



УДК 577.152.342.2.02

ПРОЛИНСПЕЦИФИЧНЫЕ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ

© 2003 г. Д. В. Беседин[#], Г. Н. РуденскаяМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва ГСП-3, В-234, Воробьевы горы, МГУ

Поступила в редакцию 10.09.2001 г. Принята к печати 28.02.2002 г.

Пролилэндопептидазы, или постпролинрасщепляющие ферменты, – специфичные эндопептидазы, гидролизующие пептидный субстрат по карбоксилу остатка пролина, находящегося внутри пептида. В обзоре рассмотрены все известные на сегодняшний день пролилэндопептидазы животных, микроорганизмов, грибов и растений, а также постпролинрасщепляющие ферменты, не специфичные по остатку пролина. Представлены данные о физико-химических и энзиматических свойствах этих ферментов, субстратной специфичности, ингибиторах пролилэндопептидаз, первичной и пространственной структуре ферментов.

Ключевые слова: пролилэндопептидазы; постпролинрасщепляющие ферменты; пролинспецифичные эндопептидазы; эндопептидаза 24.16; субстратная специфичность; ингибиторы пролилэндопептидаз; первичная и пространственная структура.

Введение

1. Пролилэндопептидазы животных

1.1. Сериновые пролилэндопептидазы животных

1.1.1. Локализация

1.1.2. Физико-химические свойства

1.1.3. Ингибиторы

1.1.4. Субстратная специфичность

1.1.5. Первичная и пространственная структура

1.2. Неклассифицированные пролилэндопептидазы животных

1.3. Протеиназы животных, расщепляющие связи пролина, но не специфичные по остаткам пролина

1.4. Функции пролилэндопептидаз животных

2. Пролинспецифичные эндопептидазы микроорганизмов и грибов

2.1. Локализация

2.2. Пролилэндопептидаза *Flavobacterium meningosepticum*2.3. Пролилэндопептидаза *Xanthomonas* sp.2.4. Пролилэндопептидаза *Sphingomonas capsulata*

2.5. Пролилэндопептидазы грибов

3. Пролилэндопептидазы растений

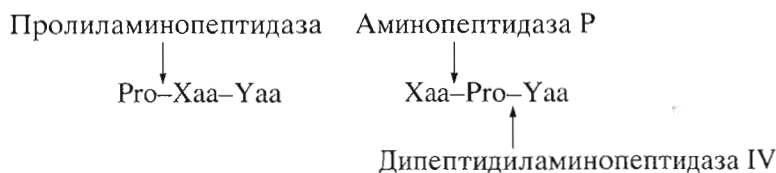
4. Применение пролилэндопептидаз

ВВЕДЕНИЕ

Вследствие уникальной структуры пролина пептидные связи, образованные остатками этой аминокислоты, зачастую устойчивы к действию пептидаз, в том числе ферментов с широкой специфичностью. Вместе с тем известен ряд пептидаз, распознающих пирролидиновое кольцо пролина и осуществляющих деградацию пептидов и белков до отдельных аминокислот. Эти пептидазы в свою очередь различаются по специфичности, поскольку “узнают” остаток пролина в строго определенном положении пептидного субстрата. Пролинспецифичные пептидазы подразделяются на экзопептидазы, дипептидазы и эндопептидазы. Например, пролиламинопептидаза (клан SC, семейство S33, MEROPS ID: S33.001 [1–4]; КФ 3.4.11.5) требует наличия остатка пролина на N-конце пептида, в то время как аминокислота Р (клан MG, семейство M24, MEROPS ID: M24.005 [1–4]; КФ 3.4.11.9) и дипептидиламинопептидаза IV (клан SC, семейство S9, MEROPS ID: S09.003, S09.013 [1–4]; КФ 3.4.14.5) распознают остаток пролина в положении, соседнем с N-концевым:

Сокращения: Abz – *o*-аминобензоил; βNA – β-нафтиламино; Ded – 2,4-динитрофенилэтилендиамино; DEPC – диэтилпирокрбонат; DFP – диизопропилфторфосфат; DTT – 1,4-дитиотреит; Glp – пироглутамил; Mca – 7-(4-метил)кумариниламино; Mpa – 4-метокси-β-нафтиламино; ONp – *n*-нитрофенокси; РСМВ – *n*-хлормеркурибензойная кислота; РСМBS – *n*-хлормеркурибензолсульфокислота; РНМВ – *n*-гидроксимеркурибензойная кислота; РМСF – фенилметилсульфонилфторид; рNA – *n*-нитроанилино; TLCM – тозиллизилхлорметан; ТРСМ – тозилфенилаланилхлорметан. Все аминокислоты, кроме особо указанных, L-ряда.

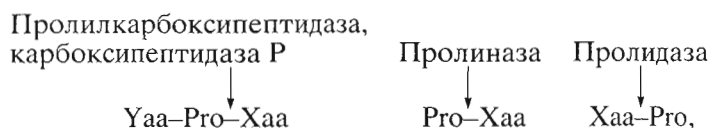
[#] Автор для переписки (эл. почта: laboratoriahps@hotmail.com; тел.: (095) 939-55-41; факс: (095) 939-31-81).



где Хаа – остаток аминокислоты, Yaa – остаток аминокислоты или пептида.

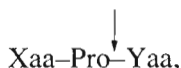
Пролилкарбоксипептидаза (клан SC, семейство S28, MEROPS ID: S28.001 [1–4]; КФ 3.4.16.2) и карбоксипептидаза Р (клан MX, семейство M99, MEROPS ID: M9E.004 [1–4]; КФ 3.4.17.6) специфически узнают остаток пролина в соседнем с

С-концевым положении, в то время как дипептидазы пролиназа (клан MX, семейство M99, MEROPS ID: M9B.003 [1–4]; КФ 3.4.13.8) и пролидаза (клан MG, семейство M24, MEROPS ID: M24.003 [1–4]; КФ 3.4.13.9) расщепляют дипептиды с остатком пролина на N- и С-конце соответственно [5]:



где Хаа – остаток аминокислоты, Yaa – остаток аминокислоты или пептида.

В дополнение к этим экзопептидазам были обнаружены и описаны ферменты, расщепляющие связи пролина внутри пептидного субстрата, которые названы пролилэндопептидазами, или постпролинрасщепляющими ферментами [6]. Эти ферменты (клан SC, семейство S9, MEROPS ID: S09.001 [1–4]; КФ 3.4.21.26) гидролизуют субстрат по карбоксилу остатка пролина, находящегося внутри пептида (или эфира):



где Хаа – остаток защищенной аминокислоты или пептида, Yaa – аминокислотный или пептидный остаток, алифатическая или ароматическая аминогруппа или алкоксигруппа [5, 7].

1. ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ ЖИВОТНЫХ

1.1. Сериновые пролилэндопептидазы животных

1.1.1. Локализация

Локализация пролилэндопептидаз изначально была исследована с использованием в качестве субстрата меченого окситоцина. Сравнение экстрактов из почек ряда животных показало, что почка ягненка содержит наивысшую концентрацию пролилэндопептидазы по отношению к другим окситоцинразрушающим ферментам [8]. В дальнейшем, с использованием высокоспецифичных субстратов (например, Cbz-Gly-Pro-Mca), а также ингибиторов, которые были разработаны в ходе исследования субстратной специфичности очищенной пролилэндопептидазы из почки ягненка [5], пролилэндопептидазная активность бы-

ла обнаружена во всех органах крысы, подвергнутой исследованию, и оказалась наивысшей в мозге, скелетных мышцах и семенниках [9]. Во всех случаях пролилэндопептидазы находились в растворимых фракциях бесклеточных тканевых экстрактов. В работе [10] была изучена локализация пролилэндопептидаз в различных тканях человека с использованием флуорогенного субстрата Suc-Gly-Pro-Mca. Высокие уровни активности были обнаружены в мышцах, семенниках, почках и подчелюстной железе, сравнительно низкие – в сердце, брыжейке и аортах. Относительно высокая пролилэндопептидазная активность была найдена в коре головного мозга, в то время как другие отделы мозга имели весьма низкую ферментативную активность. Последующие исследования [11] показали высокую активность пролилэндопептидаз в кортикальном слое почек, клетках эпителия, фибробластах, лимфоцитах и тромбоцитах человека.

1.1.2. Физико-химические свойства

Оптимум pH большинства пролилэндопептидаз по гидролизу синтетических хромогенных субстратов находится в диапазоне pH от 7.0 до 8.5 (табл. 1). Ферменты стабильны в диапазоне pH 5.5–9.5 при инкубации при температуре 37°C в течение 1 ч. Температурный оптимум активности соответствует 45–50°C. Изоэлектрические точки пролилэндопептидаз от 4.5 до 4.9 (за исключением фермента из спермы асцидии [26], имеющего pI 5.5).

