



УДК 577.152.344

## ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ. СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ, ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

© 2003 г. Е. И. Мильготина<sup>#</sup>, Т. Л. Воюшина, Г. Г. Честухина

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, лаборатория химии белка им. В.М. Степанова, 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1

Поступила в редакцию 19.02.2002 г. Принята к печати 28.08.2002 г.

Обсуждаются особенности структурной организации новой группы сериновых протеиназ – глутамилспецифичных эндопептидаз, обладающих крайне узкой субстратной специфичностью. Рассмотрены области их практического использования.

*Ключевые слова:* глутамилэндопептидазы; ферментативный синтез, ферментативный гидролиз; субстратная специфичность.

### Введение

Функциональная организация глутамилэндопептидаз.

Анализ первичной структуры.

Пространственная структура глутамилэндопептидаз.

Пространственная структура глутамилэндопептидазы из *Streptomyces griseus*.

Модели пространственных структур глутамилэндопептидаз:

глутамилэндопептидаза из *Bacillus licheniformis*,

глутамилэндопептидаза из *B. subtilis*,

глутамилэндопептидаза из *Staphylococcus aureus*, шт. V8.

Применение глутамилспецифичных эндопептидаз.

Применение глутамилэндопептидаз для гидролиза пептидных последовательностей.

Использование глутамилспецифичных эндопептидаз в качестве катализаторов реакций пептидного синтеза.

Использование концепции субстратов-миметиков в ферментативном пептидном синтезе.

Заключение.

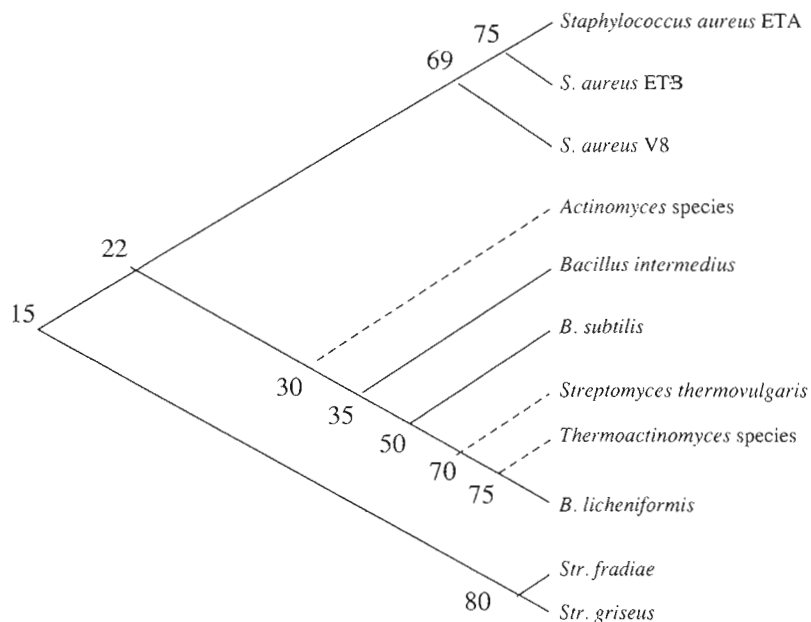
### ВВЕДЕНИЕ

Глутамилспецифичные эндопептидазы (КФ 3.4.21.19) принадлежат классу сериновых протеиназ и представляют собой подсемейство относительно недавно открытых химотрипсиноподобных протеолитических ферментов, обладающих узкой субстратной специфичностью. Глутамилэндопептидазы расщепляют пептидные связи, образованные  $\alpha$ -карбоксыльными группами остатков глутаминовой и/или аспарагиновой кислот, причем связи, образованные остатками глутаминовой кислоты, расщепляются в 100–1000 раз эффективнее, чем связи, образованные остатками аспарагиновой кислоты. До 1987 г. единственным хорошо охарактеризованным представителем Glu,Asp-специфичных сериновых протеиназ была эндопептидаза из *Staphylococcus aureus*, штамм V8 (V8-GSE) [1–4]. Позже глутамилэндопептидазы были выделены также из других источников, например из *Actinomyces* sp. [5], *Streptomyces thermovulgaris* [6], *Str. griseus* [7, 8], *Bacillus licheniformis* [9], *B. intermedius* [10] и т.д. Следует отметить, что два фермента – из *Str. griseus* (SG-GSE) и из *B. licheniformis* (BL-GSE) – были получены в чистом виде и в большом количестве из коммерчески доступных ферментных экстрактов.

Идентифицированы и другие Glu- и/или Asp-специфичные протеиназы, имеющие важное биологическое значение. Например, эпидермолитический токсин А из *S. aureus*, инициирующий стафилококковый кожный синдром у новорожденных [11], – глутамилспецифичная сериновая протеиназа, гомологичная V8-GSE [2, 3, 5]. Представленный в моноцитах Asp-специфичный интерлейкин-1 $\beta$ -превращающий фермент активирует интерлейкин-1 $\beta$ , который играет важную роль в патогенезе воспалительных заболеваний [12]. В цитотоксичных Т-лимфоцитах обнаружен гранзим В (Asp-специфичная эндопептидаза), препятствующий

Сокращения: глутамилэндопептидазы: BI-GSE – из *Bacillus intermedius*; BL-GSE – из *B. licheniformis*; BS-GSE – из *B. subtilis*; SA-GSE – из *Staphylococcus aureus*, шт. 92 гн; V8-GSE – из *S. aureus*, шт. V8; SG-GSE – из *Streptomyces griseus*; SF-GSE – из *Str. fradiae*; ST-GSE – из *Str. thermovulgaris*; AS-GSE – из *Actinomyces*; TS-GSE – из *Thermoactinomyces*; ETA – эпидермолитический токсин А из *S. aureus*; ETB – эпидермолитический токсин В из *S. aureus*; SGPA – протеиназа А из *Str. griseus*; SGPB – протеиназа В из *Str. griseus*; SGPE – протеиназа Е из *Str. griseus*; SG-трипсин – трипсин из *Str. griseus*;  $\alpha$ -LP –  $\alpha$ -литическая протеиназа из *Lysobacter enzymogenes*; аминокислоты, кроме особо указанных, L-ряда.

<sup>#</sup> Автор для переписки (эл. почта: milcha57@hotmail.com; тел.: (095) 315-37-38; факс: (095) 315-05-01).



**Рис. 1.** Дендрограмма последовательностей глутамилэндопептидаз. Числа соответствуют проценту совпадающих аминокислотных остатков. Пунктиром обозначено положение ферментов, для которых установлены только N-концевые аминокислотные последовательности (по данным работы [28]).

пролиферации опухолевых клеток и вирусной инфекции [13]. Кроме того, пептидные связи типа Glu–Хаа и Gln–Хаа гидролизуют ряд вирусных протеиназ. К ним относятся ферменты, обнаруженные в вирусе гепатита А, полио- и риновирусах человека, где они играют ключевую роль в процессинге вирусных полипептидов [14, 15].

Имеющиеся данные о физико-химических свойствах глутамилспецифичных эндопептидаз достаточно широко представлены в обзорных статьях Бирктофта с соавт. [16] и Руденской [17]. Предметом не утихающих споров является функциональная организация глутамилспецифичных эндопептидаз, поскольку молекулярный механизм, определяющий специфичность действия ферментов этой группы, остается неясным.

