляет собой мембраносвязанный белок. Зрелая форма ВМР-1 обнаружена не только в межклеточном пространстве, но и внутри клетки: это позволяет предположить, что протеолиз физиологических субстратов этого фермента (предшественников компонентов межклеточного матрикса) начинается раньше, чем происходит его секреция [34]. Олигомеры мепринов располагаются и на поверхности мембраны эпителиальных клеток, и в межклеточном пространстве.

Мембраносвязанные меприны представляют собой димеры β -субъединиц или димеры $\alpha\beta$ -гетеродимеров, так как только β -субъединица содержит трансмембранный домен [6]. Проферменты α -субъединиц, которые теряют трансмембранный домен при посттрансляционной модификации, после секреции в межклеточное пространство образуют высокомолекулярные нековалентные комплексы [56], имеющие форму полумесяца или замкнутого кольца [57]. Эти комплексы могут перемещаться между клетками к очагам воспаления, инфекции или роста опухолей, где происходит активация проферментов [56]. Рекомбинантные α -субъединицы меприна *in vitro* могут образовывать комплексы, содержащие до 100 субъединиц и имеющие форму колец, спиралей или трубочек; состав комплексов зависит от концентрации белка, ионной силы раствора, наличия или отсутствия пропептидов у субъединиц [58].

Установлено, что мембраносвязанные молекулы меприна β могут сближаться с молекулами аланиламинопептидазы и образовывать с ними комплексы, которые не разрушаются при выделении белков (в том числе при аффинной хроматографии на сорбентах с иммобилизованными антителами). Вероятно, расположение молекул трансмембранных эндо- и экзопептидаз вблизи друг от друга позволяет повысить эффективность деградации белков [59].

2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АСТАЦИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ.

2.1. Физико-химические свойства.

Информация о физико-химических свойствах протеиназ необходима для разработки эффективных методов выделения этих ферментов из природных источников. В настоящее время разработаны методики предсказания физико-химических свойств белка исходя из его аминокислотной последовательности. Анализ информации о свойствах астациновых протеиназ и аминокислотных последовательностей, определенных по генам, показывает, что значения молекулярных масс и изоэлектрических точек ферментов семейства астацина варьируют в широких пределах (рис. 4). Как видно из рисунка 4, молекулярные массы большинства хориолизинов невелики, а изоэлектрические точки лежат в щелочной области.

Молекулярные массы ферментов распределены в диапазоне от 21,5 до 110 кДа. Астациновые металлопротеиназы, в состав молекул которых входит только протеолитический домен, содержат около двухсот аминокислотных остатков и характеризуются молекулярной массой около 22 кДа. В литературе встречаются более низкие значения молекулярных масс, определенные с помощью гель-хроматографии [60], но эти данные можно объяснить способностью астациновых протеиназ к аномально сильному удерживанию на многих сорбентах для гель-хроматографии.

АСТАЦИНОВЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ

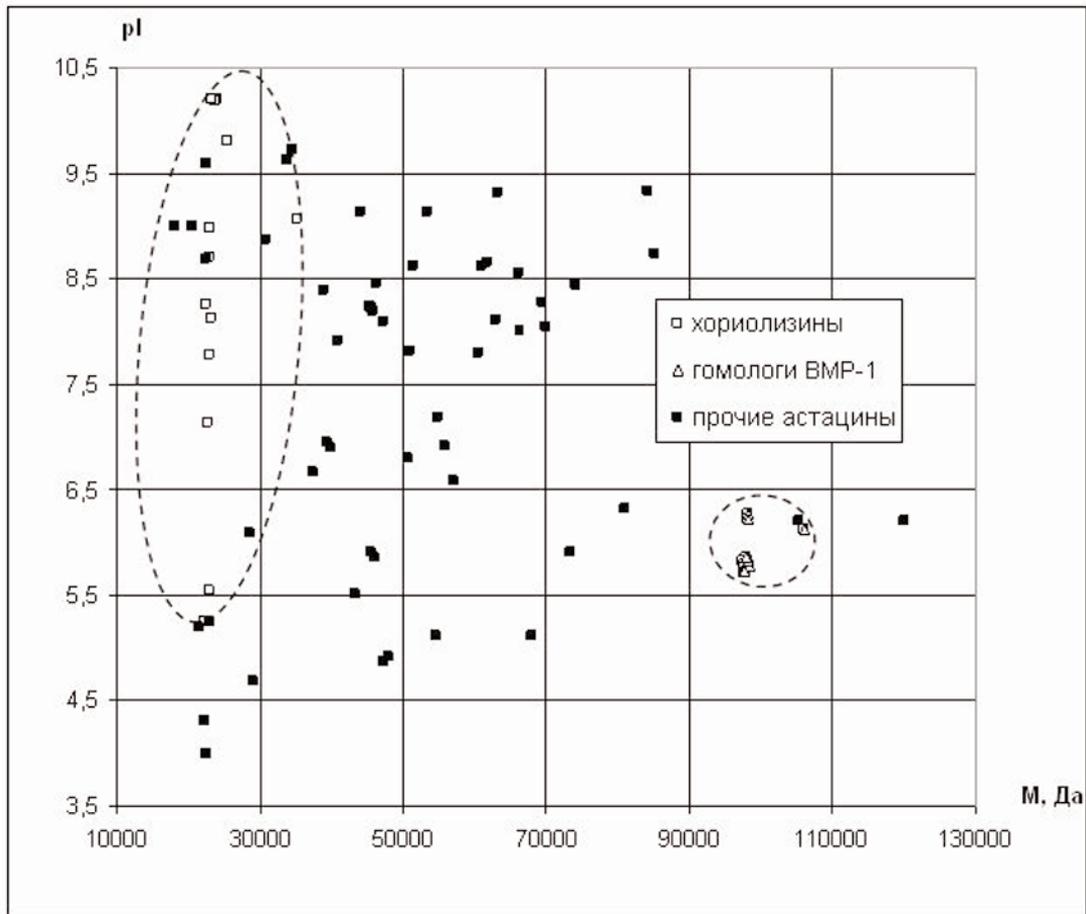


Рисунок 4.

Расчетные значения молекулярных масс и изоэлектрических точек астациновых протеиназ*.

* - Характеристики белков рассчитаны путем обработки аминокислотных последовательностей из базы данных SwissProt с помощью программы Compute pI/Mw, представленной на сайте www.expasy.org.

В пищеварительном соке речного рака присутствуют три изоформы астацина, содержание которых составляет примерно 75, 22 и 3%. Эти белки иммунологически идентичны и могут быть разделены ионообменной хроматографией [61]. Две изоформы хориолизина Н могут быть разделены только катионообменной хроматографией, но не гель-фильтрацией или электрофорезом в ПААГ [36].

Очищенный меприн А дает несколько полос при изоэлектрофокусировании, что, вероятно, связано с гетерогенностью гликозидных фрагментов [62].

Оптимум рН активности большинства астациновых протеиназ находится в щелочной области (рН 7,5–9). Это свойство отличает астацины от ферментов семейства термолизина, имеющих рН-оптимум в нейтральной области. Исключением является гомоолигомер β -меприна, рН-оптимум активности которого – 5,5-6. Протонирование α - и β -мепринов при низких рН указывает на наличие в молекуле по крайней мере двух функциональных групп, ионизация которых влияет на протеолиз, а плечо на кривой активности β -меприна при рН 7,2-8,5 возникает в результате ионизации еще одной функциональной группы [63].

Активность некоторых астациновых протеиназ зависит от ионной силы реакционной среды, причем характер этой зависимости различен для сходных ферментов: например, активность β -меприна [63], ВМР-1 [64] и хориолизина Н

O. latipes [65] снижается при повышении концентрации солей, а хориолизин Н рыбы фундулюса [65] и α -меприн [63] сохраняют активность при концентрации NaCl до 3 М.