В ранних работах пролилэндопептидазы рассматривались как димеры с молекулярной массой в нативном состоянии от 115 до 140 кДа [5, 36]. В настоящее время принято считать, что пролилэндопептидазы имеют мономерную структуру, и

Таблица 1. Свойства пролилэндопептидаз животных

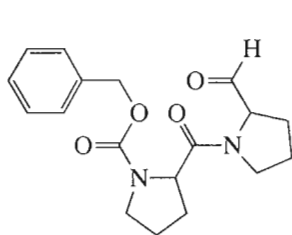
Источник	<i>M</i> , кДа	pI	Оптимум pH	Ингибиторы	Ссылка
Почка ягненка	74	4.8	7.8	DFP, Cbz-Pro-CH ₂ Cl, Cbz-Gly-Pro-CH ₂ Cl, Cbz-Gly-Gly-Pro-CH ₂ Cl; PCMB, PCMBs, йодацетамид (частично)	[5]
Печень цыпленка	–	–	7.5	Mn ²⁺ , Zn ²⁺ (частично)	[12]
Гипофиз быка	76	–	7.4–7.6	DFP, <i>N</i> -этилмалеимид, Hg ²⁺	[13]
Мозг крысы	70–73	4.5	7.0–8.0	DFP, <i>N</i> -этилмалеимид, PCMB; йодацетат, йодацетамид, PMSF, TLCM, TPCM (частично)	[14–16]
Мозг быка, почка быка	75	–	–	DFP, Hg ²⁺ , йодацетамид, <i>N</i> -этилмалеимид, 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота)	[17, 18]
Мозг ягненка	77	4.9	7.0	DFP, Cbz-Gly-Pro-CH ₂ Cl, PCMB, Hg ²⁺ , Cu ²⁺	[19]
Мозг быка	74–75	4.8	7.2–7.5	DFP, Cbz-Gly-Pro-CH ₂ Cl, PCMB	[20]
Мозг свиньи	70	4.9	–	DFP, DEPC, PCMB	[21]
Мозг морской свинки	–	–	–	Бацитрацин	[22]
Мозг человека	79.6	4.75	6.8	DFP	[23]
Мозг кролика	68	4.9	7.5	Активируется тиоловыми реагентами	[24, 25]
Сперма асцидии	66	5.5	7.0	DFP, PMSF, Cbz-Gly-Pro-CH ₂ Cl, SH-реагенты	[26]
Сперма тихоокеанской сельди	79	–	–	DFP	[27]
Хрусталик глаза быка	72	4.8	7.5	DFP, <i>N</i> -этилмалеимид	[28]
Почка свиньи	67–70	–	–	–	[7, 29]
Мышцы поросенка	72–74	–	–	DFP	[30]
Сыворотка человека	74	–	7.5	DFP	[31]
Грануломатозное воспаление кожи мышей	79	–	–	DFP	[32]
Кожа крысы	70	–	5.8	DFP, PCMB, <i>N</i> -этилмалеимид, Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , PMSF (частично)	[33]
Лимфоциты человека	80.7	4.8	7.0–8.0	DFP, PMSF, 3,4-дихлоризокумарин, PCMB, Cbz-Pro-пролинал, Cbz-тиопролилтиопролинал, Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺	[34]
Сыворотка быка	69.7	–	8.0–8.5	Ингибиторы сериновых протеиназ, SH-реагенты; α-кетобензотиазол	[35]

их молекулярная масса находится в пределах 65–85 кДа [36] (табл. 1). Эти данные подтверждаются установлением пространственной структуры некоторых пролилэндопептидаз.

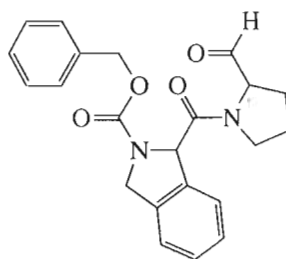
1.1.3. Ингибиторы

Большинство пролилэндопептидаз стехиометрически ингибируется диизопропилфторфосфатом [5], что указывает на их принадлежность к сериновым протеиназам. PMSF лишь незначительно снижает активность пролилэндопептидаз. Частичное ингибирование ферментов йодацетамидом,

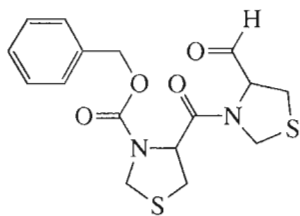
Hg²⁺, PCMB и PCMBs [5], а также активация под действием DTT [8] свидетельствуют о наличии в молекулах этих белков остатков цистеина, важных для их активности. Считается, что ингибирование тиоловыми реагентами происходит за счет модификации остатка цистеина вблизи активного центра [36], идентифицированного как остаток Cys225 пролилэндопептидазы из мозга свиньи в работе [37]. Описано также ингибирование пролилэндопептидаз 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислотой) [18], DEPC [21], бацитрацином [22], *N*-этилмалеимидом [28], а также частичное ингибирование TLCM и TPCM [14, 15]. Ферменты сохра-



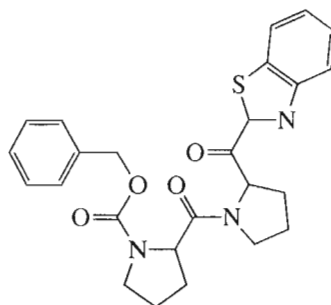
Cbz-Pro-пролиаль



Cbz-Циклогексилпролиаль



Cbz-Тиопролилтиопролиаль

 α -Кетобензотиазол

няют активность в присутствии *o*-фенантролина и EDTA [5].

Специфическими ингибиторами пролилэндопептидаз являются Cbz-Pro-CH₂Cl, Cbz-Gly-Pro-CH₂Cl и Cbz-Gly-Gly-Pro-CH₂Cl, которые необратимо алкилируют активный центр фермента [5]. Высокоспецифичное действие оказывают также производные Cbz-Pro-пролиаля, образующие полуацетальные аддукты с участием альдегидной группы ингибитора и остатка серина активного центра фермента [36]. Значения K_i для некоторых специфических ингибиторов пролилэндопептидаз приведены в табл. 2.

Пролилэндопептидазы не ингибируются такими ингибиторами трипсина, как панкреатический ингибитор трипсина, овомукоид белка куриного яйца, соевый ингибитор трипсина, ингибитор трипсина из лимских бобов или ингибиторами мик-

робного происхождения, такими, как лейпептин, антипаин, химостатин, бестатин, пепстатин, фосфоамидон и эластатиналь (при концентрации ингибиторов 1 мМ) [38], и, таким образом, по характеру ингибирования значительно отличаются от типичных представителей семейства химотрипсина.

1.1.4. Субстратная специфичность

Пролилэндопептидазы были открыты как ферменты, расщепляющие окситоцин. Эти ферменты гидролизуют также многие аналоги окситоцина и вазопрессина, расщепляя пептидную связь, образованную карбоксилем пролина [8]. Кроме того, многие другие пептидные гормоны, содержащие остаток пролина, инактивируются пролилэндопептидазами таким же образом (табл. 3). Напротив, человеческий гастрин, адренокортикотропный гормон, денатурированный коллаген морской свинки не расщепляются этими ферментами [43]. Пролилэндопептидазы не расщепляют также ряд крупных белков и пептидов, таких, как альбумин, IgG, эластин [30, 44], желатин, казеин [20], кортикотропин-рилизинг гормон, убиквитин и апротинин [34].

Строение активного центра пролилэндопептидазы из почки ягненка, включая количество субсайтов и их стереоспецифичность, было исследовано в работе [45]. Параметр специфичности k_{cat}/K_m увеличивается при удлинении субстрата аминокислотными остатками с *N*-конца вплоть до

Таблица 2. Специфические ингибиторы пролилэндопептидаз

Ингибитор	K_i , нМ	Ссылка
Cbz-Pro-пролиаль	14.0	[39]
Cbz-Циклогексилпролиаль	3.0	[40]
Cbz-Индолилпролиаль	2.4	[40]
Cbz-Phe-Pro-CH ₂ Cl	1.8	[41]
α -Кетобензотиазол	0.04	[35]
Cbz-Тиопролилтиопролиаль	0.01	[42]

Таблица 3. Гидролиз пептидных гормонов пролилэндопептидазами* [5, 19, 36]

Субстрат	Структура субстрата
Окситоцин	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys- Pro-Leu -Gly-NH ₂
Вазопрессин	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys- Pro-Arg -Gly-NH ₂
Люлиберин	Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg- Pro-Gly -NH ₂
Тиреолиберин	Glp-His- Pro -NH ₂
Туфтсин	Thr-Lys- Pro-Arg
[Val ⁵]ангиотензин I	Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His- Pro-Phe -His-Leu
[Leu ⁸]ангиотензин II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His- Pro-Leu
Нейротензин	Glp-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys- Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr -Ile-Leu
Вещество P	Arg-Pro-Lys- Pro-Gln -Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Брадикинин	Arg-Pro- Pro-Gly -Phe-Ser- Pro-Phe -Arg
Брадикининпотенцирующий пептид	Glp-Gly-Gly-Trp- Pro-Arg -Pro-Gly- Pro-Glu -Ile-Pro-Pro
Меланотропин	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys- Pro-Val -NH ₂
Инсулин (без Zn ²⁺)	-Phe-Tyr-Thr- Pro-Lys -Ala

* Жирным шрифтом выделены сайты расщепления в субстратах.

Таблица 4. Кинетические параметры гидролиза субстратов общей формулы Cbz-(Aaa)_n-Pro-ONp (*n* = 0–2), катализируемого пролилэндопептидазой из почки ягненка [5]

<i>P</i> ₄	<i>P</i> ₃	<i>P</i> ₂	<i>P</i> ₁	<i>P</i> ' ₁	<i>K</i> _m , мМ	<i>k</i> _{cat} , с ⁻¹	<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m , мМ ⁻¹ с ⁻¹
		Cbz	Pro	ONp	0.14	8.9	62.2
		Cbz	<i>D</i> -Pro	ONp	не гидролизуется		
	Cbz	Gly	Pro	ONp	0.07	32.7	488
	Cbz	Ala	Pro	ONp	0.07	61.0	884
	Cbz	<i>D</i> -Ala	Pro	ONp	пренебрежимо малая скорость гидролиза		
Cbz	Gly	Gly	Pro	ONp	0.27	27.0	98.2
Cbz	Ala	Gly	Pro	ONp	0.38	30.0	78.9
Cbz	<i>D</i> -Ala	Gly	Pro	ONp	1.02	38.2	37.5

положения *P*₃. Если субстрат удлинить еще одним остатком до положения *P*₄, значение *k*_{cat}/*K*_m уменьшается (табл. 4). Таким образом, по-видимому, фермент имеет три субсайта, *S*₁, *S*₂ и *S*₃, для связывания остатков субстрата в *N*-концевом направлении от расщепляемой связи. В то же время увеличение длины цепи Cbz-Gly-Pro в сторону *C*-конца до положения *P*'₂ приводит к увеличению параметра *k*_{cat}/*K*_m. Дальнейшее удлинение до *P*'₃ приводит к уменьшению эффективности гидролиза (табл. 5). Таким образом, можно полагать, что фермент имеет два субсайта, *S*'₁ и *S*'₂, для связывания остатков “уходящего фрагмента” субстрата. Исследование гидролиза субстратов, содержащих *D*-аминокислоты, показало, что только суб-

сайты *S*₂, *S*₁ и *S*'₁ являются стереоспецифичными (табл. 4 и 5) [5].