В данном обзоре сделана попытка обобщить имеющиеся на сегодняшний день данные рентгеноструктурного анализа глутамилспецифичных эндопептидаз и компьютерного моделирования их структур на основе известных аминокислотных последовательностей протеиназ этого класса, а также рассмотрены наиболее интересные примеры их использования.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗ

### Анализ первичной структуры

Известны полные аминокислотные последовательности глутамилэндопептидаз из *S. aureus* [4, 18, 19], *B. licheniformis* [9, 20], *B. subtilis* [21–23],

*B. intermedius* [24], *Str. griseus* [8, 25] и *Str. fradiae* [26]. Все они установлены на основе анализа нуклеотидных последовательностей клонированных генов, а в случае ферментов из *S. aureus* и *B. licheniformis* определена также первичная структура белка [4, 9]. Для ферментов из *Str. thermovulgaris* [6], *Thermoactinomyces* sp. [27] и *Actinomyces* sp. [5] установлены N-концевые аминокислотные последовательности.

На основании сравнения аминокислотных последовательностей глутамилэндопептидаз предложено эволюционное древо этого семейства ферментов (рис. 1) [28]. Как видно, глутамилэндопептидазы могут быть разделены на три эволюционные ветви, достаточно далеко отстоящие друг от друга.

Сопоставление аминокислотных последовательностей глутамилэндопептидаз и других сериновых протеиназ показывает, что первые могут рассматриваться как отдельная эволюционная ветвь (или ветви) химотрипсиноподобных ферментов [29], характеризующаяся кардинальным изменением специфичности действия.

Соотнесение аминокислотных последовательностей Glu, Asp-специфичных протеиназ и протеиназ, принадлежащих к подклассам химотрипсина и трипсина, показывает, что у глутамилэндопептидаз наиболее консервативными также являются аминокислотные остатки каталитической триады His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>, Ser<sup>195</sup> (нумерация по последовательности химотрипсина) и их непосредственное окружение [29].

*Пространственная структура  
глутамилэндопептидаз*

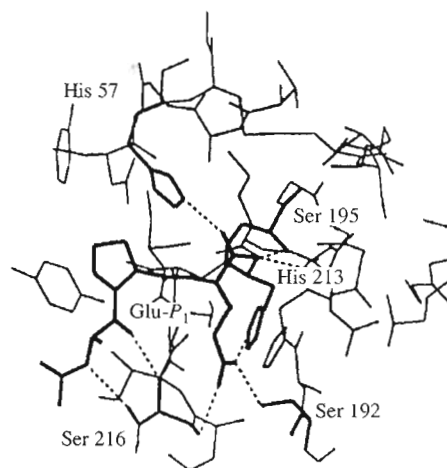
Для понимания механизмов связывания и гидролиза субстрата, природы субстратной специфичности ферментов, а также для формирования теоретической базы направленной модификации их свойств необходима информация о пространственной структуре белка, полученная в результате рентгеноструктурных исследований или при помощи компьютерного моделирования на основе известных структур аналогичных ферментов. Оба эти подхода используются при изучении глутамилэндопептидаз. Известны пространственные структуры Glu,Asp-специфичных ферментов из *Str. griseus* [30] и *S. aureus* (эпидермолитический токсин А) [31]. Однако эти данные невозможно экстраполировать на глутамилэндопептидазы другого происхождения, поскольку ферменты стрептомицетов и стафилококков представляют собой отдельные эволюционные группы [28].

*Пространственная структура  
глутамилэндопептидазы из Str. griseus*

Глутамилспецифичная эндопептидаза из *Str. griseus* (SG-GSE) гомологична и близка по первичной структуре сериновым протеиназам А и В из *Str. griseus* (SGPA и SGPB) и  $\alpha$ -литической протеиназе ( $\alpha$ -LP) из *Lysobacter enzymogenes* [32–36], а также, в некоторой степени, панкреатическим сериновым протеиназам [37], что подтверждает правильность отнесения глутамилэндопептидаз к эволюционному семейству химотрипсина.

SG-GSE была закристаллизована с тетрапептидным субстратом Boc-Ala-Ala-Pro-Glu-pNA. Структура этого комплекса определена с R-фактором 17% при разрешении 2.0 Å [30] (рис. 2). Структура SG-GSE сформирована двумя  $\beta$ -цилиндрами и С-концевой  $\alpha$ -спиралью. Первый  $\beta$ -цилиндр содержит остатки His<sup>57</sup> и Asp<sup>102</sup> каталитической триады, а второй – каталитический Ser<sup>195</sup> и S<sub>1</sub>-связывающий участок субстрата. Следует отметить, что конфигурация остатков каталитической триады и оксианионной впадины эндопептидазы из *Str. griseus* является классической для активных центров сериновых протеиназ [37].

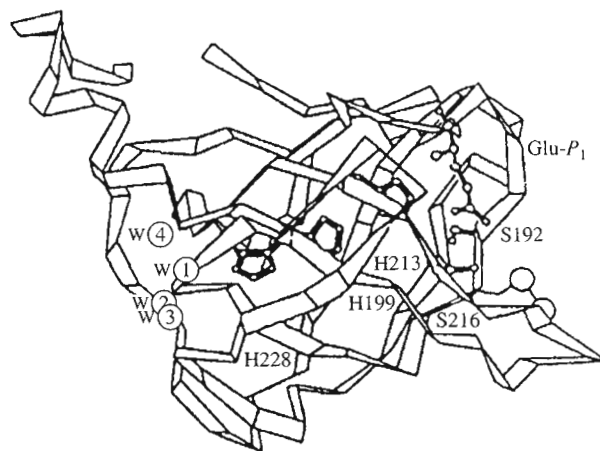
Тетрапептидный лиганд имеет две карбоксильные группы: С-концевую, формирующуюся после расщепления субстрата, и  $\gamma$ -COOH-группу глутаминовой кислоты в положении P<sub>1</sub>. С-Концевой атом кислорода O <sup>$\alpha$ 1</sup>  $\alpha$ -карбоксильной группы С-концевого остатка глутаминовой кислоты субстрата формирует водородную связь с N <sup>$\epsilon$ 2</sup>-атомом остатка His<sup>57</sup> каталитической триады и с молекулой растворителя, а атом O <sup>$\alpha$ 2</sup>, расположенный в оксианионной впадине, образует водородную связь с атомами азота остатков Ser<sup>195</sup> и Gly<sup>193</sup>. Атом кислорода O <sup>$\epsilon$ 1</sup> боковой функциональной группы ос-



**Рис. 2.** Изображение структуры активного центра SG-GSE в комплексе с фрагментом субстрата Ala-Ala-Pro-Glu (по данным работы [30]). Часть лиганда Ala-Ala-Pro-Glu и аминокислотные остатки активного центра фермента His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>, Ser<sup>195</sup>, His<sup>213</sup>, Ser<sup>192</sup> и Ser<sup>216</sup> выделены жирными линиями. Водородные связи между лигандом и ферментом показаны пунктиром.