Флавастацин обладает заметной автолитической активностью, поэтому его очистку проводят в присутствии 10 мМ ЭДТА [16].

2.2. Механизм гидролиза пептидной связи астациновыми протеиназами.

Астациновые протеиназы являются цинксодержащими эндопептидазами [13]. Тип координации катиона цинка в молекулах астацинов – тригональная бипирамида, в отличие от ферментов семейства термолизина, в которых цинк имеет тетраэдрическую координацию.

Связывание субстрата в активном центре фермента сопровождается отдалением боковой цепи остатка тирозина от иона цинка [66] и образованием водородной связи между ОН-группой тирозина и карбонильной группой расщепляемой пептидной связи. Ион цинка и гидроксигруппа остатка тирозина поляризуют связь между углеродом и кислородом карбонильной группы, а карбоксильная группа остатка глутаминовой кислоты образует водородную связь с молекулой воды, атакующей углерод пептидной связи. Эксперименты с ингибитором – фосфиновым псевдопептидом [67], а также исследование производных астацина, в которых ион цинка заменен на ион меди или кобальта [66], подтверждают предложенный механизм.

Эксперименты с мутантными формами астацина, ВМР-1 и меприна мыши показали, что остатки гистидина [68] и глутаминовой кислоты [8, 68, 69], входящие в состав цинк-связывающего мотива, необходимы для катализа, в отличие от остатка тирозина, также являющегося лигандом для цинка. При замене Tyr226 на Phe сохраняется около 15% активности меприна по отношению к флуорогенному субстрату - аналогу брадикинина. Обе мутантные формы меприна менее устойчивы к трипсинолизу, чем белок дикого типа. Мутант His167Ala, в отличие от Tyr226Phe, не образует олигомеров [69]. Мутант астацина Tyr149Phe сохраняет около 2,5% активности [68].

2.3. Роль катионов металлов в астациновых протеиназах.

Большинство металлопротеаз, в том числе и астацины, содержат в активном центре ион Zn^{2+} , необходимый для катализа. Основные причины предпочтения Zn^{2+} – его инертность по отношению к окислителям и восстановителям, присутствующим в организме, и “пограничное” значение поляризуемости, обеспечивающее возможность взаимодействия катиона с лигандами различной природы [70, 71]. Астацин речного рака [66], меприны [51], хориолизины [35, 36] и протеиназа ВР10 морского ежа *Paracentrotus lividus* [72] сохраняют активность при замене катиона цинка в активном центре катионом меди или кобальта, что позволяет изучать связывание катиона с апоферментом с помощью оптической и ЭПР-спектроскопии.

Некоторые ферменты из семейства астацина могут связывать дополнительные катионы, стабилизирующие структуру белка или являющиеся эффекторами ферментативной реакции. Меприн А и хориолизины содержат ионы кальция (соответственно 2,75 моль на моль субъединиц и 3-5 мкг/мг белка), участвующие в поддержании структуры. Стабилизация структуры белка ионами кальция характерна также для протеиназ семейства термолизина и тканевых металлопротеиназ, но не для астацина рака, третичная структура которого поддерживается дисульфидными связями [73]. Остатки цистеина, образующие эти связи, являются строго консервативными, что указывает на их важную роль в стабилизации третичной структуры других астациновых протеиназ. Исключением является флавастацин [74].

Протеолитическая активность некоторых астациновых протеиназ зависит от концентрации Ca^{2+} в реакционной среде: ВМР-1 и mTld, а также родственная им протеиназа морского ежа ВР10 [72] более эффективно расщепляют субстраты в присутствии Ca^{2+} . Активность фермента mTLL, принадлежащего к тому же

АСТАЦИНОВЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ

подсемейству астациновых протеиназ, практически не зависит от концентрации Ca^{2+} [75], а активность меприна человека уменьшается, если концентрация Ca^{2+} в реакционной среде превышает 1 мМ [76]. Мутантные молекулы BMP-1 и mTld, в которых отсутствуют EGF-домены, способные связывать Ca^{2+} , также являются кальцийзависимыми [29].

Соли Zn^{2+} в концентрации более 1 мМ ингибируют меприн человека [76] и металлопротеиназу *T. spiralis* [40]. BMP-1 более чувствителен к ингибированию солями цинка: ZnCl_2 в концентрации 0,1 мМ практически полностью подавляет активность фермента. Высокоэффективными ингибиторами BMP-1 также являются хлориды кадмия и меди [64]. Соли цинка в концентрации 1-500 мкМ активируют металлопротеиназу *T. spiralis* [40].

2.4. Субстратная специфичность астациновых протеиназ.

Несмотря на сходство структур протеолитических доменов, субстратные специфичности ферментов семейства астацина различаются, особенно по отношению к P'-участку молекулы субстрата (табл. 2). Обычно специфичность связывания металлопротеиназ с субстратом (и ингибитором) определяется первичной структурой S'-участка фермента. Вероятно, это позволяет предотвратить ингибирование продуктом реакции, содержащим свободную карбоксильную группу, способную связывать цинк.

Таблица 2. Субстратная специфичность астациновых протеиназ.

Фермент	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P' ₁	P' ₂	P' ₃	P' ₄	Субстрат
астацин [61]		Pro	Lys, Arg, Asn, Tyr	Lys, Arg, Asn, Tyr	Ala	Pro	Гидро- фобный	Гидро- фобный	тубулин
меприн β [38]				Glu	Glu	Glu			протеин- киназа А
меприн α человека [51]	Ala, Val	Ala, Thr	Val, Ser	Tyr, Asn	Gln, Thr				фибронектин
меприн β человека [77]		Ser, Thr	Pro	Leu, Arg	Val, Ser		Thr	Ser, Val	фибронектин
BMP-1[78]	Ser	Tyr, Met	Tyr, Met, испо- ляр- ные	Gly, Ala, Asx, Ser	Asp (Gln)	Asp Glu	Ala	Gly	белки меж- клеточного матрикса
BMP-1 [79]	Ala	Ala	Gln	Ala	Gln			Asp	колаген XI
BMP-1 [80]	Phe		Tyr	Ser	Asp	Val	Met	Gly	α макро- глобулин
нефрозин [31]	Pro	Pro	Pro	Phe					пептидил- МСА*
хориолизины фундулоса [65]			Pro	Ala					пептидил- МСА
хориолизин Н <i>O. latipes</i> [65]			Val	Tyr					пептидил- МСА

Примечание: * - МСА - метилкумарин

Среди представителей семейства есть ферменты как с широкой (например, металлопротеиназа камчатского краба *Paralithodes camtschatica* [81]), так и с очень узкой специфичностью: например, флавастацин расщепляет связи Хаа-Asp, он значительно менее активен по отношению к связям Хаа-Glu и не затрагивает пептидные связи, образованные аминокеттогруппами других аминокислот, в том числе аспарагина и глутамината [74]. Специфическим субстратом для ближайших гомологов астацина рака, позволяющим отличить их от тканевых металлопротеиназ, считается диметиламинонафталинсульфонил-РКФ↓АРWV (стрелкой отмечена расщепляемая связь) [82].

Установлено, что предпочтение α -субъединицей меприна связей с ароматической аминокислотой в P1'-положении обусловлено взаимодействием субстрата с остатком Tyr-199, а предпочтение остатков Asp или Glu β -субъединицей – взаимодействием субстрата с остатком Lys-185. Меприн β характеризуется высоким сродством к субстратам, содержащим остатки Glu в положениях с P2 по P2' (значения K_m для таких субстратов составляют 2–10 мкМ). Значение k_{cat} повышается, если вблизи расщепляемой пептидной связи находятся остатки гидрофобных аминокислот [83].