Пролилэндопептидазы легко гидролизуют любые пептидные связи Pro-Хаа, за исключением последовательности Pro-Pro, расположенные внутри пептидов. Расщепление субстрата не происходит при наличии свободной *N*-концевой α-аминогруппы в последовательности Н-Уаа-Pro-Хаа или Н-Pro-Хаа. Дипептиды вида Cbz-Pro-Хаа также не расщепляются пролилэндопептидазами [36], а Cbz-Pro-*DL*-Хаа конкурентно ингибируют гидролиз субстратов этими ферментами [43].

Хотя пролилэндопептидазы высокоспецифичны к связям остатка пролина, было найдено, что эти ферменты способны гидролизовать также связи Ala-Хаа, но в 100–1000 раз медленнее по сравнению со скоростью гидролиза связей Pro-Хаа [38]. Значимость пролина в положении *P*₁ пепти-

Таблица 5. Кинетические параметры гидролиза субстратов общей формулы Cbz-Gly-Pro-(Aac)_n (*n* = 1–3), катализируемого пролилэндопептидазой из почки ягненка [5]

<i>P</i> ₃	<i>P</i> ₂	<i>P</i> ₁	<i>P</i> ' ₁	<i>P</i> ' ₂	<i>P</i> ' ₃	<i>K</i> _m , mM	<i>k</i> _{cat} , с ⁻¹	<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m , mM ⁻¹ с ⁻¹
Cbz	Gly	Pro	Ala			0.08	15.6	188
Cbz	Gly	Pro	<i>D</i> -Ala			0.25	1.52	6.1
Cbz	Gly	Pro	Phe			0.16	3.2	19.8
Cbz	Gly	Pro	Leu			0.17	26.0	150
Cbz	Gly	Pro	<i>D</i> -Leu			0.32	0.67	2.1
Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly		0.06	52.0	852
Cbz	Gly	Pro	Leu	Ala		0.12	38.4	334
Cbz	Gly	Pro	Leu	<i>D</i> -Ala		0.37	46.0	124
Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly	Gly	0.13	28.0	214
Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	0.18	34.0	187
Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly	<i>D</i> -Ala	0.14	25.0	181
Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	0.68	53.3	78

да была исследована по гидролизу ряда субстратов типа Cbz-Gly-Хаа-Leu-Gly [36]. Субстрат является относительно “хорошим”, если в положении *P*₁ (Хаа) находятся остатки пролина, аланина, *N*-метилаланина или саркозина. При замене Хаа на остаток α-аминомасляной кислоты, гидрокси-пролина, серина или глицина получаются “плохие” субстраты; если же Хаа – это *N*-метилвалин или *N*-метиллейцин, субстраты не гидролизуются вообще. Предполагается, что субсайт *S*₁ фермента устроен так, чтобы специфически располагать остаток пролина. Этот субсайт способен связывать другие замещенные аминокислотные остатки при условии, что они не превосходят по размеру пирролидиновое кольцо пролина [36].

Скорость гидролиза субстрата, содержащего фрагмент Pro-Хаа, выше, если в положении *P*'₁ находится остаток гидрофобной аминокислоты, а не кислый [36, 43] или основной [36] аминокислотный остаток. Фосфорилирование остатка *P*'₁, если это возможно, приводит к увеличению скорости гидролиза [31, 36].

Влияние аминокислотного остатка в положении *P*₂ на скорость гидролиза субстрата было исследовано с использованием ряда новых флуорогенных субстратов [46]. В качестве субстратов выступали дипептиды вида Cbz-Хаа-Pro-Мса, имеющие в положении *P*₂ аминокислотный остаток (Хаа) с различными боковыми функциональными группами: Met, Lys(Вос), Lys, His, Ser, Leu, Glu(OMe), Glu, Cys(Bzl), а также трипептид Cbz-Asn-Cys(Bzl)-Pro-Мса. По результатам исследований, все дипептидные субстраты имеют высокое сродство к ферменту и могут применяться для флуориметрического определения активности. Сайт связывания *S*₂ ферментов может вмещать аминокислот-

ные остатки с объемными заместителями и предпочитает положительно заряженные остатки (Lys) отрицательно заряженным (Glu). Несколько ранее, в работе [47], было изучено влияние модификации (ацетилирования, бензилирования и фосфорилирования) бокового радикала остатков гидроксилсодержащих аминокислот (Ser, Thr) в положении *P*₂ субстратов вида Gly-Хаа-Pro-pNA. Присутствие алифатических или ароматических заместителей в боковом радикале не приводит к заметному изменению специфичности и констант гидролиза субстратов пролилэндопептидазами. По отношению к фосфорилированному аминокислотному остатку в положении *P*₂, напротив, активность пролилэндопептидаз снижается более чем на два порядка (что прямо противоположно эффекту фосфорилирования остатка в положении *P*'₁ субстрата [31]).

1.1.5. Первичная и пространственная структура

Протилэндопептидазы были классифицированы как сериновые протеиназы, исходя из результатов их ингибирования DFP и, в меньшей степени, PMSF [5, 48]. Установление первичной структуры ряда пролилэндопептидаз подтвердило эту классификацию. К настоящему времени установлены первичные структуры постпролинрасщепляющих ферментов из мозга свиньи [49], лимфоцитов человека [34, 50], мозга быка [51] и мозга мыши [52]. Все указанные пролилэндопептидазы состоят из 710 а.о. и являются высокомолекулярными (идентичность – более 95%), несмотря на их различное происхождение. Различие молекулярных масс этих ферментов, определенных ранее (табл. 1), связано с использованием менее точных

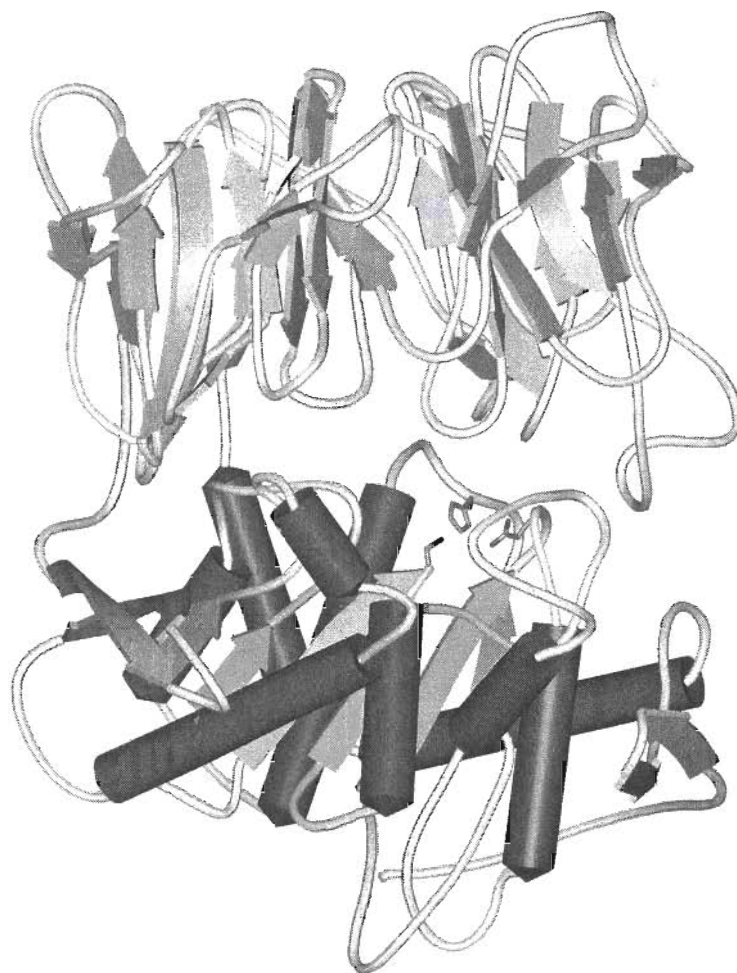


Рис. 1. Модель третичной структуры пролилэндопептидазы из мышц поросенка (по данным работы [53]). Показаны боковые радикалы аминокислотных остатков каталитической триады фермента.

методов, таких, как SDS-электрофорез и гель-фильтрация, и разными условиями их определения.

Сериновые протеиназы делятся на несколько семейств, среди которых наиболее изучены семейства химотрипсина и субтилизина [34]. Оказалось, что пролилэндопептидазы образуют новое семейство ферментов. Главным различием пролилэндопептидаз и классических сериновых протеиназ является топология остатков каталитической триады: классическим протеиназам присуще расположение остатков Asp-His-Ser или His-Asp-Ser, а триада пролилэндопептидаз имеет топологию Ser-Asp-His [36]. Линейное расположение остатков активного центра в пролилэндопептидазах – нуклеофил-кислота-основание подобно расположению остатков в липазах, некоторых сериновых карбоксипептидазах и ацетилхолинэстеразе [34]. Интересно отметить, что пролилкарбоксипептидаза (клан SC, семейство S28, MEROPS ID: S28.001 [1–4]; КФ 3.4.16.2) – лизосомальная сери-

новая карбоксипептидаза, характеризуется таким же линейным расположением остатков активного центра и ингибируется Cbz-Pro-пролином, мощным ингибитором пролилэндопептидаз [34]. Предполагается, что пролилэндопептидазы служат связующим звеном между семействами олигопептидаз и сериновых карбоксипептидаз. Кроме того, учитывая сходство первичных структур пролилэндопептидаз и аминокептидаз (дипептидилпептидазы IV и ациламинопептидазы), авторы статьи [34] предполагают, что структура пролил-олигопептидаз представляет собой эволюционную связь между экзопептидазами и эндопептидазами.