татка Glu повернут в сторону внутренней части субстратсвязывающего кармана и формирует водородную связь с N <sup>$\epsilon$ 2</sup> остатка His<sup>213</sup> и O <sup>$\gamma$</sup>  остатка Ser<sup>192</sup>, а атом кислорода O <sup>$\epsilon$ 2</sup> направлен наружу и образует водородные связи с O <sup>$\gamma$</sup>  остатка Ser<sup>216</sup> и молекулой растворителя. Общая геометрия участка S<sub>1</sub> у SG-GSE очень похожа на геометрию соответствующих субстратсвязывающих участков SGPA, SGPB и  $\alpha$ -LP, отличаясь природой ключевых остатков (SGPA и SGPB имеют Ala в позиции 192, Thr в позиции 213 и Gly в позиции 216), что, по-видимому, и определяет разницу в специфичности этих структурно родственных ферментов [30].

До сих пор остается неясным механизм, обеспечивающий селективность глутамилэндопептидаз по отношению к аминокислотным остаткам с отрицательно заряженными боковыми группами. Вероятно, элементами компенсации отрицательного заряда  $\gamma$ -COOH-группы глутаминовой кислоты субстрата могут являться остатки His<sup>213</sup> и Ser/Thr<sup>192</sup>, консервативные для всех глутамилэндопептидаз. Очевидно, что при стабилизации фермент-субстратного комплекса в оптимуме pH 8.5 действия фермента для компенсации отрицательного заряда, возникающего на  $\gamma$ -карбоксильной группе остатка Glu в P<sub>1</sub>-положении, требуется положительно заряженная группа S<sub>1</sub>-участка фермента. Примером функционирования такого механизма является связывание положительно заряженной боковой функциональной группы субстрата остатком Asp<sup>189</sup> трипсина [29]. Кристаллографические данные [30] показывают, что, по-видимому, ключевую позицию в связывании субстрата глутамилэндопептидазами занимает



**Рис. 3.** Ленточная диаграмма второго  $\beta$ -цилиндра SG-GSE (по данным работы [30]). С помощью шаростержневой модели изображены боковые цепи  $\text{His}^{213}$ ,  $\text{His}^{199}$ ,  $\text{His}^{228}$  (выделены жирными линиями),  $\text{Ser}^{192}$  и  $\text{Ser}^{216}$ , а также остаток  $\text{Glu-P}_1$  субстрата. Кружками представлены молекулы растворителя  $W_1, W_2, W_3, W_4$ . Дисульфидная связь  $\text{Cys}^{191}\text{Cys}^{220}$  показана кружками в правом нижнем углу диаграммы.

остаток  $\text{His}^{213}$ . Однако при pH 8.5 имидазольное кольцо гистидина должно оставаться нейтральным [38], а следовательно, не способно компенсировать отрицательный заряд  $\gamma$ -карбоксильной группы  $\text{Glu-P}_1$  [28].

Подробный анализ данных рентгеноструктурных исследований пространственной структуры SG-GSE позволил Ниенаберу и соавт. [30] предположить, что связывание субстрата в участке  $S_1$  может быть стабилизировано дополнительными водородными связями трех остатков гистидина:  $\text{His}^{213}$  субстратсвязывающего кармана,  $\text{His}^{199}$ ,  $\text{His}^{228}$  (рис. 3). Эта триада проходит сквозь гидрофобный центр второго  $\beta$ -цилиндра и формирует прямую связь между участком  $S_1$  и каналом растворителя, находящимся на противоположной стороне второго  $\beta$ -цилиндра.

Нижняя часть второго  $\beta$ -цилиндра заканчивается петлей, образованной участком полипептидной цепи от  $\text{Asp}^{129}$  к  $\text{Val}^{132}$ , которая вместе с боковыми остатками  $\text{Pro}^{230}$ ,  $\text{Val}^{181}$  и  $\text{Val}^{165}$  формирует глубокую полость. Эта полость содержит четыре упорядоченные молекулы растворителя ( $W_1$ – $W_4$ ), из которых только одна ( $W_2$ ) доступна внешнему растворителю. Молекула  $W_1$  связана водородными связями с  $\text{His}^{228}$  и с молекулами  $W_2$  и  $W_4$ . Ключевое взаимодействие внутри этого канала растворителя осуществляется молекулой  $W_4$ , которая, кроме взаимодействия с  $W_1$ , образует водородные связи с атомами азота остатков  $\text{Val}^{231}$  и  $\text{Thr}^{232}$  из  $N$ -концевой  $\alpha$ -спирали. Рассмотрение этого взаимодействия показывает, что  $\alpha$ -спираль представ-

ляет собой микродиполь, который в некоторой степени является результирующей дипольных моментов, присущих пептидным связям [39]. Этот диполь в SG-GSE ориентирован так, что положительно заряженный остаток  $N$ -конца  $\alpha$ -спирали может стабилизировать отрицательный заряд на  $W_1$  и, в конечном счете, на карбоксильной группе субстрата. В экстремальном случае протон может быть сдвинут таким образом, что  $\gamma$ -карбоксильная группа глутаминовой кислоты субстрата будет нейтральной, а полный отрицательный заряд будет перенесен на молекулу растворителя  $W_1$ . Когда субстрат связан с ферментом, все три гистидина полностью экранированы от растворителя и нет других остатков, способных формировать водородные связи с этой сетью.

Однако данные, полученные методом сайт-направленного мутагенеза [40], опровергают гипотезу о гистидиновой триаде. Авторами работы [40] были получены мутанты с заменами  $\text{His}^{199}$  и  $\text{His}^{228}$  на другие аминокислотные остатки. Сходство каталитических параметров полученных мутантов с параметрами фермента дикого типа свидетельствует о том, что остатки  $\text{His}^{199}$  и  $\text{His}^{228}$  не принимают участия в компенсации отрицательного заряда остатка глутаминовой кислоты субстрата. По-видимому,  $\text{His}^{199}$  ответственен за ориентацию остатка  $\text{His}^{213}$ , играющего основную роль в связывании субстрата, а  $\text{His}^{228}$ , очевидно, не несет никаких функций, определяющих узнавание  $\gamma$ -карбоксильной группы  $\text{Glu-P}_1$  субстрата.

Отсутствие остатков гистидина, аналогичных  $\text{His}^{199}$  и  $\text{His}^{228}$ , в структуре других глутамилэндопептидаз указывает на относительно невысокую их значимость для процесса катализа.

В заключение хотелось бы отметить, что для ряда сериновых протеиназ показано изменение  $pK_a$  имидазольного кольца остатка гистидина в зависимости от локального окружения [41–43]. Возможно, подобный механизм компенсации отрицательного заряда субстрата некой положительно заряженной группой, имеющей нехарактерное значение  $pK_a$ , в активном центре фермента присущ и глутамилэндопептидазам [44], однако природа этой группы пока не установлена.

#### Модели пространственных структур глутамилэндопептидаз

Как упоминалось выше, данные рентгеноструктурного анализа глутамилэндопептидазы из *Str. griseus* нельзя использовать для выяснения строения активных центров аналогичных ферментов из-за крайне низкой гомологии первичных структур протеиназ внутри этого подсемейства. В этом случае весьма полезным для изучения активных центров фермента и участков, важных для его функционирования, может ока-

заться моделирование пространственных структур глутамилспецифичных эндопептидаз. Барбоса и соавт. [29] на основе гомологии первичных структур выбрали из базы данных три фермента (BL-GSE, BS-GSE, V8-GSE) и осуществили компьютерное моделирование наиболее консервативной и наиболее важной для функционирования ферментов области активных центров. За основу была принята структура трипсина [45] из *Str. griseus*.