Субстраты с остатками аргинина, лизина или фенилаланина в P1'-положении расщепляются меприном А из почек мыши (состав $\alpha_2\beta_2$) в 1000-10000 раз быстрее, чем астацином [84]. Различия в субстратной специфичности астацина и меприна связаны с тем, что остаток Pro-176 в молекуле астацина создает стерические затруднения для связывания остатков с более объемистыми, чем у аланина, боковыми цепями. В молекуле меприна Pro-176 заменен на Gly-176, а Tyr-177 отсутствует, вследствие чего образуется глубокая полость, в которой находятся боковые цепи остатков Leu-178 и Tyr-149, участвующих в связывании субстрата [7]. Наиболее важную роль в связывании аминокислотного остатка, находящегося в положении P2' субстратов астацина, играет остаток Phe-165 [6]. Связывание остатка пролина в положении P3 субстратов астацина осуществляется благодаря взаимодействию с остатками Trp и Tyr. Связыванию боковых цепей ароматических аминокислот в положении P3' субстратов благоприятствует взаимодействие с боковыми цепями остатков Tyr-177 и/или Trp-158 молекулы астацина. В молекуле меприна Tyr-177 отсутствует, а Trp-158 заменен на Asn-158 [85].

Замены аминокислотных остатков в P1'-положении молекулы брадикинина слабо влияют на K_m реакции гидролиза этого субстрата меприном А (174-339 мкМ), но заметно влияют на k_{cat} ($51,5 \text{ с}^{-1} = \text{A} > \text{S} > \text{R} > \text{F} > \text{K} > \text{T} > \text{E} = 0$); замены остатков в P1-положении значительно влияют и на K_m (336 мкМ – 2,46 мМ), и на k_{cat} ($98,5 \text{ с}^{-1} = \text{A} > \text{F} > \text{L} > \text{E} > \text{K} = 2,4 \text{ с}^{-1}$). Замены аминокислотных остатков, удаленных от расщепляемой связи, также влияют на связывание и гидролиз субстратов, что указывает на формирование протяженной системы нековалентных взаимодействий [86].

Большинство субстратов ВМР-1 имеют в положении P1' остаток аспарагиновой кислоты, в связывании которого участвуют остатки Lys-87 и -176. Петля, в состав которой входит остаток Lys-176 (S1'-петля), обнаружена только у астациновых протеиназ, относящихся к подсемейству гомологов ВМР-1 [8].

2.5. Белковые субстраты астациновых металлопротеиназ.

Многие астациновые протеиназы менее активны по отношению к коротким пептидам, чем к длинным пептидам и белкам: так, оптимальный размер дансированных пептидных субстратов астацина – 7 и более аминокислотных остатков, а минимальный – 5 остатков [61]. Нефрозин карпа расщепляет субстраты с длиной пептидной цепи не менее 7 остатков [31], меприн В требует наличия в молекуле субстрата не менее 10 остатков. Исключением является α -субъединица меприна человека, предпочтительно расщепляющая короткие пептиды [38].

Эффективность гидролиза белков астациновыми протеиназами зависит от структуры субстрата, причем характер этой зависимости различен для разных ферментов. Так, астацин речного рака [61] и НМР-1 [87] малоактивны по отношению к неденатурированным глобулярным белкам – тубулину, бычьему

сывороточному альбумину и казеину, а при действии α -субъединицы меприна человека на нидоген – один из белков межклеточного матрикса – происходит гидролиз пептидной связи, расположенной в глобулярном домене [88]. Протеиназа паука *Loxosceles intermedia* полностью гидролизует денатурированный фибриноген, тогда как в нативном белке протеолизу подвергаются только $A\alpha$ - и $B\beta$ -цепи [89].

Физиологический субстрат хориолизинов – оболочка икринки – характеризуется необычной пространственной структурой и содержит большое количество изопептидных связей. Хориолизин Н селективно удаляет фрагменты оболочки, богатые пролином и содержащие амидные связи между ϵ -аминогруппой лизина и γ -карбоксильной группой глутаминовой кислоты, в результате чего оболочка набухает и становится доступной для дальнейшего гидролиза хориолизином L [90]. Специфичность (отношение хориолизинической и казеинолизинической активностей) хориолизина L превышает эту величину для трипсина и термолизина в 8000 и 10000 раз соответственно [35].

Гомоолигомеры обеих субъединиц меприна не гидролизуют интактный коллаген I, но расщепляют коллаген IV (в отличие от коллагена I он образует не фибриллы, а сетчатые структуры), то есть по субстратной специфичности они ближе к желатиназам (ММР-2 и -9), чем к коллагеназам (ММР-1 и -8). Обе субъединицы меприна человека расщепляют коллаген IV до коротких пептидов [88]. Нефрозин карпа [31], НМР-1 [87] и протеиназа паука *L. intermedia* [89] не гидролизуют коллагены I и IV, но расщепляют желатин – субстрат, гидролизуемый большинством эндопептидаз, в том числе и астациновых.

Многие астациновые протеиназы: нефрозин [31] и НМР-1 [87], меприны [88], онхоастацин [4], протеиназа *L. intermedia* [89], СиМР-1 рыбы *Haplochromis chilotes* [91] расщепляют фибронектин – гликопротеин межклеточного матрикса, влияющий на формирование фибрилл коллагена. Обе субъединицы меприна человека расщепляют этот субстрат по связям, расположенным в гибких участках полипептидной цепи, соединяющих домены, с образованием высокомолекулярных продуктов [88], а при гидролизе онхоастацином образуются продукты с молекулярной массой 25 и 45 кДа [4].

Эффективность, с которой ВМР-1 расщепляет изоформы α -цепи проколлагена XI, зависит от окружения расщепляемой связи [79]. Мутантные формы проколлагена с делецией шести консервативных остатков, окружающих расщепляемую связь, или заменой остатка Asp в положении P1 устойчивы к действию фермента, причем делеция не нарушает сборку тройной спирали коллагена [92].

Одним из механизмов, обеспечивающих колокализацию астациновых металлопротеиназ и их субстратов, является комплексообразование: хориолизин связывается с оболочкой икринки, гомолог ВМР-1 из морского ежа – с плазматической мембраной эмбриона. Одно из моноклональных антител против хориолизина Н не влияет на казеинолизиническую активность, но препятствует связыванию фермента с оболочкой икринки и гидролизу белков, входящих в её состав. Это позволяет предположить, что участок связывания субстрата и активный центр пространственно разделены [36]. Протеиназа mTld связывается с межклеточным матриксом, который продуцируют культуры остеобластов, более прочно, чем ВМР-1 [93].

В регуляции активности и специфичности астациновых протеиназ также участвуют вспомогательные белки, образующие комплексы с субстратами: так, активность проколлаген-С-протеиназы по отношению к проколлагену повышается, если субстрат образует комплекс с белком РСРЕ (procollagen-C-proteinase enhancer). Участки связывания РСРЕ с проколлагеном расположены по обе стороны от места расщепления последнего. Связывание *in vitro* зависит от присутствия катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} [94]. На специфичность расщепления белка Sog дрозофилы астациновой протеиназой Tlr влияет белок Tsg, образующий комплексы с Sog [95].

2.6. Ариламидазная активность астациновых металлопротеиназ.