В работах [53, 54] приведена третичная структура пролилэндопептидазы из мышц поросенка, полученная рентгеноструктурным методом с разрешением 1.4 и 2.3 Å соответственно. Модель третичной структуры этой пролилэндопептидазы приведена на рис. 1. Активный центр фермента

расположен в С-концевом участке (нижняя часть), названным протеазным доменом [36], вторичная структурная организация которого соответствует α/β -укладке гидролаз [34, 53]. Каталитическая триада (Ser554, His680, Asp641) покрыта центральным туннелем домена с необычной структурой β -пропеллера (верхняя часть). Именно этот домен не позволяет крупным, структурированным пептидам и белкам войти в активный центр пролилэндопептидаз. Вследствие этого было предложено классифицировать пролилэндопептидазы как олигопептидазы [36, 53]. Функция этого “пропеллера”, по-видимому, заключается в защите крупных цитозольных белков от протеолиза пролилэндопептидазами.

1.2. Неклассифицированные пролилэндопептидазы животных

В плаценте человека была найдена пролинспецифичная эндопептидаза, отличающаяся по свойствам от сериновых пролилэндопептидаз [55, 56]. Фермент был очищен и частично охарактеризован. Оптимум pH активности фермента по гидролизу Suc-Gly-Pro-Mca составляет 6.7, молекулярная масса – 140 кДа по данным гель-фильтрации и 67 кДа по данным SDS-электрофореза, что указывает на его димерную структуру. Ингибиторный анализ свидетельствует о том, что фермент является цистеиновой протеиназой.

В работе [57] сообщается о выделении постпролинрасщепляющей эндопептидазы из легких человека. pH-оптимум по гидролизу Cbz-Gly-Pro-pNA 7.4, молекулярная масса 77 кДа. Фермент ингибируется тиолблокирующими реагентами, а ингибиторы сериновых протеиназ не влияют на его активность. Для функционирования фермента не требуются ионы металлов, вместе с тем ионы тяжелых металлов – Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} – полностью его инактивируют. Для стабилизации ферментативной активности *in vitro* требуются DTT и EDTA. По-видимому, протеиназу можно отнести к классу цистеиновых ферментов. Фермент расщепляет вазоактивные пептиды, такие, как брадикинин, дез-Arg⁹-брадикинин (связи Pro³-Gly⁴ и Pro⁷-Phe⁸), ангиотензины I и II (Pro⁷-Phe⁸), вещество P (Pro⁴-Gln⁵) и окситоцин (Pro⁷-Leu⁸). Каждый из этих пептидов конкурентно ингибирует гидролиз Cbz-Gly-Pro-pNA. Постпролинэндопептидаза не ингибируется каптоприлом, мощным ингибитором ангиотензинпревращающего фермента, также расщепляющего связь Pro⁷-Phe⁸ брадикинина.

В работе [59] представлена краткая характеристика пролинспецифичного фермента, вовлеченного в рост и дифференциацию клеток печени. Гомогенный фермент из микросомальной фракции печени крысы 8-дневного возраста имеет молекулярную массу 65 кДа, расщепляет ряд

флуорогенных пептидных субстратов и физиологически активных пептидов по карбоксилу пролина. Фермент не гидролизует белковые субстраты, являясь таким образом скорее пептидазой, нежели протеиназой. В то время как лучшим субстратом этой пептидазы является Suc-Pro-Leu-Gly-Pro-Mca, чистый фермент не гидролизует Suc-Gly-Pro-Mca, отличаясь, таким образом, от типичных пролилэндопептидаз, таких, как постпролинрасщепляющий фермент из почки ягненка (ср. [5]). Было найдено, что активность этой пролинспецифичной пептидазы в микросомальной фракции печени увеличивается вплоть до восьмого дня постнатального периода, а затем уменьшается, что указывает на высокую корреляцию ферментативной активности с процессом роста и дифференциации клеток печени.

Проллилэндопептидазы преимущественно описаны как цитозольные ферменты, тем не менее имеются данные и о мембранных формах пролилэндопептидаз.

В работе [59] впервые идентифицирована и частично очищена, а в работе [60] полностью очищена и охарактеризована новая пролилэндопептидаза из синапсосомальных мембран мозга быка, значительно отличающаяся по свойствам от других пролилэндопептидаз. Проллилэндопептидаза имеет молекулярную массу 87 кДа – более высокую, чем у цитозольного фермента, что может быть обусловлено присутствием гидрофобного якоря. Мембранная пролилэндопептидаза имеет довольно широкую субстратную специфичность (сходную с таковой у цитозольной формы фермента) и относительно высокое сродство к пролинсодержащим нейропептидам. Фермент гидролизует синтетический субстрат Cbz-Gly-Pro-Mca с K_m 60 мкМ. РСМВ и *N*-этилмалеимид – наиболее эффективные ингибиторы мембранной пролилэндопептидазы, что указывает на присутствие в активном центре фермента важной для активности SH-группы. Тем не менее другие ингибиторы цистеиновых протеиназ, такие, как йодацетамид и йодацетат, не оказывают существенного влияния на ферментативную активность. Антибиотик бацитрацин и ингибитор трипсिनopodobных протеиназ бензамидин также не являются эффективными ингибиторами фермента. Проллилэндопептидаза полностью ингибируется *o*-фенантролином, но не ингибируется другими хелаторами металлов, такими, как EDTA и 8-хинолинол. Специфический ингибитор пролилэндопептидаз Cbz-Pro-пролиналь (0.1 мМ) полностью инактивирует фермент. Исходя из ингибирования пролилэндопептидазы некоторыми ингибиторами цистеиновых протеиназ и хелатором металлов, авторы предлагают классифицировать фермент как “тимет” = (тиолметалло)-пептидазу. Таким образом, мембранный фермент отличается от цитозольной формы главным образом по чувствительнос-

ти к ингибиторам и молекулярной массе, но не по энзиматическим свойствам.

*1.3. Протеиназы животных,
расщепляющие связи пролина,
но не специфичные к остаткам пролина*

Из синаптических мембран мозга крысы выделена пептидаза, расщепляющая нейротензин по связи Pro¹⁰-Tyr¹¹ с образованием нейротензин-(1-10) и нейротензин-(11-13)-фрагментов [61]. Фермент, по-видимому, является мономером, имеет молекулярную массу 72–75 кДа (по данным SDS-электрофореза и ВЭЖХ-фильтрации). pI 5.9–6.0; рН-оптимум 7.0–8.0 (по гидролизу [³H]нейротензина). Специфическая активность очищенного фермента по этому субстрату 1360 мкмоль/мг мин. Фермент не гидролизует субстрат пролилэндопептидаз Cbz-Gly-Pro-Mca, что позволило отличить его от пролилэндопептидазы мозга крысы. Фермент не ингибируется ингибиторами сериновых протеиназ (DFP, PMSF и бензамидином), тиолблокирующими реагентами (йодацетатом и йодацетамидом) и ингибитором кислых протеиназ пепстатином. β-Меркаптоэтанол не оказывает влияния на ферментативную активность в отношении [³H]нейротензина. Исходя из чувствительности к хелаторам металлов, фермент был классифицирован как нейтральная металлопептидаза. Исследования с применением специфических ингибиторов указывают, что фермент отличается от других ферментов, расщепляющих нейротензин – пролилэндопептидаз, ангиотензинпревращающего фермента и мембранной металлоэндопептидазы (клан MA, семейство M13, MEROPS ID: M13.001 [1–4]; КФ 3.4.24.11) мозга крысы. В частности, пептидаза не чувствительна к 1 мкМ Cbz-Pro-пролиналю, специфическому ингибитору пролилэндопептидаз.

Субстратная специфичность фермента была исследована по ингибированию гидролиза [³H]нейротензина пептидными субстратами. Лучшие ингибиторы гидролиза – нейротензин (Glp-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu, K_i 2.6 мкМ), нейромедин N (Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu, K_i 2.5 мкМ), ксенопсин (Glp-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu, K_i 3.0 мкМ) и [Lys⁸-Asn⁹]нейротензин-(8-13) (Lys-Asn-Pro-Tyr-Ile-Leu, K_i 11 мкМ). Для связывания субстрата, по-видимому, существенно наличие, как минимум, трех аминокислотных остатков в С-концевую сторону от расщепляемой связи Pro¹⁰-Tyr¹¹. При соблюдении этого условия пептидаза не чувствительна к замене аминокислотных остатков Ile12 и Leu13 менее гидрофобными остатками, а также замене Tyr11 остатками ароматических аминокислот (Phe, Trp). Однако пептидаза обладает высокой стереоспецифичностью к Tyr11 – замена этого остатка остатком ароматической D-аминокислоты приводит к почти полному отсутствию ингибирования гидролиза

[³H]нейротензина таким пептидом. Остатки Arg8 и Arg9 могут быть успешно заменены их незаряженными аналогами – остатками цитруллина, что указывает на то, что положительный заряд не влияет на сродство пептидазы к аналогу субстрата. Более существенной является конформация этих остатков, поскольку [D-Arg⁹]нейротензин и [D-Arg^{8,9}]нейротензин практически не ингибируют гидролиз [³H]нейротензина этой металлопептидазой.

В работе [62] было изучено ингибирование металлопептидазы дипептидами, имитирующими расщепляемую связь нейротензина Pro-Tyr. Из всех изученных дипептидов серии Pro-Хаа, лучшим ингибитором оказался Pro-Ile (K_i 90 мкМ), менее эффективными – Pro-Met и Pro-Phe. Ни один из дипептидов Хаа-Tyr не ингибирует этот фермент. Было показано, что 5 мМ Pro-Ile не ингибирует другие ферменты, найденные в гомогенате мозга крысы: эндопептидазы 24.11 и 24.15 (условные названия этих пептидаз происходят из двух последних цифр КФ), ангиотензинпревращающий фермент, пролилэндопептидазу, трипсин, лейцинаминопептидазу, пироглутамиламинопептидазу I и карбоксипептидазу В. Таким образом, Pro-Ile можно использовать как специфический ингибитор нейротензинрасщепляющей металлоэндопептидазы.