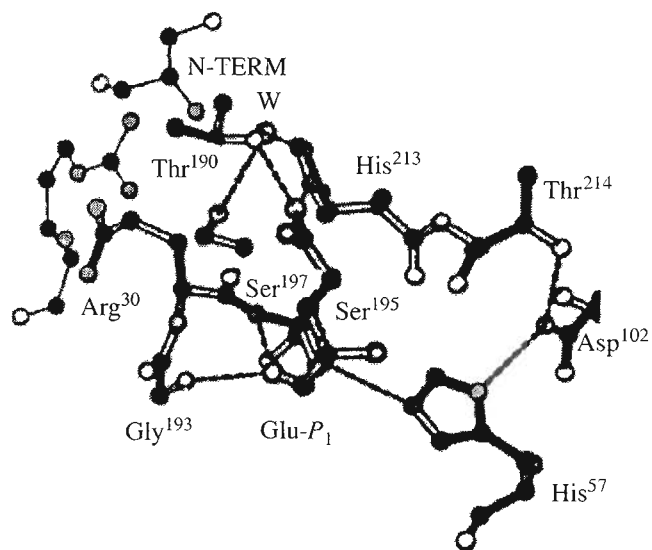
*Глутамилэндонептидаза из B. licheniformis*

На рис. 4 представлена модель  $S_1$ -участка связывания фермента из *B. licheniformis* [29]. Показанные полыми линиями остатки His<sup>213</sup> и Thr<sup>190</sup> образуют, вероятно, водородные связи с O<sup>ε</sup>-атомом остатка Glu- $P_1$  субстрата. В одной из них участвует атом водорода N<sup>ε2</sup> гистидина, вторую водородную связь с тем же O<sup>ε</sup>-атомом γ-карбоксильной группы остатка Glu- $P_1$  субстрата может формировать O<sup>γ</sup>-атом остатка Thr<sup>190</sup>, ориентированный в обычно невыгодной *gauche*-конформации. Молекула воды (W) связывает N<sup>δ1</sup>-атом His<sup>213</sup> с O<sup>γ</sup>-атомом Ser<sup>197</sup>. Эти взаимодействия аналогичны взаимодействиям, наблюдаемым для SG-GSE [30]. Следует отметить, что остатки His<sup>213</sup> и Thr/Ser<sup>190</sup> консервативны для всех глутамилэндонептидаз.

По мнению авторов работы [29], полученная ими модель BL-GSE позволяет предположить три возможных механизма компенсации заряда γ-карбоксильной группы остатка глутаминовой кислоты в положении  $P_1$  (рис. 4).

Во-первых, самой по себе поляризации His<sup>213</sup> под действием Glu- $P_1$  может оказаться достаточно. Это согласуется с понижением значения pH-оптимума активности BL-GSE и других глутамилэндонептидаз (pH 7.3–8.0) по сравнению со значением оптимума активности SG-GSE (pH 9.0) [7, 9, 44].

В основе второго возможного механизма лежит предположение о том, что наличие на N-конце эндонептидазы из *B. licheniformis* дополнительного по сравнению с сериновыми протеиназами млекопитающих аминокислотного остатка может обеспечивать положительный заряд  $S_1$ -участка [29]. N-Концевой остаток ферментов млекопитающих формирует важный для активации зимогена солевой мостик с Asp<sup>194</sup>. В последовательности глутамилэндонептидаз вместо Asp<sup>194</sup> стоят нейтральные остатки Gln или Asn, а N-конец удлинен на один аминокислотный остаток. Если допустить небольшое смещение пептидной цепи в области Thr<sup>190</sup>, наличие дополнительного аминокислотного остатка позволяет N-концу белковой молекулы, несущему некомпенсированный положительный заряд, приблизиться к  $S_1$ -участку. Однако самим



**Рис. 4.** Компьютерная модель активного центра и  $S_1$ -участка BL-GSE (по данным работы [29]). Полыми линиями показаны остатки His<sup>213</sup> и Thr<sup>190</sup>, формирующие, вероятно, водородные связи с одним из атомов кислорода γ-COOH-группы остатка Glu- $P_1$  субстрата. Для остатков Thr<sup>190</sup> и Ser<sup>197</sup> показаны только боковые радикалы. Тонкими линиями обозначены остаток Arg<sup>30</sup> и остаток N-концевой аминокислоты, полыми кружками – атомы кислорода, заштрихованными – азота, черными – углерода.

авторам реализация подобной модели кажется маловероятной ввиду стерических затруднений в области Thr<sup>190</sup>, хотя такая ориентация и напоминает механизм, имеющий место в молекуле лизилэндонептидазы из *Achromobacter lyticus* [46].

Согласно третьему варианту модели, источником положительного заряда, стабилизирующего остаток глутаминовой кислоты субстрата в положении  $P_1$ , может служить остаток Arg<sup>30</sup>, локализованный в первой β-структуре N-концевого цилиндра молекулы белка. В этом случае аргинин может взаимодействовать прямо или через молекулу воды с остатком Ser<sup>197</sup>, который в свою очередь формирует водородную связь с атомом N<sup>δ1</sup> His<sup>213</sup> и, таким образом, с остатком Glu- $P_1$ . Однако участие Arg<sup>30</sup> в этом ряду взаимодействий потребовало бы переориентации боковой цепи Ser<sup>197</sup>.

Модель, предложенная авторами работы [29], позволяет предположить, что недостаточная эффективность гидролиза аспартилсодержащих субстратов эндонептидазой из *B. licheniformis* [47] объясняется смещением расщепляемой связи относительно каталитически активного серина вследствие более короткой, чем у Glu, боковой группы взаимодействующего с His<sup>213</sup>/Thr<sup>190</sup> остатка аспарагиновой кислоты.

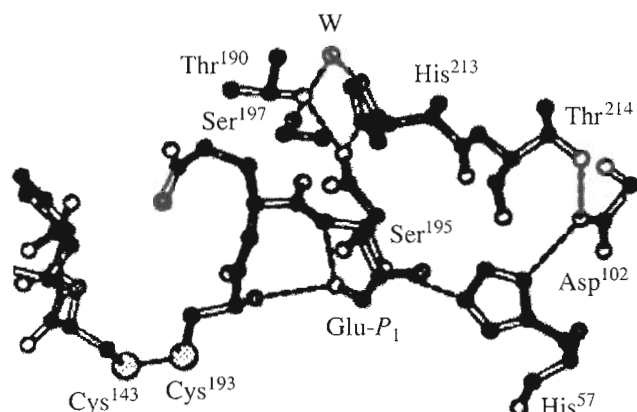


Рис. 5. Компьютерная модель BS-GSE в области участка  $S_1$  и оксианионной впадины (по данным работы [29]). Пунктиром обозначены водородные связи, полыми кружками – атомы кислорода, заштрихованными – азота, черными – углерода, большими кружками дисульфидный мостик между Cys<sup>193</sup> и Cys<sup>143</sup>.

#### Глутамилэндонептидаза из *B. subtilis*

Многое из вышеизложенного, включая возможное объяснение субстратной специфичности, сохраняется и для BS-GSE, поскольку наиболее значимые аминокислотные остатки консервативны у обоих ферментов.