Металлопротеиназы из семейств астацина и сerratилина, в молекулах которых остаток тирозина принимает участие в координации катиона цинка, обладают ариламидазной активностью. Исключениями являются такие представители семейства астацина, как нефрозин карпа [31], металлопротеиназа камчатского краба [81] и меприн В. Ферменты из клана метцинкинов, в которых остаток тирозина заменён пролином (адамализины и тканевые металлопротеиназы) не обладают ариламидазной активностью. Подвижная боковая цепь остатка тирозина при связывании субстратов с ариламидной группой в положении P1' смещается и ориентирует ариламидную группу относительно активного центра. В дальнейшем остаток тирозина стабилизирует тетраэдрическое переходное состояние [96].

Астацин отщепляет *para*-нитроанилин от сукцинил-аланил-аланил-аланил-4-нитроанилида (Suc-(Ala)₃-pNA), несмотря на то, что в пептидных субстратах он “предпочитает” связи, где в P1'-положении находится аминокислотный остаток с короткой незаряженной боковой цепью. Замена аминокислотных остатков в субстрате Suc-(Ala)₂-X-pNA (X = Ala, Phe, Pro, Val) приводит к уменьшению активности астацина в соответствии с рядом Phe>Ala>>Pro>Val [61]. Значения k_{cat}/K_m для реакции гидролиза Suc-(Ala)_n-pNA (n=2,3,5) и (Ala)_n-pNA (n=1,2,3) возрастают с увеличением числа остатков аланина в молекуле субстрата, так как увеличивается эффективность связывания. При гидролизе Suc-(Ala)₅-pNA астацином сначала образуются Suc-(Ala)₂ и (Ala)₃-pNA, а затем происходит отщепление *n*-нитроанилина от C-концевого фрагмента субстрата, причём значение k_{cat}/K_m для первой реакции в 1200 раз выше, чем для второй [97].

2.7. Ингибирование астациновых протеиназ.

Ферменты семейства астацина, как и другие металлопротеазы, ингибируются металл-хелатирующими веществами: 2,2'-бипиридиллом, 8-гидроксихинолин-5-сульфоновой кислотой, дипиколиновой кислотой, *орто*-фенантролином, ЭДТА, ЭГТА (этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислотой), тиолами [3, 81, 98]. Цистеин частично ингибирует астацин: с течением времени устанавливается равновесие между металло- и апоферментом. Ингибирование астацина ЭДТА происходит медленно, но значительно ускоряется в присутствии цистеина, катализирующего перенос катиона цинка от белка на молекулу ЭДТА [61]. Астацин, ингибированный хелаторами, можно реактивировать путем разбавления раствора или добавкой Zn(II). Ингибирование меприна ЭДТА происходит значительно быстрее, чем ингибирование астацина, а 2 мМ *орто*-фенантролин ингибирует и меприны, и астацин за несколько минут [3].

Протеиназы семейства астацина не чувствительны к ингибиторам сериновых, цистеиновых и аспартильных протеиназ (например, фенилметилсульфонилфториду, 3,4-дихлороизокумарину, йодацетату, E-64, лейпептину, пепстатину) [6], а также к белковым ингибиторам сериновых протеиназ – серпинам [33], овомукоиду и ингибиторам трипсина из лимской фасоли и сои (последний при действии астацина рака разрушается) [99].

Чувствительность астациновых протеиназ к ингибиторам металлопротеиназ других семейств, содержащим металл-хелатирующие группы, определяется структурой субстрат-связывающих участков ферментов. Большинство астациновых протеиназ не чувствительно к ингибитору протеиназ семейства термолизина – фосфорамидону [82], ингибиторам ангиотензин-превращающего фермента – каптоприлу и тiorфану и ингибиторам тканевых металлопротеиназ: белку TIMP-1, маримастату [6] и производному пиримидин-2,4,6-триона Ro-28-2653 [100].

Гидроксаматы аминокислот типа Хаа-NHOH, ингибирующие астацин, по эффективности располагаются в следующий ряд: Хаа = Туг (ID₅₀=175 мкМ) > ароматические остатки > серосодержащие остатки > отрицательно заряженные остатки > алифатические остатки > положительно заряженные остатки [3].

АСТАЦИНОВЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ

Наиболее эффективным ингибитором ВМР-1 среди гидроксаматов диаминомонокислот является производное D-диаминопропионовой кислоты [101].

Механизм ингибирования производными пептидов, содержащими гидроксаматную группу, зависит от того, с каким участком молекулы фермента взаимодействует ингибитор: так, Ac-Arg-Pro-Gly-Tyr-NHOH, который связывается S-участком активного центра, является неконкурентным ингибитором меприна А и астацина (как и Tyr-NHOH), а NHOH-сукцинил-Pro-Phe-Arg, который связывается S'-участком активного центра, является конкурентным ингибитором этих ферментов. Гидроксаматные аналоги пептидов с объемистыми группами в положении P1', например, актинонин, выделенный из актиномицетов, являются эффективными конкурентными ингибиторами меприна А, но почти не действуют на астацин (табл. 3). Эти кинетические различия подтверждают предположение о том, что в молекуле астацина S1'-впадина активного центра меньше по размерам, чем в молекуле меприна [80]. Меприны α и β значительно менее прочно связываются с батимастатом (аналогом дипептида, содержащим гидроксаматную группу), чем с актинонином (табл. 3). Возможная причина этого различия заключается в том, что атом углерода, входящий в состав основной цепи и следующий за карбонилем гидроксаматной группы, в молекуле актинонина не имеет заместителей, а в молекуле батимастата к этому атому присоединен объемистый 2-тиенилтиометилсукцинильный остаток. Впадина, содержащая активный центр, в молекулах мепринов значительно уже, чем в других метцинкинах (в частности, в тканевых металлопротеиназах [102]) что затрудняет связывание молекулы батимастата.

Таблица 3. Константы ингибирования некоторых астациновых протеиназ веществами, содержащими гидроксаматную группу.

Фермент	Ингибиторы			
	каптоприл	актинонин	батимастат	Pro-Leu-Gly-NHOH [66]
астацин [3]	-	K_i 135 мкМ	-	K_i 16 мкМ
меприн α [82]	K_i 0,7 мМ	K_i 20 нМ	K_i 18 мкМ	K_i 0.45 мкМ
меприн β [82]	K_i 0,4 мМ	K_i 1,7 мкМ	K_i 4,4 мкМ	K_i ? 45 мкМ

Высокоэффективными ингибиторами астацина являются фосфиновые псевдопептиды – негидролизующиеся структурные аналоги переходного состояния, например, флуоренилметилоксикарбонил-Pro-Lys-Phe- ψ (PO₂-CH₂)-Ala-Pro-Leu-Val-OH (K_i = 42 нМ) [3]. Производные этого ингибитора, укороченные с N- или C-конца, значительно менее эффективны, в частности, удаление N-концевого остатка пролина приводит к увеличению K_i в 40 раз. Образование комплекса фермент-ингибитор сопряжено с конформационными изменениями и происходит очень медленно [67].

Лишь для немногих астациновых металлопротеиназ известны пептидные и белковые ингибиторы. Неспецифический ингибитор протеиназ α_2 -макроглобулин, представляющий собой “суицидный субстрат”, подавляет активность астацина

рака [60] и BMP-1 [80], но не действует на меприн человека [102]. Пептидные ингибиторы астацина были обнаружены в семенах растения *Ecballium elaterium* и в ростках картофеля [61]. Активность некоторых астациновых протеиназ регулируется эндогенными ингибиторами: у лягушки *X. laevis* [103] и рыбы *D. rerio* обнаружены белки – ингибиторы протеиназ, родственных BMP-1, а у карпа – ингибитор нефрозина, близкий по первичной структуре к белку млекопитающих фетуину А [104]. Маннан-связывающий лектин является эндогенным ингибитором меприна. Ингибирование происходит не в результате конкуренции лектина с молекулой субстрата, а в результате его связывания с гликозидными фрагментами меприна [105], что подчеркивает важность этих фрагментов для катализа.

3. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АСТАЦИНОВЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ.

Основные функции астациновых протеиназ в организме – гидролиз белков пищи, формирование межклеточного матрикса и участие в процессах морфогенеза и развития организма.

3.1. Участие астациновых металлопротеиназ в пищеварении.

К пищеварительным ферментам относятся астацин рака, металлопротеиназа из гепатопанкреаса камчатского краба [81], металлопротеиназа *C. elegans* NAS-4 (возможно, вся группа ферментов NAS 2-6, которые близки по строению друг к другу и к астацину [14]), одна из металлопротеиназ мухи цеце [106], металлопротеиназа паука *Argiope aurantia* [60] и металлопротеиназа медузы *Podocoryne carnea*. Изучение экспрессии гена последней показало, что во взрослом организме она выполняет пищеварительную функцию, а во время развития медузы участвует в морфогенезе [20]. Последовательности, гомологичные кДНК астацина речного рака, обнаружены при частичном секвенировании кДНК одного из пищеварительных ферментов майского жука *Melolontha melolontha* [82], а также при исследовании библиотеки кДНК из микротрубочек средней кишки насекомого *Spodoptera frugiperda* [107]. Высокий уровень экспрессии гена астациновой металлопротеиназы в пищеварительных органах устрицы *P. fucata* позволяет предположить, что этот фермент участвует в пищеварении [21].

3.2. Роль протеиназ семейства астацина в формировании и распаде межклеточного матрикса.

Различные протеиназы семейства астацина участвуют как в формировании, так и в деградации межклеточного матрикса в организме животных. Астациновые протеиназы паразитических червей разрушают межклеточный матрикс, обеспечивая внедрение патогена в организм хозяина.

Протеиназа BMP-1 и ее гомологи из организма человека (mTld, mTll-1 [108]) и *C. elegans* (NAS-35 [109]) непосредственно участвуют в образовании структурных белков межклеточного матрикса из предшественников. Они отщепляют С-концевой глобулярный домен от молекул проколлагенов I-III, V [110], VII [111] и XI [79], расщепляют предшественник белка, входящего в состав дентина (dentin matrix protein-1 [112]), пробибликан [113] и проламинин-5 [114].

Эти протеиназы также могут влиять на формирование структуры межклеточного матрикса. Они активируют профермент лизилоксидазы, участвующей в образовании поперечных сшивок между волокнами коллагена [115], и расщепляют остеоглицин – протеогликан, участвующий в регуляции образования коллагеновых волокон [78].

В отличие от протеиназ, родственных BMP-1, которые способствуют формированию межклеточного матрикса, меприны участвуют в его деградации. Гомоолигомеры обеих субъединиц меприна расщепляют белки матрикса – ламинин, коллаген IV типа и нидоген. Это облегчает миграцию лейкоцитов в очаги воспаления [116], а также распространение опухолевых клеток, васкуляризацию опухолевой ткани и образование метастазов [117]. Нарушение контактов между клетками эпителия приводит к апоптозу [118]. Роль мепринов в развитии

иммунного ответа не ограничивается обеспечением миграции лейкоцитов: β -меприн активирует интерлейкин-1 β [119].

В норме меприн присутствует только на апикальной мембране клеток эпителия почек и кишечника, но при злокачественном перерождении клеток или их повреждении (в результате ишемии [118], интоксикации цисплатином [120] или фрагментами белка глиадина у больных целиакией [98]) происходит секреция меприна через базальную мембрану и протеолиз белков межклеточного матрикса, что способствует развитию патологий. В опухолевой ткани происходит активация промеприна α плазмином, в результате чего протеолитическая активность увеличивается в три раза [121].

Снижение активности меприна также может приводить к развитию патологий: при диабете активность меприна по отношению к ламинину уменьшается и происходит повышенное отложение ламинина, приводящее к нарушению структуры межклеточного матрикса [122].

Астациновые протеиназы паразитических червей, например, *T. spiralis* [40], *Ancylostoma caninum* [123], *O. volvulus* [4], разрушают межклеточный матрикс, обеспечивая внедрение паразита в ткани хозяина и перемещение в них. Рекомбинантные ферменты червей предлагается использовать для изготовления вакцин.

Металлопротеиназа кальмара, относящаяся к семейству астацина, по данным иммунохимического анализа, локализована в межклеточном матриксе мышечной ткани мантии моллюска [11]. Это позволяет предположить, что физиологические функции фермента включают протеолиз белков межклеточного матрикса.

3.3. Функции астациновых протеиназ в процессах морфогенеза и развития организма.

Астациновые протеиназы могут принимать участие в таких процессах, как оплодотворение, развитие эмбриона, вылупление мальков и личинок, линька. Протеиназа CG11864 мухи-дрозофилы участвует в процессе оплодотворения [33]. Альвеолин – одна из астациновых протеиназ рисовой рыбки *O. latipes* – вызывает затвердевание оболочки оплодотворенной икринки, предотвращая многократное оплодотворение [124].

Морфогенетически активные астациновые металлопротеиназы были обнаружены в организмах плодовой мушки *D. melanogaster*, нематоды *C. elegans*, актинии *H. echinata*, гидры *H. vulgaris*, асцидии *Ciona intestinalis* [125], рыб семейства *Cichlidae* [91]. У *D. melanogaster* в морфогенезе участвуют два фермента из семейства астацина – продукты генов *tld* и *tlr*, которые не являются взаимозаменяемыми и активны на разных стадиях развития эмбриона [95]. Возможные пути влияния протеиназ семейства астацина на морфогенез включают активацию предшественников физиологически активных пептидов (например, при регенерации у пресноводной гидры [18]), создание градиентов факторов роста (этот механизм был впервые установлен на примере продукта гена *tolloid* мухи *D. melanogaster*) или непосредственное расщепление компонентов межклеточного матрикса, приводящее к изменению его структуры (вероятно, таков механизм действия фермента SpAN морского ежа [41]). Нефрозин рыбы *D. rerio* обеспечивает миграцию гранулоцитов в межклеточном матриксе во время развития сосудистой системы эмбриона [126], а протеиназа *C. elegans* NAS-34 необходима для миграции нейробластов – предшественников нервных клеток [14].

К семейству астацина относятся нерестовые ферменты (hatching enzymes), обеспечивающие вылупление личинок речного рака (АЕА [127]), лягушки *X. laevis* (UVS-2) [27] и нематоды *C. elegans* (NAS-34) [14], а также хориолизины, обеспечивающие вылупление мальков многих видов рыб [35, 36, 46]. Сходную функцию, вероятно, выполняет протеиназа *C. elegans* NAS-7 на эмбриональной стадии развития нематоды [14]. Протеиназа NAS-37 *C. elegans* разрушает кутикулу во время линьки червя. Гены ортологов этого белка, предположительно выполняющих ту же функцию, обнаружены в геномах паразитических нематод *Brugia malayi*, *Strongyloides ratti* и *Meloidogyne chitwoodi* [109].

ВМР-1 участвует в регуляции ангиогенеза: при ограниченном протеолизе этим ферментом пролактина и гормона роста, стимулирующих ангиогенез, образуются фрагменты с молекулярной массой 16-17 кДа, обладающие мощной антиангиогенной активностью [128]. Ферменты семейства ВМР-1 расщепляют перлекан – протеогликан, играющий важную роль в ангиогенезе и васкуляризации опухолевых тканей. Образующийся ламининоподобный глобулярный домен (LG3) обладает ангиостатической активностью [129]. Подавление ангиогенеза при действии ВМР-1 становится особенно важным, если в организме возникает опухоль: синтез мРНК ВМР-1 индуцируется в клетках эндотелия, ассоциированного с опухолями (по сравнению с покоящимся эндотелием) [128].