Аналогичная металлопептидаза была найдена и в мозге свиньи [63, 64]. Фермент имеет молекулярную массу 75 кДа, по данным SDS-электрофореза, не является гликопротеином, поскольку не отщепляется от мембраны обработкой N-гликаназой. Металлопептидаза расщепляет нейротензин по связи Pro¹⁰-Tyr¹¹, но гидролизует и другие субстраты, такие, как Вос-Phe-Ala-Ala-Phe-(4-аминобензоат), брадикинин, вещество P (причем с более высокой скоростью, чем нейротензин), а также динорфин-A-(1-8)-пептид, люлиберин, ангиотензины I и II, α-неоэндорфин. Показано также расщепление ею соматостатина по связям Phe⁶-Phe⁷ и Thr¹⁰-Phe¹¹ [64]. Таким образом, фермент не является строго специфичным по отношению к связям пролина. Эта металлоэндопептидаза ингибируется o-фенантролином и EDTA, но не активируется DTT, отличаясь таким образом от тимет-олигопептидазы 24.15 (клан MX, семейство M3, MEROPS ID: M03.001 [1–4]; КФ 3.4.24.15).

Позже, похожий фермент, который был назван эндопептидазой 24.16 (клан MX, семейство M3, MEROPS ID: M03.002 [1–4]; КФ 3.4.24.16), был выделен из мембран почки крысы [65]. По данным SDS-электрофореза, молекулярная масса фермента 70 кДа. Пептидаза не чувствительна к специфическим ингибиторам аминокислотных пептидаз (бестатин), эндопептидазы 24.11 (тиорфан), пролилэндопептидаз (Cbz-Pro-пролинал) и ангиотензинпревращающего фермента (каптоприл),

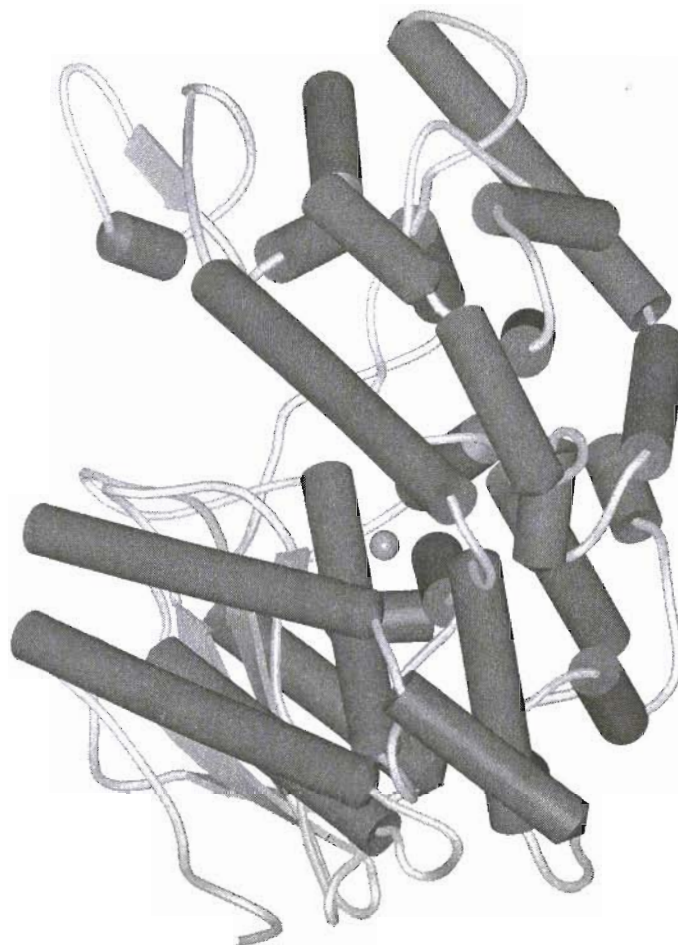


Рис. 2. Модель третичной структуры рекомбинантного нейролизина (по данным работы [69]). Шариком отмечен ион цинка, существенный для активности фермента.

так как многие другие протеолитические ферменты не способны расщеплять пептидные связи, образованные пролином. Эта гипотеза поддерживается фактом присутствия больших количеств пролилэндопептидаз в органах позвоночных животных. В то же время многие пептидные гормоны содержат остатки пролина, причем их содержание, как правило, выше, чем в белках в среднем. Возможно, пролилэндопептидазы имеют особую функцию в регуляции действия пептидных гормонов. В случае окситоцина и вазопрессина, согласно работе [8], внутривенная инъекция меченых гормонов кошке привела к появлению продуктов гидролиза этих гормонов пролилэндопептидазами (Leu-Gly-NH₂ или Arg-Gly-NH₂, а также Gly-NH₂) в моче. Таким образом, пролилэндопептидазы могут играть роль в инактивации окситоцина и вазопрессина *in vivo*.

Дезамидирование тиреолиберина (Glp-His-Pro-NH₂) в мозге и гипоталамусе, а также гидролиз связи Pro⁹-Gly¹⁰ люлиберина, по-видимому, происходит исключительно за счет действия пост-

пролирасщепляющих ферментов [14–17, 71]. Кроме того, данная ферментативная активность в мозге крыс увеличивается до двухнедельного возраста, затем несколько падает. Пролілэндопептидазы могут участвовать в регуляции активности вещества P в мозге и в созревании нейронов путем формирования из вещества P тетрапептида Arg-Pro-Lys-Pro, который имеет почти тот же эффект, что и вещество P, на расширение невритов нейробластомы [72].

Согласно данным работы [73], пролилэндопептидазы, высоко активные в мозге и других тканях, осуществляют катаболизм пролинсодержащих пептидных гормонов, таких, как вещество P, нейротензин, брадикинин и ангиотензин II. Кроме того, структура β-неоэндофина предполагает, что данный опиоидный пептид образуется путем действия пролилэндопептидазы на его предшественник с более высокой молекулярной массой.

Функция постпролинрасщепляющих металлоэндопептидаз (клан МХ, семейство М3, MEROPS ID: M03.002 [1–4]; КФ 3.4.24.16), имеющих мембранную локализацию, также заключается, по-видимому, в деградации нейропептидов, таких, как нейротензин, соматостатин, брадикинин, ангиотензин II, вещество Р, люлиберин, но не вазопрессина и окситоцина [74]. Расщепление этих пептидов, наблюдавшееся в культивированных астроцитах, полученных из коры головного мозга крысы, ингибировалось *o*-фенантролином и Pro-Pe, специфическим ингибитором эндопептидазы 24.16, что указывает на участие именно этой металлоэндопептидазы в процессе фрагментации нейропептидов.

Субклеточная локализация пролилэндопептидазы синаптосомальной мембраны мозга быка [59, 60] также имеет потенциальное физиологическое значение, поскольку она позволяет ферменту осуществлять метаболизм нейропептидов, связанных с везикулами, что невозможно для цитозольной формы фермента.

Значительное уменьшение активности сывороточной пролилэндопептидазы наблюдается у депрессивных пациентов. Группа пептидов, вовлеченных в патофизиологию депрессии, включает в себя [Arg]вазопрессин, β -эндорфин, тиреолиберин и люлиберин, то есть природные субстраты этого фермента. С другой стороны, значительное увеличение активности сывороточной пролилэндопептидазы наблюдается у маниакальных и психотических пациентов. В обоих случаях наблюдается нормализация ферментативной активности при соответствующем лечении [36].

Было показано, что такие расстройства аппетита, как анорексия и булимия, также сопровождаются снижением активности сывороточной пролилэндопептидазы [75]. Считается, что составной частью этих заболеваний является нарушение регуляции активности нейропептидов и пептидных гормонов.

Предполагается, что пролилэндопептидазы вовлечены в иммунные, аутоиммунные и воспалительные процессы. Аномально высокая или низкая пролилэндопептидазная активность также связана с нейродегенеративными заболеваниями. В случае болезни Альцгеймера наблюдается значительное увеличение уровня данной ферментативной активности, что предполагает функциональную роль пролилэндопептидаз в амилоидогенезе в мозге. Тем не менее описан и пониженный уровень ферментативной активности при болезни Альцгеймера. Вклад пролилэндопептидаз в развитие этого заболевания, по-видимому, связан с предполагаемой функцией этих ферментов в нейрональной дифференциации [36].

Применение специфических ингибиторов пролилэндопептидаз позволило прояснить другие воз-

можные функции этих ферментов. Ингибирование активности пролилэндопептидазы в мозге крысы путем перорального введения Cbz-Pro-пролиналя значительно увеличивает количество [Arg]вазопрессина в перегородках мозга крысы. Таким образом, фермент, возможно, играет роль в деградации эндогенного [Arg]вазопрессина в мозге. Введение специфических ингибиторов пролилэндопептидаз эуристатинов А или В предотвращает скополамининдуцированную амнезию у крыс [36], что подтверждает ранние исследования, в которых Cbz-Pro-пролиналь оказывал такое же защитное действие [76]. Такой же эффект имеют и другие ингибиторы пролилэндопептидаз [76], такие, как анирацетам и прамирацетам, применяющиеся в настоящее время в качестве ноотропных препаратов. Предполагается, что ингибирование пролилэндопептидазы мозга устраняет активность этого фермента по отношению к метаболиту вазопрессина Gln-Asn-Cys-Cys-Pro-Arg, который, по-видимому, имеет прямое отношение к функционированию памяти и смежным процессам [36].