Однако привлекает внимание одна особенность BS-GSE, заключающаяся в замене Gly<sup>193</sup> на Cys [22]. Gly<sup>193</sup> – наиболее консервативный аминокислотный остаток ферментов семейства трипсина. Атом азота этого остатка принимает участие в формировании оксианионной впадины, необходимой для стабилизации заряда, возникающего на карбонильном атоме кислорода тетраэдрического интермедиата в момент катализа [48]. Кроме того, BS-GSE содержит еще один остаток цистеина – Cys<sup>143</sup>, локализованный в третичной структуре вблизи остатка Cys<sup>193</sup>, и модель, построенная авторами [29] (рис. 5), вполне согласуется с наличием дисульфидной связи Cys<sup>193</sup>Cys<sup>143</sup>. Эта связь стабилизирует невыгодную конформацию Cys<sup>193</sup> таким образом, что атом азота его амидной группы может участвовать в формировании оксианионной впадины совместно с амидной группой остатка Ser<sup>195</sup>. Такая гипотеза помогает объяснить несоответствие между отнесением этого фермента, с учетом его аминокислотной последовательности, к классу сериновых протеиназ и данными биохимических исследований, свидетельствующих в пользу классификации BS-GSE как металлопротеиназы [21].

Модель пространственной структуры BS-GSE [29] позволяет сделать вывод, что дисульфидная связь ответственна за стабилизацию Cys<sup>193</sup> в конформации, подобной конформации Gly<sup>193</sup> в дру-

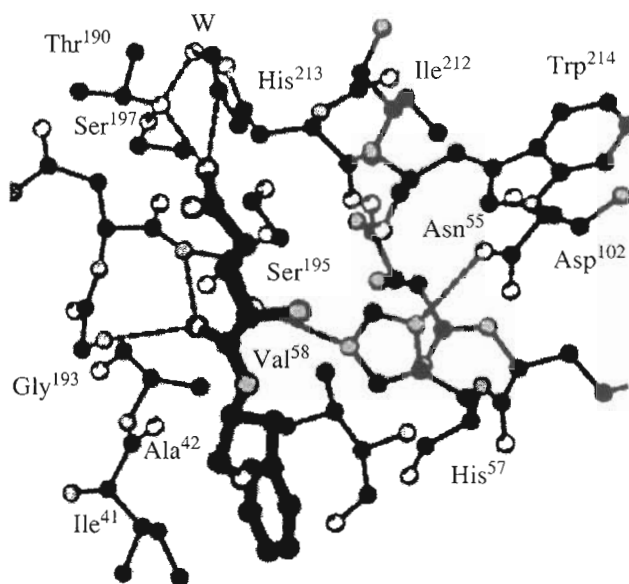


Рис. 6. Компьютерная модель участков  $S_1$  и  $S_1'$  активного центра V8-GSE с моделированным субстратом Glu-Phe (по данным работы [29]). Субстрат Glu-Phe выделен жирным. Пунктиром обозначены водородные связи, полыми кружками – атомы кислорода, заштрихованными – азота, черными – углерода.

гих сериновых протеиназах. Таким образом, при действии восстанавливающих агентов может происходить разрыв S–S-связи, влекущий за собой переориентацию Cys<sup>193</sup> и, как следствие, потерю ферментативной активности из-за разрушения оксианионной впадины. Два цистеина могли бы участвовать в связывании иона металла, однако авторы работы [29] не обнаружили других очевидных кандидатов, которые дополнили бы формирование координационной области для связывания ионов металла.

#### Глутамилэндонептидаза из *S. aureus*, тип. V8

Модель V8-GSE [29] (рис. 6) во многом сходна с моделями BL-GSE и BS-GSE, однако у протеиназы V8 отсутствует остаток Arg<sup>30</sup>. Последнее обстоятельство вряд ли может служить в пользу участия Arg<sup>30</sup> в механизме переноса заряда у глутамилэндонептидаз. В ходе биохимических исследований были обнаружены две ионогенные группы с  $pK_a$  6.58 и 8.25 [49] или 5.8 и 8.4 [44], существенные для каталитического акта. Первое значение было приписано остатку гистидина каталитической триады, а второе не было соотнесено ни с каким остатком, хотя, по мнению авторов работы [29], оно может соответствовать остатку His<sup>213</sup>. Если последнее предположение верно, то  $pK_a$  выше 8 для этого гистидина может оказаться достаточным для объяснения субстратной специфичнос-

ти, поскольку при pH 7.2 для V8-GSE этот остаток гистидина может быть заряжен положительно [44].

Данная компьютерная модель также объясняет предпочтение V8-GSE, отдаваемое крупным гидрофобным остаткам в положении  $P_1'$  [47, 50], поскольку, согласно ей, в формировании подцентра  $S_1'$  принимают участие боковые цепи остатков Ile<sup>41</sup>, Ala<sup>42</sup>, Val<sup>58</sup>. Эти аминокислотные остатки ответственны, вероятно, за узнавание крупного гидрофобного остатка в  $P_1$ -положении субстрата [29].

Значительный интерес в случае модели V8-GSE представляет четвертый член каталитического квартета – в норме Ser/Thr<sup>214</sup>, в данном случае Trp<sup>214</sup>. Этот остаток формирует так называемую “аспартатную впадину”, важную для стабилизации Asp<sup>102</sup> каталитической триады [51]. Кроме того, Asp<sup>102</sup> образует водородные связи с N<sup>α</sup>- и N<sup>δ1</sup>-атомами His<sup>57</sup> и с N<sup>α</sup>-атомом Lys<sup>56</sup>. Следует отметить, что у бактериальных ферментов (SGPA, SGPB, α-LP) пара Asp<sup>102</sup>–His<sup>57</sup> защищена петлей между элементами структуры C-концевого домена и ароматической крышкой в позиции 94 (Trp/Phe/Tyr) [52]. Несколько принципиальных отличий протеиназы V8 [29] могут служить причиной уменьшения каталитической активности V8-GSE по сравнению с остальными членами семейства: 1) замена Ser/Thr<sup>214</sup> на Trp; 2) отсутствие ароматической крышки и меньший по сравнению с другими протеиназами размер петель N- и C-концевых доменов; 3) замена малых остатков Gly/Ala<sup>55</sup> и Ala/Gly<sup>56</sup> на Asn и Lys.

Потеря больших петель и ароматической крышки, которые обеспечивали бы защиту контакта Asp<sup>102</sup>–His<sup>57</sup> от действия растворителя, и замещение четвертого члена каталитического квартета (в норме способствующего ориентации Asp<sup>102</sup>), по-видимому, приводит к уменьшению силы взаимодействия Asp<sup>102</sup>/His<sup>57</sup>, что, вероятно, может вызывать уменьшение нуклеофильности каталитического Ser<sup>195</sup> [29]. Последнее обстоятельство может служить причиной снижения величины параметра  $k_{cat}/K_m$  для V8-протеиназы по сравнению с BL-GSE и SG-GSE [47].

Таким образом, определение структуры активных центров и понимание каталитического механизма глутамилэндопептидаз – достаточно сложная задача, тем более, как указывалось ранее, ферменты этой группы весьма отличаются друг от друга по своей первичной структуре. Применение рентгеноструктурного анализа в сочетании с компьютерным моделированием позволяет в какой-то мере компенсировать недостаток экспериментальных данных и приблизиться к пониманию механизма действия этих ферментов.