Продукты гидролиза проколлагена ферментами из семейства ВМР-1 выполняют регуляторные функции: так, С-концевой домен, который отщепляется при превращении проколлагена I в тропоколлаген, является хемотактическим фактором для клеток эндотелия, а аналогичный домен проколлагена II идентичен хондрокальцину – регулятору минерализации тканей. Пропептид лизилоксидазы, образующийся при действии ВМР-1, препятствует возникновению опухолей, ингибируя активацию фактора транскрипции NFκB белком Ras [114].

Фермент ВМР-1 был впервые выделен в виде комплекса с белками ВМР-2 и ВМР-3, принадлежащими к семейству трансформирующего фактора роста β (TGF-β): считается, что ВМР-1 активирует эти два белка, которые могут влиять на развитие эмбриона. ВМР-1 и mTII-1 также расщепляют хордин – антагонист белков ВМР-2 и ВМР-4, участвующий в регуляции эмбрионального развития. Ферменты семейства ВМР-1 активируют латентный миостатин – белок, принадлежащий к семейству TGF-в и подавляющий рост скелетной мускулатуры [130].

ВМР-1 также переводит предшественник аполипопротеина А (основного компонента липопротеина высокой плотности) в фосфолипид-связывающую форму, таким образом способствуя образованию нормально функционирующего липопротеина высокой плотности и влияя на транспорт холестерина [131].

Уровень экспрессии гена астациновой протеиназы моллюска *Aplysia californicum*, близкой по структуре к ВМР-1 и продукту гена *tolloid* *D. melanogaster*, в сенсорных нейронах повышается в процессе выработки у моллюсков оборонительного рефлекса. Вероятно, эта протеиназа влияет на морфологию синаптических контактов между сенсорными и моторными нейронами [132]. Уровень экспрессии гена *til-1* в головном мозге мышей повышается, если условия обитания животных благоприятствуют нейрогенезу [133]. Следует отметить, что в головном мозге человека синтезируется один из гомологов продукта гена *tolloid* - mTII-1 [134].

Активность по отношению к физиологически активным пептидам характерна для мепринов: например, меприн А расщепляет ангиотензин, гастрин [135], глюкагон, люлиберин, холецистокинин, нейротензин, паратгормон, вещество Р и меланоцит-стимулирующий гормон [56]. Меприн β расщепляет гастрин [135] и отщепляет карбоксиконцевой фрагмент протеинкиназы А, инактивируя её [136]. Меприны также расщепляют факторы роста и цитокины (например, остеопонтин и хемотактический пептид моноцитов-1) [56]. Существует предположение, что меприн крысы расщепляет феромоны, содержащиеся в моче, и таким образом влияет на поведение животного [52].

Как видно из приведенных в обзоре данных, цинковые металлопротеиназы – представители семейства астацина весьма разнообразны по структуре и функциям. Число аминокислотных последовательностей астациновых протеиназ, определенных по генам и кДНК, стремительно растет. Важные физиологические функции, выполняемые астациновыми протеиназами, и необычные каталитические свойства этих ферментов требуют выделения индивидуальных белков и их детального изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hooper N.M. (1994) FEBS Lett., **354**, 1-17.
2. Stöcker W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Ruth F.X., Mc Kay D.B., Bode W. (1995) Protein Sci., **4**, 823-840.
3. Stöcker W. (1998) in: Handbook of Proteolytic Enzymes (eds. Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1219-1222.
4. Borchert N., Becker-Pauly C., Wagner A., Fischer P., Stöcker W., Brattig N.W. (2007) Microbes Infect., **9**, 498-506.
5. Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. (2008) Nucleic Acids Res., **36**, D320-D325.
6. Bond J.S., Beynon R.J. (1995) Protein Sci., **4**, 1247-1261.
7. Bode W., Gomis-Rüth F.X., Huber R., Zwilling R., Stöcker W. (1992) Nature, **358**, 164-167.
8. Garrigue-Antar L., Barker C., Kadler K.E. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 26237-26242.
9. Butler G.S., Tam E.M., Overall C.M. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 15615-15620.
10. Hege T., Baumann U. (2000) Acta Cryst. A, **56** (Supplement), s. 253.
11. Yokozawa Y., Tamai H., Tatewaki S., Tajima T., Tsuchiya T., Kanzawa N. (2002) J. Biochem., **132**, 751-758.
12. Johnson G.D., Bond J.S. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 28126-28132.
13. Jiang W., Bond J.S. (1998) in: Handbook of Proteolytic Enzymes (eds. Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1243-1245.
14. Möhrlen F., Hutter H., Zwilling R. (2003) Eur. J. Biochem., **270**, 4909-4920.
15. Porter S., Clark I.M., Kevorkian L., Edwards D.R. (2005) Biochem. J., **386**, 15-27.
16. Tarentino A.L., Quinones G., Grimwood B.G., Hauer C.R., Plummer T.H.Jr. (1995) Arch. Biochem. Biophys., **319**, 281-285.
17. Quesada V., Sanchez L.M., Alvarez J., Lopez-Otin C. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 26627-26634.
18. Sarras M.P., Yan L., Leontovich A., Zhang J.S. (2002) Cell Res., **12**, 163-176.
19. Möhrlen F., Maniura M., Plickert G., Frohme M., Frank U. (2006) Evol. Dev., **8**, 223-231.
20. Pan T., Groger H., Schmid V., Spring J. (1998) Dev. Genes Evol., **208**, 259-266.
21. Xiong X., Chen L., Li Y., Xie L., Zhang R. (2006) Biochim. Biophys. Acta, **1759**, 526-534.
22. Tsukuba T., Bond J.S. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 35260-35267.
23. Tang J., Bond J.S. (1998) Arch. Biochem. Biophys., **349**, 192-200.
24. Hahn D., Lottaz D., Sterchi E.E. (1997) Eur. J. Biochem., **247**, 933-941.
25. Litovchik L., Chestukhin A., Shaltiel S. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 29043-29051.
26. Hahn D., Pischitzis A., Rösmann S., Hansen M.K., Leuenberger B., Luginbühl U., Sterchi E.E. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 42829-42839.
27. Fan T.J., Katagiri C. (2001) Eur. J. Biochem., **268**, 4892-4898.
28. Wermter C., Howel M., Hintze V., Bombosch B., Aufenvenne K., Yiallourous I., Stöcker W. (2007) Biol. Chem., **388**, 513-521.
29. Garrigue-Antar L., François V., Kadler K.E. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 49835-49841.
30. Hartigan N., Garrigue-Antar L., Kadler K.E. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 18045-18049.
31. Hung C.H., Huang H.R., Huang C.J., Huang F.L., Chang G.D. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 13772-13778.
32. Möhrlen F., Baus S., Gruber A., Rackwitz H.-R., Schnolzer M., Vogt G., Zwilling R. (2001) Eur. J. Biochem., **268**, 2540-2546.
33. Ravi Ram K., Sirot L.K., Wolfner M.F. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **103**, 18674-18679.
34. Leighton M., Kadler K.E. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 18478-18484.
35. Yasumasu S., Yamagami K. (1998) in: Handbook of Proteolytic Enzymes (eds. Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1233-1235.