2. ПРОЛИНСПЕЦИФИЧНЫЕ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ МИКРООРГАНИЗМОВ И ГРИБОВ

2.1. Локализация

На основании результатов исследования субстратной специфичности пролилэндопептидаз животных в качестве высокоспецифичного субстрата для скрининга пролилэндопептидазной активности в микроорганизмах был выбран Cbz-Gly-Pro- β NA. При тестировании более 500 микроорганизмов из почвы и родственных штаммов было найдено, что только *Flavobacterium* продуцируют ферменты с высоким уровнем искомой активности [5], причем наивысшей активностью обладает *F. meningosepticum*.

При последующем скрининге пролилэндопептидазной активности в микроорганизмах ферментативная активность была найдена в простых бактериях из почвы, но не в грибах и актиномицетах. Оказалось, что присутствие пролилэндопептидазной активности в бактериях не ограничено родом *Flavobacterium*: пролилэндопептидаза была обнаружена также в бактериях *Xanthomonas* sp. [77], в двух видах бактерий *Lactobacillus casei* [78], а также в *Aeromonas hydrophila* и *Sphingomonas capsulata* [79].

Несмотря на появившиеся данные об отсутствии постпролинрасщепляющих ферментов в грибах [36, 81], высокая пролилэндопептидазная активность была ранее найдена в плодовых телах грибов, принадлежащих роду *Basidiomycetes* [80, 81].

Таблица 6. Кинетические параметры гидролиза пептидных субстратов, катализируемого пролилэндопептидазой *F. meningosepticum* [5, 83]

P_4	P_3	P_2	P_1	P'_1	P'_2	P'_3	K_m , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹
			Pro	βNA			не гидролизуется		
		Cbz	Pro	βNA			»		
		Cbz	Pro	ONp			»		
		Cbz	Ala	ONp			»		
		Gly	Pro	βNA			»		
		Ala	Ala	βNA			»		
	Cbz	Gly	Pro	Mca			0.025	115	4600
	Cbz	Gly	Pro	βNA			0.14	169	1212
	Cbz	Gly	Pro	ONp			0.125	102	816
	Cbz	Ala	Ala	βNA			0.58	5.9	10.1
	Cbz	Ala	Ala	ONp			0.16	2.7	16.8
	Cbz	Ala	Pro	βNA			0.08	4.2	834
	Cbz	D-Ala	Pro	βNA			0.20	0.147	0.74
Cbz	Gly	Gly	Pro	ONp			0.133	85.8	645
Cbz	Ala	Gly	Pro	βNA			0.29	192	664
Cbz	D-Ala	Gly	Pro	βNA			0.14	38	271
	Cbz	Gly	Pro	Leu			0.22	23	104
	Cbz	Gly	Pro	Phe			0.74	180	250
	Cbz	Gly	Pro	Ala			0.39	240	620
	Cbz	Gly	Pro	D-Ala			не гидролизуется		
	Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly		0.32	520	1600
	Cbz	Gly	Pro	Leu	Ala		0.47	520	1100
	Cbz	Gly	Pro	Leu	D-Ala		1.5	1600	1070
	Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly	Gly	1.4	700	500
	Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	1.82	1000	550

2.2. Пролілэндопептидаза *Flavobacterium meningosepticum*

Оптимум pH гидролиза Cbz-Gly-Pro-βNA пролилэндопептидазой *F. meningosepticum* 7.0; фермент стабилен при pH от 5.0 до 9.0 при инкубации при 30°C в течение 1 ч; температурный оптимум 40°C; фермент сохраняет 50% активности при 42°C в течение 15 мин при pH 7.0. Пептидаза характеризуется pI 9.6 и существует в виде мономера с молекулярной массой 74–75 кДа [5, 82]. Фермент не ингибируется хелатирующими или SH-реагентами, но полностью ингибируется DFP, при этом включение [³²P]DFP составляет 1 моль/моль пролилэндопептидазы. Таким образом, фермент является сериновой протеиназой. Бактериальная пролилэндопептидаза также специфически ингибируется Cbz-Gly-Pro-CH₂Cl и специфическими ингибиторами пролилэндопептидаз животных. Фермент не ингибируется любыми природными ингибиторами протеиназ, используемых при изучении ингибирования пролилэндопептидаз животных.

Пролілэндопептидаза *F. meningosepticum* гидролизует меченые окситоцин и вазопрессин с образованием Leu-Gly-NH₂ и Arg-Gly-NH₂ соответственно. Значения K_m составляют 0.10 мМ для окситоцина и 0.13 мМ для вазопрессина. Фермент гидролизует все связи Pro-Хаа в туфтсине, тиреолиберине, ангиотензине I, нейротензине и инсулине. Тем не менее нативные лизоцим, фосфоорилаза а, нативный и денатурированный бычий сывороточный альбумин устойчивы к действию этого фермента [5].

Субсайты активного центра пролилэндопептидазы *F. meningosepticum* были изучены в работах [5, 83]. Кинетические параметры (табл. 6) указывают на то, что в связывании субстрата ферментом принимают участие субсайты S_3 , S_2 , S_1 , S'_1 и S'_2 . В дополнение, субсайты S_2 , S_1 и S'_1 проявляют высокую стереоспецифичность. Пролілэндопептидаза способна также гидролизовать

связи Ala-Хаа, но скорость гидролиза этих связей крайне низка по сравнению со связями Pro-Хаа.

Многие свойства пролилэндопептидазы *F. meningosepticum* и почки ягненка сходны: оба фермента гидролизуют одни и те же пролинсодержащие пептиды и пептидные гормоны (1), не способны расщеплять пептиды с *N*-концевыми остатками Pro, Cbz-Pro или Gly-Pro (2), обладают активностью по отношению к аланинсодержащим пептидам намного меньшей, чем пролилпептидазная (3), имеют схожие молекулярные массы и рН-оптимумы (4), ингибируются DFP и производными Cbz-Gly-Pro-CH₂Cl, но не PMSF или природными ингибиторами протеиназ (5); количество и стереоспецифичность субсайтов активного центра идентичны для этих двух ферментов (6). Тем не менее, очевидно, что эти ферменты имеют различное строение, так как они различаются по значениям *pI* (9.6 и 4.8 соответственно) и иммунореактивности. Кроме того, бактериальная пролилэндопептидаза нечувствительна к SH-реагентам, в то время как пролилэндопептидаза почки ягненка частично ингибируется такими реагентами, как PCMB и йодацетамид.

2.3. Пролілэндопептидаза *Xanthomonas* sp.

Пролілэндопептидаза *Xanthomonas* sp. была выделена и охарактеризована в работе [77]. Фермент состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 75 кДа и имеет *pI* 6.2. Пептидаза ингибируется DFP, являясь таким образом сериновой эндопептидазой. Оптимум рН активности 7.5. Фермент специфически гидролизует связи Pro-Хаа, проявляет низкую специфичность по отношению к остаткам в положениях *P*'₁ (за исключением Glu) и *P*₂. Фермент не расщепляет связи пролина в длинных субстратах (таких, как окисленная рибонуклеаза), что весьма типично для пролилэндопептидаз.

2.4. Пролілэндопептидаза *Sphingomonas capsulata*

Еще одна пролилэндопептидаза (пролилוליгопептидаза) была выделена из *S. capsulata* IFO 12533 [79]. Нативный и рекомбинантный (экспрессированный в *E. coli* [79]) ферменты ингибируются DFP. SH-Реагенты и хелаторы металлов практически не действуют на эти ферменты. Рассчитанная по аминокислотной последовательности молекулярная масса фермента 78433 Да. Фермент имеет 39.6, 45.3, 38.9, 38.3% сходства по первичной структуре с пролилэндопептидазами *F. meningosepticum* [84], *A. hydrophila* [85], мозга поросенка [49] и человеческих Т-клеток [50] соответственно. Следует отметить, что в целом высокая гомология характерна для пролинспеци-

фичных эндопептидаз из млекопитающих, в то время как пролилэндопептидазы, выделяемые из других источников, такой гомологией не обладают. Однако, в общем, протеазный домен этих ферментов гораздо более консервативен, нежели *N*-концевой домен.

2.5. Пролілэндопептидазы грибов

Высокая пролилэндопептидазная активность была найдена в плодовых телах грибов *Lyophyllum cinerascens* (лиофиллум), *Agaricus bisporus* (шампиньон), *Lactarius hygrophoroides* (груздь) и *Russula lepida* (сыроежка), принадлежащих роду *Basidiomycetes* [80].

Пролілэндопептидаза была очищена из супернатанта гомогената *L. cinerascens* с выходом 2.8% и степенью очистки 450. Оптимум рН активности фермента 6.8 по гидролизу Cbz-Gly-Pro-βNA; фермент стабилен при рН 5.8–7.4; *pI* 5.2; молекулярная масса 76 кДа по данным SDS-гель-электрофореза и гель-фильтрации, что предполагает его мономерное строение. Фермент полностью ингибируется DFP, Cbz-Gly-Pro-CH₂Cl, Cbz-Pro-пролиналем, Hg²⁺, но не ингибируется PCMB, PMSF, E-64, йодацетатом, EDTA и *o*-фенантролином, что свидетельствует о его принадлежности к сериновым протеиназам. Пролілэндопептидаза гидролизует тиреолиберин по карбоксилу пролина.

Как следует из табл. 7, в связывание субстрата ферментом *L. cinerascens* вовлечены, как минимум, пять субсайтов (*S*³-*S*'₂) активного центра. Среди этих субсайтов, *S*₁, *S*₂ и *S*'₁ имеют высокую стереоспецифичность, как и в пролилэндопептидазах млекопитающих и микроорганизмов [80]. По физико-химическим и энзиматическим свойствам (за исключением *pI*) фермент лиофиллума весьма похож на пролилэндопептидазу *F. meningosepticum* (ср. табл. 6).