## ПРИМЕНЕНИЕ ГЛУТАМИЛСПЕЦИФИЧНЫХ ЭНДОПЕПТИДАЗ

Узкая специфичность глутамилэндопептидаз позволяет использовать их для селективного расщепления пептидных связей, что удобно при исследовании белков и полипептидных фрагментов. Кроме того, это свойство глутамилспецифичных ферментов расширяет возможности прикладной генной инженерии, поскольку введение строго определенных сайтов рестрикции в нуклеотидные последовательности облегчает дальнейшее выделение гибридных полипептидов.

Наиболее изученная протеиназа V8 из *S. aureus* нашла широкое применение в анализе пептидных последовательностей [16, 44, 53] и в пептидном синтезе [50, 54–58].

### Применение глутамилэндопептидаз для гидролиза пептидных последовательностей

Гебауэр и Харрис [52] гидролизовали с помощью V8-GSE две изоформы гемоцианина – KLH1 и KLH2 (KLH – keyhole limpet hemocyanin), гигантского моллюска *Megatura crenulata* по связям Glu–Хаа и Asp–Хаа. Дальнейшее изучение методами электронной микроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле реассоциации полученных фрагментов дало представление о структурных взаимодействиях двух форм гемоцианина, протеолитических фрагментах и межсубъединичных взаимодействиях внутри полимерной и олигомерной форм.

Така и соавт. [59] разработали метод быстрого определения аминокислотной последовательности парвальбумина β-типа из лягушки *Rana catesbeiana* комбинацией методов масс-спектрометрии, аминокислотного анализа и расщепления аминокислотной последовательности Arg-специфичной и V8-протеиназами. Идентификация полученных в результате гидролиза фрагментов с помощью масс-спектрометрии и аминокислотного анализа и сравнение полученных данных со структурой высокомолекулярного парвальбумина из лягушки *R. esculenta* позволили выявить консервативные области в первичной структуре белка.

Веркайнэ-Марко и соавт. [60] гидролизовали бычий гемоглобин V8-протеиназой в присутствии SDS в гомогенной фазе и в твердофазной системе с сорбцией на амберлите. Пептидное картирование гидролизата выявило многочисленные сайты гидролиза в гемоглобине, особенно после остатков аспарагиновой кислоты. Исследования показали, что SDS в значительной степени улучшает эффективность гидролиза гемоглобина V8-протеиназой при проведении реакции как в растворе, так и в твердофазной системе. По мнению авто-

ров, два пептида, полученные в результате гидролиза гемоглобина (Leu<sup>76</sup>-Pro-Gly-Ala-Leu-Ser-Glu<sup>82</sup> и Lys<sup>94</sup>-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu<sup>100</sup>), потенциально обладают значительной биологической активностью, а потому могут представлять интерес.

Хуан и соавт. [61] исследовали структурно-функциональную организацию анти-HIV и анти-опухолевых белков MAP30 и GAP31 путем ограниченного протеолиза с помощью лизилэндопептидазы и V8-GSE. В присутствии 10% (по весу) протеиназ центральные области исследуемых белков оставались интактными, в то время как N- и C-концевые участки подверглись протеолизу. Было установлено, что полипептидные фрагменты белков MAP30 и GAP31, образовавшиеся в результате такого совместного гидролиза, биологически активны против HIV-1 и опухолевых клеток (IC<sub>50</sub> 0.2–0.4 нМ) и в условиях эксперимента обладали крайне низкой токсичностью. Полученные данные могут послужить основой для разработки нового поколения антивирусных и анти-опухолевых препаратов.

Таким образом, глутамилэндопептидазы могут служить удобным инструментом для исследования белков.

Гулько и соавт. [62] описали получение полипептидного препарата VNTR<sub>22</sub> (MUC1) с потенциальной противоопухолевой активностью ферментативным расщеплением слитого белка STRP-VNTR<sub>22</sub> (STRP – стрептавидин; VNTR – tandemные повторы; 22 – число tandemных повторов) эндопептидазой из *B. intermedius*. Ранее было выявлено, что tandemные повторы в полипептидной цепи опухолеассоциированного антигена MUC1 (продукта генов *muc1* семейства муцинов человека) высоко иммуногенны. Для повышения эффективности противоопухолевого иммунного ответа современные направления клинической биологии предполагают возможность использования негликозилированных VNTR-полипептидов в качестве вакцинирующих препаратов против злокачественных опухолей человека различной локализации (молочные железы, легкие, толстый кишечник, яичники, поджелудочная железа). Авторы сконструировали ген слитого белка стрептавидин–опухлеассоциированный антиген, а затем получили гибридный слитый белок STRP-VNTR<sub>22</sub>, обладавший высокой способностью индуцировать синтез антител, специфичных к природному аналогу рекомбинантного продукта (MUC1-белок поверхности клеток карциномы человека T-47D). Стрептавидиновый компонент был введен в слитый белок с целью облегчения экспорта растворимого слитого белка в периплазму клеток *E. coli*, а в дальнейшем – для аффинного выделения слитого белка. Для возможности расщепления гибридного белка STRP-VNTR<sub>22</sub> эндопептидазой из *B. intermedius* в межгенный адаптор его

слитого гена была введена нуклеотидная последовательность, кодирующая тетрапептид Ile-Glu-Gly-Arg, который впоследствии и служил мишенью для VI-GSE (1 мг VI-GSE в течение 15 мин расщеплял 80–100 мг слитого белка по связи Glu-Gly с образованием двух фрагментов).

#### *Использование глутамилспецифичных эндопептидаз в качестве катализаторов реакций пептидного синтеза*

Ферментативный пептидный синтез служит весьма привлекательной альтернативой химическим методам синтеза в растворе и на твердой фазе. Мягкие условия реакции, возможность использования иммобилизованных ферментов и промышленного масштабирования, крайне высокая степень регио- и стереоспецифичности, отсутствие необходимости защиты боковых функциональных групп – основные преимущества этого метода. Как упоминалось выше, глутамилспецифичные эндопептидазы из различных источников, благодаря их узкой субстратной специфичности, могут быть использованы в качестве катализаторов реакций пептидного синтеза. На сегодняшний день с этой целью используются лишь коммерчески доступные препараты BL-GSE и V8-GSE.

Видмер и соавт. [63] синтезировали последовательность эпидермального фактора роста мыши путем катализируемой V8-GSE фрагментной конденсации пептидов с C-концевыми остатками Glu и Asp. S<sub>1</sub>'-Субстратная специфичность протеиназы V8 была исследована в лаборатории Якубке на примере реакций ферментативного ацилирования серии нуклеофилов метиловым эфиром N-бензилоксикарбонилглутаминовой кислоты [50]. В этой же лаборатории V8-протеиназу впервые применили в качестве катализатора синтеза модельных пептидов при –25°C [54]. Было показано, что V8-GSE при –25°C способна катализировать реакцию ацилирования H-Ala-Ala-OH метиловым эфиром N-бензилоксикарбонилглутаминовой кислоты в 15 раз эффективнее, чем при 25°C.

Черовски [64] исследовал способность V8-GSE катализировать реакции пептидного синтеза в гидрофильных органических растворителях с низким содержанием воды (табл. 1). Пептиды оказались более подходящими карбоксильными компонентами, чем Z-Glu-OMe. Оказалось, что в ацетонитриле только Leu-NH<sub>2</sub> и Leu-Gly могут быть ацилированы с удовлетворительными выходами при использовании в качестве катализатора V8-GSE, в то время как в водной среде протеиназа V8 катализирует образование пептидных связей Glu-Xaa, где Xaa – остаток гидрофобной аминокислоты [50]. Автором работы [64] не была зафиксирована реакция Z-Asp-OMe с Leu-NH<sub>2</sub>.