36. *Yasumasu S., Yamagami K.* (1998) in: Handbook of Proteolytic Enzymes (eds. Barrett A.J Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1235-1236.
37. *Becker C., Kruse M.N., Slotty K.A., Kohler D., Harris J.R., Rösmann S., Sterchi E.E., Stöcker W.* (2003) *Biol. Chem.*, **384**, 825-831.
38. *Johnson G.S., Bond J.S.* (1998) in: Handbook of Proteolytic Enzymes (eds. Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1227-1229.
39. *Yiallourous 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.* (2002) *J. Mol. Biol.*, **324**, 237-246.
40. *Lun H.M., Mak C.H., Ko R.C.* (2003) *Parasitol. Res.*, **90**, 27-37.
41. *Angerer L., Hussain S., Wei Z., Livingston B.T.* (2006) *Dev. Biol.*, **300**, 267-281.
42. *Geier G., Jacob E., Stöcker W., Zwilling R.* (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 300-307.
43. *Hahn D., Illisson R., Metspalu A., Sterchi E.E.* (2000) *Biochem. J.*, **346**, 83-91.
44. *Jiang W., Flannery A.V.* (1997) *Gene*, **189**, 65-71.
45. *Lhomond G., Ghiglione C., Lepage T., Gache C.* (1996) *Eur. J. Biochem.*, **238**, 744-751.
46. *Kawaguchi M., Yasumasu S., Hiroi J., Naruse K., Inoue M., Iuchi I.* (2006) *Dev. Genes Evol.*, **216**, 769-784.
47. *Yasumasu S., Shimada H., Inohaya K., Yamazaki K., Iuchi I., Yasumasu I., Yamagami K.* (1996) *Eur. J. Biochem.*, **237**, 752-758.
48. *Kessler E.* (1998) in: Handbook of Proteolytic Enzymes (eds. Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1236-1240.
49. *Becker-Pauly C., Howel M., Walker T., Vlad A., Aufenvenne K., Oji V., Lottaz D., Sterchi E.E., Debela M., Magdolen V., Traupe H., Stöcker W.* (2007) *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 1115-1125.
50. *Henning S.J., Oesterreicher T.J., Osterholm D.E., Lottaz D., Hahn D., Sterchi E.* (1999) *FEBS Lett.*, **462**, 368-372.
51. *Johnson G.S., Bond J.S.* (1998) in: Handbook of Proteolytic Enzymes (eds. Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1222-1226.
52. *Beynon R.J., Oliver S., Robertson D.H.* (1996) *Biochem. J.*, **315**, 461-465.
53. *Kadowaki T., Tsukuba T., Bertenshaw G.P., Bond J.S.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 25577-25584.
54. *Garrigue-Antar L., Hartigan N., Kadler K.E.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 43327-43334.
55. *Leuenberger B., Hahn D., Pischitzis A., Hansen M.K., Sterchi E.E.* (2003) *Biochem. J.*, **369**, 659-665.
56. *Villa J.P., Bertenshaw G.P., Bylander J.E., Bond J.S.* (2003) *Biochem. Soc. Symp.*, **70**, 53-63.
57. *Ishmael F.T., Norcum M.T., Benkovic S.J., Bond J.S.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23207-23211.
58. *Bertenshaw G.P., Norcum M.T., Bond J.S.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 2522-2532.
59. *Butler P.E., Bond J.S.* (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 13419-13426.
60. *Foradori M.J., Tillinghast E.K., Smith J.S., Townley M.A., Mooney R.E.* (2006) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **143**, 257-268.
61. *Stöcker W., Zwilling R.* (1995) *Meth. Enzymol.*, **248**, 305-325.
62. *Butler P.E., Mc Kay M.J., Bond J.S.* (1987) *Biochem. J.*, **241**, 229-235.
63. *Bertenshaw G.P., Villa J.P., Hengst J.A., Bond J.S.* (2002) *Biol. Chem.*, **383**, 1175-1183.
64. *Hojima Y., Behta B., Romanic A.M., Prockop D.J.* (1994) *Matrix Biol.*, **14**, 113-120.
65. *Kawaguchi M., Yasumasu S., Shimizu A., Hiroi J., Yoshizaki N., Nagata K., Tanokura M., Iuchi I.* (2005) *FEBS J.*, **272**, 4315-4326.

66. *Park H.I., Ming L.J.* (1998) *J. Inorg. Biochem.*, **72**, 57-62.
67. *Yiallourous I., Vassiliou S., Yiotakis A., Zwilling R., Stöcker W., Dive V.* (1998) *Biochem. J.*, **331**, 375-379.
68. *Yiallourous I., Grosse Berkhoff E., Stöcker W.* (2000) *FEBS Lett.*, **484**, 224-228.
69. *Doll B.A., Villa J.P., Ishmael F.T., Bond J.S.* (2002) *Biol. Chem.*, **383**, 1167-1173.
70. *Vallee B.L., Auld D.S.* (1990) *Biochemistry*, **29**, 5647-5659.
71. *McCall K.A., Huang C.C., Fierke C.A.* (2000) *J. Nutr.*, **130**, 1437S-1446S.
72. *da Silva G.F., Reuille R.L., Ming L.J., Livingston B.T.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 10737-10744.
73. *Soler D., Nomizu T., Brown W.E., Shibata I., Auld D.S.* (1995) *J. Protein Chem.*, **14**, 511-520.
74. *Tarentino A.L.* (1998) in: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (eds. Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1241-1242.
75. *Ge G., Zhang Y., Steiglitz B.M., Greenspan D.S.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 10786-10798.
76. *Sterchi E.E., Naim H.Y., Lentze M.J., Hauri H.P., Fransen J.A.* (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, **265**, 105-118.
77. *Sterchi E.E.* (1998) in: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (eds. Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F.). Academic Press, London, pp. 1229-1232.
78. *Ge G., Seo N.S., Liang X., Hopkins D.R., Hook M., Greenspan D.S.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 41626-41633.
79. *Medeck R.J., Sosa S., Morris N., Oxford J.T.* (2003) *Biochem. J.*, **376**, 361-368.
80. *Zhang Y., Ge G., Greenspan D.S.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 39096-39104.
81. *Semenova S.A., Rudenskaya G.N., Rebrikov D.V., Isaev V.A.* (2006) *Protein Pept. Lett.*, **13**, 571-575.
82. *Wagner W., Möhrten F., Schnetter W.* (2002) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 803-814.
83. *Villa J.P., Bertenshaw G.P., Bond J.S.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 42545-42550.
84. *Wolz R.L.* (1994) *Arch. Biochem. Biophys.*, **310**, 144-151.
85. *Stöcker W., Gomis-Rüth F.X., Bode W., Zwilling R.* (1993) *Eur. J. Biochem.*, **214**, 215-231.
86. *Wolz R.L., Harris R.B., Bond J.S.* (1991) *Biochemistry*, **30**, 8488-8493.
87. *Yan L., Leontovich A., Fei K., Sarras M.P., Jr.* (2000) *Dev. Biol.*, **219**, 115-128.
88. *Kruse M.N., Becker C., Lottaz D., Kohler D., Yiallourous I., Krell H.W., Sterchi E.E., Stöcker W.* (2004) *Biochem. J.*, **378**, 383-389.
89. *da Silveira R.B., Wille A.C., Chaim O.M., Appel M.H., Silva D.T., Franco C.R., Toma L., Mangili O.C., Gremski W., Dietrich C.P., Nader H.B., Veiga S.S.* (2007) *Biochem. J.*, **406**, 355-363.
90. *Yasumasu S., Iuchi I., Yamagami K.* (1989) *J. Biochem. (Tokyo)*, **105**, 212-218.
91. *Kijimoto T., Watanabe M., Fujimura K., Nakazawa M., Murakami Y., Kuratani S., Kohara Y., Gojobori T., Okada N.* (2005) *Mol. Biol. Evol.*, **22**, 1649-1660.
92. *Lee S.T., Kessler E., Greenspan D.S.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 21992-21996.
93. *Reynolds S.D., Zhang D., Puzas J.E., O'Keefe R.J., Rosier R.N., Reynolds P.R.* (2000) *Gene*, **248**, 233-243.
94. *Richard-Blum S., Bernocco S., Font B., Moali C., Eichenberger D., Farjanel J., Burkhardt E.R., van der Rest M., Kessler E., Hulmes D.J.S.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33864-33869.
95. *Serpe M., Ralston A., Blair S.S., O'Connor M.B.* (2005) *Development*, **132**, 2645-2656.
96. *Guncheva M., Dolashka-Angelova P., Stambolieva N.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1597**, 335-338.
97. *Stöcker W., Sauer B., Zwilling R.* (1991) *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **372**, 385-392.
98. *Lottaz D., Buri C., Monteleone G., Rösmann S., Macdonald T.T., Sanderson I.R., Sterchi E.E.* (2007) *Biol. Chem.*, **388**, 337-341.
99. *Zwilling R., Dörsam H., Torff H.J., Rödl J.* (1981) *FEBS Lett.*, **127**, 75-78.