Подобная пролилэндопептидаза была выделена из культурального фильтрата двуспоровых шампиньонов *A. bisporus* с суммарным выходом по активности 8.6% [81]. По гидролизу субстрата Cbz-Gly-Pro-βNA оптимум рН фермента 7.5; *pI* 4.8; фермент стабилен при рН 5.0–9.0 и является мономером с молекулярной массой 78 ± 2 кДа (по данным гель-фильтрации и SDS-электрофореза). Пролілэндопептидаза ингибируется DFP, Cbz-Gly-Pro-CH₂Cl, Cbz-Pro-пролиналем, Cbz-Pro-пирролидином, Cbz-тиопролилпирролидином, Cbz-Pro-тиазолидином, Cbz-тиопролилтиазолидином и PCMB, но не ингибируется PMSF, E-64, йодацетамидом или хелаторами металлов, что позволяет отнести ее к сериновым протеиназам. По своим характеристикам эта пролилэндопептидаза намного ближе к пролилэндопептидазам млекопитающих, нежели бактерий, однако не имеет им-

Таблица 7. Кинетические параметры гидролиза пептидных субстратов, катализируемого пролилэндопептидазой *L. cinerascens* [80]

P_4	P_3	P_2	P_1	P'_1	P'_2	P'_3	K_m , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹
			Pro	βNA				не гидролизуется	
		Cbz	Pro	βNA				не гидролизуется	
		Gly	Pro	βNA				не гидролизуется	
	Cbz	Gly	Pro	βNA			0.02	153	7692
	Cbz	Gly	Pro	Mca			0.02	0.95	47.5
	Cbz	Gly	Pro	pNA			0.40	21.11	52.8
	Cbz	Gly	D-Pro	pNA				не гидролизуется	
	Cbz	Ala	Pro	βNA			0.01	126	12600
	Cbz	D-Ala	Pro	βNA				не гидролизуется	
	Ala	Gly	Pro	βNA			0.35	26.74	76.39
Cbz	Ala	Gly	Pro	βNA			0.31	178.2	574.8
Cbz	D-Ala	Gly	Pro	βNA			1.67	72.16	43.21
	Cbz	Gly	Pro	Phe				3.95	
	Cbz	Gly	Pro	Leu				1.05	
	Cbz	Gly	Pro	Ala				1.26	
	Cbz	Gly	Pro	D-Ala				не гидролизуется	
	Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly			7.98	
	Cbz	Gly	Pro	Leu	Ala			13.2	
	Cbz	Gly	Pro	Leu	D-Ala			5.67	
	Cbz	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro		12.4	

мунологической кросс-реактивности с бычьей пролилэндопептидазой.

3. ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ РАСТЕНИЙ

Данные о выделении пролинспецифичных эндопептидаз из растений весьма ограничены. Из мембран фотосистемы II тилакоидов шпината экстракцией 1 М NaCl выделена пролилэндопептидаза, специфически расщепляющая 18-кДа белок фотосистемы II [86]. Для поддержания ферментативной активности в ходе очистки было существенно присутствие 0.05% Твин-20 и 1 М NaCl. Молекулярная масса фермента 95 кДа по данным гель-фильтрации [87]; активность, измеренная по гидролизу синтетических субстратов Cbz-Gly-Pro-pNA и Cbz-Lys-Pro-Mpa, составляет лишь 1/4 активности по отношению к 18-кДа белку. Гидролиз последнего конкурентно ингибируется субстратом Cbz-Lys-Pro-Mpa, но не ингибируется Cbz-Gly-Pro-pNA. Таким образом, по-видимому, наличие положительного заряда на молекуле субстрата является существенным для фермент-субстратного взаимодействия.

Можно видеть, что протеиназа и пролилэндопептидаза из *F. meningosepticum* различны по субстратной специфичности. Протеолиз 18-кДа бел-

ка не ингибируется ни DFP, ни РСМВ. Более того, специфический ингибитор пролилэндопептидаз Cbz-тиопролилтиопролинал (2 мкМ) также не оказывает влияния на ферментативную активность. Данные указывают на то, что эта протеиназа представляет нового семейства пролилэндопептидаз. Было найдено, что эффективным ингибитором фермента является 0.2 мМ CuCl₂. ZnCl₂ в концентрации 1 мМ также ингибирует фермент; при этом 1 мМ MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂ не являются ингибиторами. Протеиназа инактивируется ионными детергентами (SDS и хлоридом цетилпиридиния), но не инактивируется неионогенными детергентами (Triton X-100 и Твин-20) в концентрации 0.1 об.%. Кроме того, на ферментативную активность не влияют такие реагенты, как Mg-АТФ, DTT, *N*-этилмалеимид, E-64, *o*-фенантролин, EDTA и PMSF в концентрации 1 мМ. Из этих результатов следует, что эта протеиназа не имеет сходства ни с одной из описанных протеиназ хлоропластов [86]. Очищенная пролилэндопептидаза не способна расщеплять 33-кДа Мп-стабилизирующий белок, 23-кДа белок, а также белки, элюированные 1% Triton X-100 из мембран фотосистемы II, обработанных NaCl, которые включают в себя хлорофиллсвязывающие белки (CP47 и CP43) и ЛНС II. Проллилэндопептидаза не



Рис. 3. N-Концевая последовательность 18-кДа белка и фрагментов его гидролиза пролилэндопептидазой фотосистемы II [86]. Волнистой линией отмечен β -слой, жирной линией – жесткая спираль, квадратной скобкой – β -поворот.

гидролизует также белки из других источников, такие, как лизоцим куриного яйца, бычий панкреатический химоทริปсиноген А и цитохром с сердца лошади [86].

Протеолиз 18-кДа белка протекает последовательно с образованием 17.4-кДа и 16.5-кДа фрагментов. Накопление последнего как основного продукта гидролиза указывает на то, что 16.5-кДа фрагмент, скорее всего, не расщепляется пролилэндопептидазой, несмотря на предполагаемое содержание в нем восьми остатков пролина. Это можно объяснить общей неспособностью пролилэндопептидазы гидролизовать структурированные белки. Предсказание вторичной структуры 18-кДа белка предполагает, что перед расщепляемой связью (Pro¹²–Leu¹³) локализована β -структура из 8 а.о. и жесткая спираль, образованная остатками пролина, а за расщепляемой связью имеется β -поворот (рис. 3). Таким образом, N-концевой участок 18-кДа белка, по-видимому, не вовлечен в общую укладку и подвержен деградации пролилэндопептидазой [86].

4. ПРИМЕНЕНИЕ ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗ

Поскольку пролилэндопептидазы имеют высокую специфичность к остаткам пролина, были предприняты попытки использования этих ферментов для секвенирования белков [5]. Так, была определена последовательность N-защитенного октапептида, продукта VrcN-обработки тропонина С скелетной мышцы лягушки с помощью пролилэндопептидазы из почки ягненка, расщепившей октапептид по связи Pro–Thr [5]. С помощью этой же пролилэндопептидазы было достигнуто полное превращение фрагмента гистона H1 длиной 48 а.о., содержащего пять остатков пролина до соответствующих олигопептидов, но в случае фрагмента из 76 а.о. наблюдалось лишь незначительное превращение. Аналогично, наблюдалось расщепление 39-членного фрагмента гистона, но не фрагмента из 70 а.о. [5]. Кроме того, не обнаружено гидролиза одного из фрагментов VrcN-обработки бычьей панкреатической фосфолипазы A₂ и отмечен незначительный гидролиз (на 10–20% после 36 ч инкубации) двух других фрагментов этого белка [5].

Данные результаты, а также результаты других исследователей [24, 30, 34, 36, 43, 88] свиде-

тельствуют о том, что пролилэндопептидазы непригодны для расщепления крупных белков и пептидов на большие фрагменты. Тем не менее они могут быть весьма полезны для последовательного анализа малых фрагментов, полученных стандартными методами гидролиза. Проллилэндопептидазы можно использовать для таких вариантов расщепления пептидов, которые невозможно получить с помощью других эндопептидаз, и, следовательно, для получения дополнительных перекрывающихся фрагментов. Кроме того, поскольку экзопептидазы, как правило, не способны гидролизовать связи пролина, пролилэндопептидазы можно использовать для подтверждения локализации остатков пролина и соседних остатков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 04-48699).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MEROPS [<http://www.academicpress.com/merops/>]
2. Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. Handbook of Proteolytic Enzymes. N.Y.: Academic Press, 1998.
3. Rawlings N.D., Barrett A.J. // Biochem. J. 1993. V. 290. P. 205–218.
4. Barrett A.J., Rawlings N.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 318. P. 247–250.
5. Walter R., Simmons W.H., Yoshimoto T. // Mol. Cell. Biochem. 1980. V. 30. P. 111–127.
6. Walter R., Shlank H., Glass J.D., Schwartz I.L., Kerenyi T.D. // Science. 1971. V. 173. P. 827–829.
7. Hauzer K., Servitova L., Barth T., Jost K. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1982. V. 47. P. 1139–1148.
8. Walter R. // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 422. P. 138–158.
9. Yoshimoto T., Ogita K., Walter R., Koida M., Tsuru D. // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 569. P. 184–192.
10. Kato T., Okada M., Nagatsu T. // Mol. Cell. Biochem. 1980. V. 32. P. 117–121.
11. Goossens F., De Meester I., Vanhoof G., Scharpe S. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1996. V. 34. P. 17–22.
12. Brzezinska-Slebodzinska E., Adamczyk J. // Acta Biochim. Pol. 1979. V. 26. P. 407–416.
13. Knisatschek H., Bauer K. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 10936–10943.