**Таблица 1.** Катализируемый протеиназой V8 (V8-GSE) синтез пептидов в гидрофильных органических растворителях с малым содержанием воды [64]

Ацилирующий компонент	Аминокислотный компонент	Синтез пептида, выход, %		Гидролиз эфира, выход, %	
		4 ч	24 ч	4 ч	24 ч
Z-Glu-OMe <sup>a</sup>	Leu-NH <sub>2</sub> · HCl	78	90	8	10
Z-Glu-OBzl <sup>a</sup>	Leu-NH <sub>2</sub> · HCl	85	93	6	7
Z-Glu-OMe <sup>b</sup>	Leu-NH <sub>2</sub> · HCl	68	73	25	27
Z-Glu-OMe <sup>c</sup>	Leu-NH <sub>2</sub> · HCl	76	77	24	23
Z-Glu-OMe <sup>d</sup>	Leu-NH <sub>2</sub> · HCl	77	94	5	6
Z-Glu-OMe <sup>a</sup>	Gly-NH <sub>2</sub> · HBr	23	31	5	7
Z-Glu-OMe <sup>a</sup>	Leu-Gly	51	75	11	15
Z-Glu-OMe <sup>a</sup>	Phe-Gly	49	49	30	51
Z-Glu-OMe <sup>a</sup>	Trp-NH <sub>2</sub> · HCl	18	16	77	79
Z-Ala-Glu-OMe <sup>a</sup>	Leu-NH <sub>2</sub> · HCl	92	92	8	8
Z-Ala-Ala-Glu-OMe <sup>a</sup>	Leu-NH <sub>2</sub> · HCl	86	91	8	9
Z-Asp-OMe <sup>a</sup>	Leu-NH <sub>2</sub> · HCl	0	0	0	0

Растворитель: а – ацетонитрил, 5% воды (здесь и в б–д – по объему); б – изопропанол, 5% воды; с – *трет*-бутанол, 5% воды; д – ацетонитрил, 2% воды.

Хенслер и соавт. [65] синтезировали пептиды, содержащие связи Glu-Хаа и Asp-Хаа в замороженных водных системах, используя в качестве катализатора эндопептидазу из *B. licheniformis*. С точки зрения авторов, особый интерес представляло использование в качестве аминокислотного компонента аминокислоты с отрицательно заряженной боковой цепью. Известно, что в большинстве случаев глутаминовая и аспарагиновая кислоты являлись плохими нуклеофилами в катализируемых ферментами реакциях синтеза пептидов [66–68]. Результаты исследований [65] (табл. 2) демонстрируют значительное увеличение выхода продукта ферментативной реакции в замороженных системах по сравнению с синтезом в растворах. Этот эффект, возможно, объясняется концентрацией всех неводных компонентов в незамороженных микрочастицах частично замороженных систем [69].

BL-GSE не приемлет аминокислоты *D*-конфигурации в *P*<sub>1</sub>-положении ни в водных растворах, ни в замороженных системах. Вместе с тем, замораживание все же оказывает влияние на стереоспецифичность фермента: пептиды с *D*-аминокислотами в *P*<sub>2</sub>- и *P*<sub>3</sub>-положениях оказались плохими нуклеофилами в растворе при 25°C, но в замороженных системах реагировали с карбоксильным компонентом почти количественно.

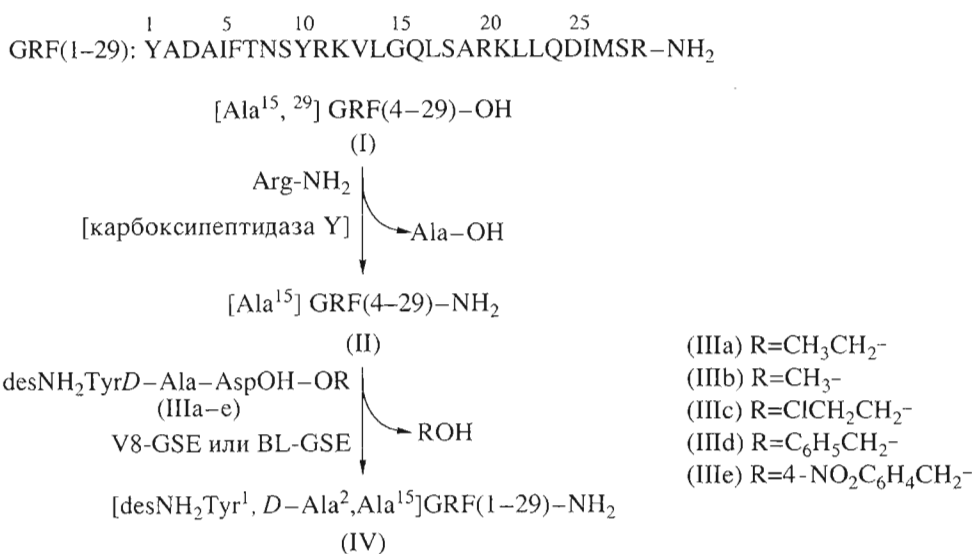
Следует отметить, что аминокислоты с остатками Asp и Glu в *P*<sub>1</sub>-положении также являлись плохими нуклеофилами в растворе, однако при замораживании реакционной смеси они реагировали с карбоксильным компонентом, давая продукт с высоким выходом.

Бонгерсом и соавт. [57] был описан полуферментативный синтез высокоэффективного аналога фактора высвобождения гормона роста человека (human growth hormone releasing factor –

**Таблица 2.** Катализируемая эндопептидазой из *B. licheniformis* (BL-GSE) конденсация Z-Glu-OMe (Z-Asp-OMe) с аминокислотными компонентами, содержащими пролин, *D*-аминокислоты, глутаминовую и аспарагиновую кислоты в положениях *P*<sub>1</sub>, *P*<sub>2</sub> и *P*<sub>3</sub> [65]

Аминокислотный компонент	Выход целевого пептида, %			
	Карбоксильный компонент Z-Glu-OMe <sup>a</sup>		Карбоксильный компонент Z-Asp-OMe <sup>b</sup>	
	25°C	-15°C	25°C	-15°C
H-Pro-NH <sub>2</sub>	0	0	0	0
H-Ala-Pro-OH	0	6	0	6
H-Ala-Ala-Pro-OH	27	99	68	98
H- <i>D</i> -Leu-NH <sub>2</sub>	0	0	0	5
H-Ala- <i>D</i> -Ala-OH	0	36	2	77
H-Ala-Ala- <i>D</i> -Ala-OH	4	97	14	98
H-Asp-NH <sub>2</sub>	0	34	0	85
H-Glu-NH <sub>2</sub>	0	54	0	79
H-Asp-Gly-OH	0	48	0	43
H-Glu-Gly-OH	0	28	0	65
H-Ala-Asp-OH	0	95	11	97
H-Ala-Glu-OH	0	79	3	95

Концентрация фермента: а – 0.047 (25°C) и 0.24 (-15°C) мкг/мл; б – 4 (25°C) и 20 (-15°C) мкг/мл. Время реакции 1–6 ч.