100. Grams F., Brandstetter H., D'Alm S., Geppert D., Krell H.-W., Leinert H., Livi V., Menta E., Oliva A., Zimmermann G. (2001) *Biol. Chem.*, **382**, 1277-1285.
101. Delaet N.G., Robinson L.A., Wilson D.M., Sullivan R.W., Bradley E.K., Dankwardt S.M., Martin R.L., Van Wart H.E., Walker K.A. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 2101-2104.
102. Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. (2002) *J. Cell. Sci.*, **115**, 3719-3727.
103. Lee H.X., Ambrosio A.L., Reversade B., De Robertis E.M. (2006) *Cell*, **124**, 147-159.
104. Tsai P.L., Chen C.H., Huang C.J., Chou C.M., Chang G.D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 11146-11155.
105. Hirano M., Ma B.Y., Kawasaki N., Okimura K., Baba M., Nakagawa T., Miwa K., Kawasaki N., Oka S., Kawasaki T. (2005) *J. Immunol.*, **175**, 3177-3185.
106. Yan J., Cheng Q., Li C.-B., Aksoy S. (2002) *Insect Mol. Biol.*, **11**, 57-65.
107. Ferreira A.H., Cristofolletti P.T., Lorenzini D.M., Guerra L.O., Paiva P.B., Briones M.R., Terra W.R., Ferreira C. (2007) *J. Insect. Physiol.*, **53**, 1112-1124.
108. Pappano W.N., Steiglitz B.M., Scott I.C., Keene D.R., Greenspan D.S. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 4428-4438.
109. Wayne Davis M., Birnie A.J., Chan A.C., Page A.P., Jorgensen E.M. (2004) *Development*, **131**, 6001-6008.
110. Kessler E., Fichard A., Chanut-Delalande H., Brusel M., Ruggiero F. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 27051-27057.
111. Rattenholl A., Pappano W.N., Koch M., Keene D.R., Kadler K.E., Sasaki T., Timpl R., Burgeson R.E., Greenspan D.S., Bruckner-Tuderman L. (2001) *J. Biol. Chem.*, **277**, 26372-26378.
112. Steiglitz B.M., Ayala M., Narayanan K., George A., Greenspan D.S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 980-986.
113. Scott I.C., Imamura Y., Pappano W.N., Troedel J.M., Recklies A.D., Roughley P.J., Greenspan D.S. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 30504-30511.
114. Hasilik A. (2007) in: *Biochemie und Pathobiochemie* (Georg Löffler, Petro E. Petrides and Peter C. Heinrich, eds), Springer, Berlin-Heidelberg, pp. 317-318.
115. Borel A., Eichenberger D., Farjanel J., Kessler E., Gleyzal S., Hulmes D.J., Sommer P., Font B. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 48988-48989.
116. Crisman J.M., Zhang B., Norman L.P., Bond J.S. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 4510-4519.
117. Lottaz D., Maurer C.A., Hahn D., Büchler M.W., Sterchi E.E. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 1127-1133.
118. Padanilam B.J. (2003) *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **284**, F608-F627.
119. Schütte A., Lottaz D., Sterchi E.E., Stöcker W., Becker-Pauly C. (2007) *Biol. Chem.*, **388**, 523-531.
120. Herzog C., Seth R., Shah S.V., Kaushal G.P. (2007) *Kidney Int.*, **71**, 1009-1018.
121. Rösmann S., Hahn D., Lottaz D., Kruse M.N., Stöcker W., Sterchi E.E. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 40650-40658.
122. Ha T.-S., Barnes J.L., Stewart J.L., Ko W.C., Miner J.H., Abrahamson D.R., Sanes J.R., Kasinath B.S. (1999) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 1931-1939.
123. Williamson A.L., Lustigman S., Oksov Y., Deumic V., Plieskatt J., Mendez S., Zhan B., Bottazzi M.E., Hotez P.J., Loukas A. (2006) *Infect. Immun.*, **74**, 961-967.
124. Shibata I., Iwamatsu T., Oba Y., Kobayashi D., Tanaka M., Nagahama Y., Suzuki N., Yoshikuni M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 8349-8354.
125. Davis S.W., Smith W.C. (2002) *Dev. Genes Evol.*, **212**, 81-86.
126. Song H.D., Sun X.J., Deng M., Zhang G.W., Zhou Y., Wu X.Y., Sheng Y., Chen Y., Ruan Z., Jiang C.L., Fan H.Y., Zou L.I., Kanki J.P., Liu T.X., Look A.T., Chen Z. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **101**, 16240-16245.
127. Geier G., Zwillig R. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **253**, 796-803.
128. Ge G., Fernández C.A., Moses M.A., Greenspan D.S. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10010-10015.

АСТАЦИНОВЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ

129. *Gonzalez E.M., Reed C.C., Bix G., Fu J., Zhang Y., Gopalakrishnan B., Greenspan D.S., Iozzo R.V.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 7080-7087.
130. *Wolfman N.M., McPherron A.C., Pappano W.N., Davies M.V., Song K., Tomkinson K.N., Wright J.F., Zhao L., Sebald S.M., Greenspan D.S., Lee S.J.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15842-15846.
131. *Chau P., Fielding P.E., Fielding C.J.* (2007) *Biochemistry*, **46**, 8445-8450.
132. *Liu Q.-R., Hattar S., Endo S., MacPhee K., Zhang H., Cleary L.J., Byrne J.H., Eskin A.* (1997) *J. Neurosci.*, **17**, 755-764.
133. *Tamura G., Olson D., Miron J., Clark T.G.* (2005) *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **142**, 81-90.
134. *Takahara K., Brevard R., Hoffman G.G., Suzuki N., Greenspan D.S.* (1996) *Genomics*, **34**, 157-165.
135. *Chestukhin A., Litovchik L., Muradov K., Batkin M., Shaltiel S.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 3153-3160.
136. *Chestukhin A., Muradov K., Litovchik L., Shaltiel S.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30272-30280.

Поступила: 18. 10. 2007.

THE ASTACIN FAMILY OF METALLOPROTEINASES

S.A. Semenova, G.N. Rudenskaya

School of Chemistry, Moscow State University, Leninskie Gory, 1, bld 3, Moscow, 119991 Russia;
tel.: (495) 939-55-41; fax: (495) 939-31-81; e-mail: proteazniki2005@yahoo.com.

The review deals with the properties of astacin family of zinc-dependent metalloproteinases. One of the remarkable features of these enzymes is their ability to cleave peptidyl-arylamides, which is not typical to other metalloproteinases. Special attention is paid to physiological functions of the astacins and to the influence of domain composition and posttranslational modifications on the activity and stability of these enzymes.

Key words: astacin, metalloproteinase, extracellular matrix.