14. *Rupnow J.H., Taylor W.L., Dixon J.E.* // *Biochemistry*. 1979. V. 18. P. 1206–1212.
15. *Andrews P.C., Hines C.M., Dixon J.E.* // *Biochemistry*. 1980. V. 19. P. 5494–5500.
16. *Andrews P.C., Minth C.D., Dixon J.E.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 5861–5865.
17. *Hersh L.B., McKelvy J.F.* // *Brain Res.* 1979. V. 168. P. 553–564.
18. *Hersh L.B.* // *J. Neurochem.* 1981. V. 37. P. 172–178.
19. *Yoshimoto T., Simmons W.H., Kita T., Tsuru D.* // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1981. V. 90. P. 325–334.
20. *Yoshimoto T., Nishimura T., Kita T., Tsuru D.* // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1983. V. 94. P. 1179–1190.
21. *Schonlein C., Heins J., Barth A.* // *Biol. Chem. Hoppe Seyler*. 1990. V. 371. P. 1159–1164.
22. *Browne P., O'Cuinn G.* // *Eur. J. Biochem.* 1983. V. 137. P. 75–87.
23. *Kalwant S., Porter A.G.* // *Biochem. J.* 1991. V. 276. P. 237–244.
24. *Oliveira E.B., Martins A.R., Camargo A.C.* // *Biochemistry*. 1976. V. 15. P. 1967–1974.
25. *Orlowski M., Wilk E., Pearce S., Wilk S.* // *J. Neurochem.* 1979. V. 33. P. 461–469.
26. *Yokosawa H., Miyata M., Sawada H., Ishii S.* // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1983. V. 94. P. 1067–1076.
27. *Yoshida K., Inaba K., Ohtake H., Morisawa M.* // *Dev. Growth Differ.* 1999. V. 41. P. 217–225.
28. *Swanson A.A., Davis R.M., McDonald J.K.* // *Curr. Eye Res.* 1984. V. 3. P. 659–661.
29. *Hauzer K., Jost K., Low M., Polgar L.* // *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 1984. V. 19. P. 165–168.
30. *Moriyama A., Nakanishi M., Sasaki M.* // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1988. V. 104. P. 112–117.
31. *Rosen J., Tomkinson B., Pettersson G., Zetterqvist O.* // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 3824–3834.
32. *Nozaki Y., Sato N., Iida T., Hara K., Fukuyama K., Epstein W.L.* // *J. Cell. Biochem.* 1992. V. 49. P. 296–303.
33. *Kusuhara M., Hachisuka H., Nakano S., Sasai Y.* // *J. Dermatol. Sci.* 1993. V. 6. P. 138–145.
34. *Goossens F., De Meester I., Vanhoof G., Hendriks D., Vriend G., Scharpe S.* // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 233. P. 432–441.
35. *Cunningham D.F., O'Connor B.* // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1998. V. 30. P. 99–114.
36. *Cunningham D.F., O'Connor B.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1343. P. 160–186.
37. *Szeltner Z., Renner V., Polgar L.* // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 15000–15005.
38. *Yoshimoto T., Fischl M., Orlowski R.C., Walter R.* // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. P. 3708–3716.
39. *Wilk S., Orlowski M.* // *J. Neurochem.* 1983. V. 41. P. 69–75.
40. *Bakker A.V., Daffeh J., Jung S., Vincent L.A., Nagel A.A., Spencer R.W., Vinick F.J., Faraci W.S.* // *Biorg. Med. Chem. Lett.* 1991. V. 1. P. 585–590.
41. *Steinmetzer T., Silberring J., Mrestani-Klaus C., Fittkau S., Barth A., Demuth H.U.* // *J. Enzym. Inhib.* 1993. V. 7. P. 77–85.
42. *Tsuru D., Yoshimoto T., Koriyama N., Furukawa S.* // *J. Biochem.* 1988. V. 104. P. 568–580.
43. *Koida M., Walter R.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 7593–7599.
44. *Polgar L.* // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 197. P. 441–447.
45. *Walter R., Yoshimoto T.* // *Biochemistry*. 1978. V. 17. P. 4139–4144.
46. *Noula C., Kokotos G., Barth T., Tzougraki C.* // *J. Pept. Res.* 1997. V. 49. P. 46–51.
47. *Kaspari A., Diefenthal T., Grosche G., Schierhorn A., Demuth H.U.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1293. P. 147–153.
48. *Yoshimoto T., Orlowski R.C., Walter R.* // *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 2942–2948.
49. *Rennex D., Hemmings B.A., Hofsteenge J., Stone S.R.* // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 2195–2203.
50. *Vanhoof G., Goossens F., Hendriks L., De Meester I., Hendriks D., Vriend G., van Broeckhoven C., Scharpe S.* // *Gene*. 1994. V. 149. P. 363–366.
51. *Yoshimoto T., Miyazaki K., Haraguchi N., Kitazono A., Kabashima T., Ito K.* // *Biol. Pharm. Bull.* 1997. V. 20. P. 1047–1050.
52. *Ishino T., Ohtsuki S., Homma Ki., Natori S.* // *J. Biochem.* 1998. V. 123. P. 540–545.
53. *Fulop V., Bocskei Z., Polgar L.* // *Cell*. 1998. V. 94. P. 161–170.
54. *Bocskei Z., Fuxreiter M., Naray-Szabo G., Szabo E., Polgar L.* // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 1998. V. 54. P. 1414–1415.
55. *Mizutani S., Sumi S., Suzuki O., Narita O., Tomoda Y.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 786. P. 113–117.
56. *Sumi S., Mizutani S., Narita O., Tomoda Y.* // *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. 1984. V. 36. P. 1943–1951.
57. *Zolfaghari R., Baker C.R., Canizaro P.C., Feola M., Amirgholami A., Behal F.J.* // *Enzyme*. 1986. V. 36. P. 165–178.
58. *Matsubara Y., Ono T., Tsubuki S., Irie S., Kawashima S.* // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 252. P. 178–183.
59. *O'Leary R.M., O'Connor B.* // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 227. P. 277–283.
60. *O'Leary R.M., Gallagher S.P., O'Connor B.* // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1996. V. 28. P. 441–449.
61. *Checler F., Vincent J.P., Kitabgi P.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 11274–11281.
62. *Dauch P., Vincent J.P., Checler F.* // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 202. P. 269–276.
63. *Millican P.E., Kenny A.J., Turner A.J.* // *Biochem. J.* 1991. V. 276. P. 583–591.
64. *Dahms P., Mentlein R.* // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 208. P. 145–154.
65. *Barelli H., Vincent J.P., Checler F.* // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 211. P. 79–90.
66. *Vincent B., Vincent J.P., Checler F.* // *Brain Res.* 1996. V. 709. P. 51–58.
67. *Serizawa A., Dando P.M., Barrett A.J.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 2092–2098.
68. *Lian W., Chen G., Wu D., Brown C.K., Madauss K., Hersh L.B., Rodgers D.W.* // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2000. V. 56. P. 1644–1646.

69. Brown C.K., Madauss K., Lian W., Beck M.R., Tolbert W.D., Rodgers D.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 3127–3132.
70. Quinto B.M., Juliano M.A., Hirata I., Carmona A.K., Juliano L., Casarini D.E. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2000. V. 32. P. 1161–1172.
71. Prasad C., Peterkofsky A. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 3229–3234.
72. Kato T., Nakano T., Kojima K., Nagatsu T., Sakakibara S. // *J. Neurochem.* 1980. V. 35. P. 527–535.
73. Wilk S. // *Life Sci.* 1983. V. 33. P. 2149–2157.
74. Mentlein R., Dahms P. // *J. Neurochem.* 1994. V. 62. P. 27–36.
75. Maes M., Monteleone P., Bencivenga R., Goossens F., Maj M., van West D., Bosmans E., Scharpe S. // *Psychoneuroendocrinology*. 2001. V. 26. P. 17–26.
76. Yoshimoto T., Kado K., Matsubara F., Koriyama N., Kaneto H., Tsuru D. // *J. Pharmacobiodyn.* 1987. V. 10. P. 730–735.
77. Swajcer-Dey E., Rasmussen J., Meldal M., Bredsdam K. // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 2454–2459.
78. Habibi-Najafi M.B., Lee B.H. // *J. Dairy Sci.* 1994. V. 77. P. 385–392.
79. Kabashima T., Fujii M., Meng Y., Ito K., Yoshimoto T. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. V. 358. P. 141–148.
80. Yoshimoto T., Sattar A.K., Hirose W., Tsuru D. // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1988. V. 104. P. 622–627.
81. Sattar A.K., Yamamoto N., Yoshimoto T., Tsuru D. // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1990. V. 107. P. 256–261.
82. Yoshimoto T., Walter R., Tsuru D. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 4786–4792.
83. Heins J., Welker P., Schonlein C., Born I., Hartrodt B., Neubert K., Tsuru D., Barth A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1988. V. 954. P. 161–169.
84. Chevallier S., Goeltz P., Thibault P., Banville D., Gagnon J. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 8192–8199.
85. Kanatani A., Yoshimoto T., Kitazono A., Kokubo T., Tsuru D. // *J. Biochem.* 1993. V. 113. P. 790–796.
86. Kuwabara T. // *FEBS Lett.* 1992. V. 300. P. 127–130.
87. Kuwabara T., Suzuki K. // *Plant Cell Physiol.* 1994. V. 35. P. 665–675.
88. Sharma K.K., Ortwerth B.J. // *Exp. Eye Res.* 1994. V. 59. P. 107–115.

Proline-Specific Endopeptidases (Review)

D. V. Besedin[#] and G. N. Rudenskaya

[#] Phone: +7 (095) 939-5541, fax: +7 (095) 939-3181, e-mail: laboratoriahps@hotmail.com
 Chair of Natural Compounds Chemistry, Chemistry Faculty, Moscow State University,
 Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Prolyl endopeptidases, or post-proline-cleaving enzymes, are the specific endopeptidases that hydrolyze peptide substrates at the carbonyl of the internal Pro residue. All the currently known prolyl endopeptidases from animals, microorganisms, fungi, and plants as well as the post-proline-cleaving enzymes that do not exhibit the strict specificity to Pro are reviewed. The data on their physicochemical and catalytic properties, substrate specificity, inhibitors, sequences, and three-dimensional structures are discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: endopeptidase 24.16, post-proline-cleaving enzymes, primary and three-dimensional structure, proline-specific endopeptidases, prolyl endopeptidases, prolyl endopeptidase inhibitors, substrate specificity