**Схема 1.** Полуферментативный синтез аналога фактора высвобождения гормона роста человека (GRF) – [desNH<sub>2</sub>Tyr<sup>1</sup>, D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup>]GRF(1-29)-NH<sub>2</sub>, включающего 29 а. о. с заменами L-Ala<sup>2</sup> → D-Ala<sup>2</sup> и Gly<sup>15</sup> → Ala<sup>15</sup> (по данным работы [57]).

GRF) (схема 1). Авторы оценивали каталитическую эффективность протеиназ из *B. licheniformis* и *S. aureus* (шт. V8) на стадии конденсации фрагментов (II) и (III). Было показано, что BL-GSE и V8-GSE оказались в равной степени активными, однако в условиях реакции (20% DMF, 150 мМ триэтаноламинный буфер, pH 8.2, 37°C) более стабильной являлась протеиназа из *B. licheniformis*. Эта эндопептидаза не теряла активности при весовом соотношении S/E = 1000 : 1 в течение 24–48 ч. Степень конверсии пептидного фрагмента (II) в целевое соединение (IV) в случае V8-GSE-катализируемого ацилирования соединения (II) эфиром (IIIa) ограничивалась 60%, вследствие гидролиза вновь синтезируемой связи Asp<sup>3</sup>-Ala<sup>4</sup> и связи Asp<sup>25</sup>-Ile<sup>26</sup>. Этот недостаток устраняли, используя в качестве ацилирующего компонента 4-нитробензиловый эфир (IIIe). Авторы отмечают, что поскольку специфичность обоих используемых ферментов в 1000–5000 раз выше по отношению к Glu-Хаа-связям, чем к связям Asp-Хаа, то подобная сегментная конденсация возможна только в случае синтеза пептидов, содержащих остатки Asp и не содержащих остатки Glu.

В ряде работ [70–73] была продемонстрирована способность нативной и иммобилизованной форм протеиназы V8-GSE гидролизовать и вновь синтезировать α-цепь гемоглобина А и С с последующей полной реконструкцией молекул. В α-цепи имеются четыре потенциальных сайта гидролиза: после остатков Glu<sup>23</sup>, Glu<sup>27</sup>, Glu<sup>30</sup>, Asp<sup>47</sup>. Протеиназой V8 преимущественно гидролизует связь α<sub>30-31</sub> (то есть связь, образованная карбоксильной группой Glu<sup>30</sup>), а в специально подобран-

ных условиях реакции – только эта связь. Интересно, что V8-GSE оказалась способной и синтезировать эту связь на 50%, но не катализировала конденсацию фрагментов α-цепи (α<sub>1-23</sub> + α<sub>31-47</sub>) и (α<sub>1-27</sub> + α<sub>31-47</sub>). Присутствие протеиназы V8 в растворе по окончании реакции в значительной степени уменьшало выход реконструированного гемоглобина А [73], поэтому в дальнейшем с целью возможно более полного удаления V8-GSE из реакционной смеси авторы использовали в качестве катализатора V8-GSE, ковалентно иммобилизованную на агарозе. Было показано, что иммобилизация фермента не оказывала сколько-нибудь существенного влияния на выход реакции конденсации фрагментов α<sub>1-30</sub> + α<sub>31-47</sub>, однако в значительной степени увеличивала количество реконструированного белка.

#### Использование концепции субстратов-миметиков в ферментативном пептидном синтезе

Несмотря на свою привлекательность, биокаталитический синтез имеет ряд недостатков. К наиболее существенным из них можно отнести ограничения, связанные с субстратной специфичностью доступных в настоящее время ферментов, что не позволяет синтезировать все возможные пептидные последовательности и практически исключает возможность использования в ферментативном пептидном синтезе неприродных аминокислот. Кроме того, в случае пептидов, содержащих более двух аминокислотных остатков, существует значительный риск протеолиза как исходных

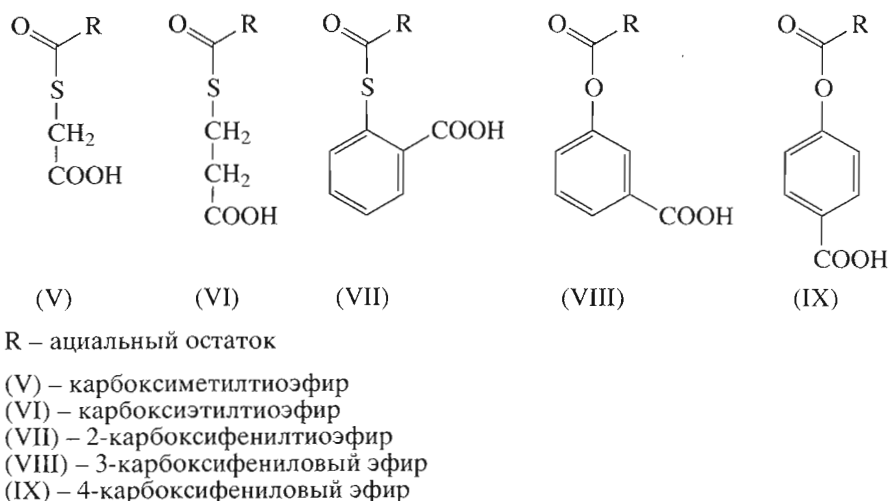


Рис. 7. Структуры потенциальных субстратов-миметиков Glu,Asp-специфичных эндопептидаз (по данным работы [78]).

соединений, так и продуктов реакций. Ввиду вышесказанного, в последнее время все большее значение приобретает так называемая концепция субстратов-миметиков, позволяющая значительно расширить масштаб использования ферментов в качестве катализаторов химических реакций. Эта концепция впервые была применена в пептидном синтезе, катализируемом трипсином [74, 75], а затем распространена на Arg-специфичные протеиназы [76]. В последние годы активная разработка этой концепции ведется в группе проф. Бордюжи (Германия), где исследуют способность глутамилэндопептидаз из *S. aureus* (шт. V8) и *B. licheniformis* катализировать реакции с участием субстратов-миметиков [77–80].

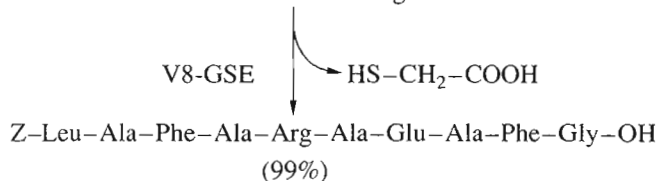
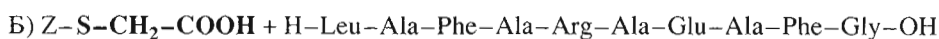
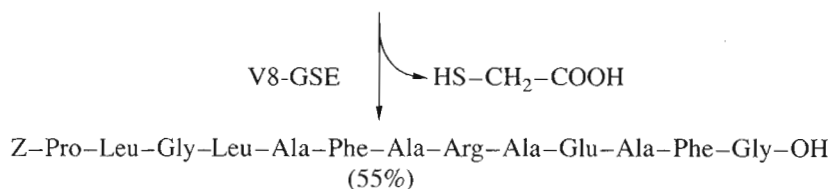
В субстратах-миметиках сайт-специфичные функции, узнаваемые ферментами, представляют собой не остатки аминокислот, а сложноэфирные уходящие группы, в результате чего фермент оказывается ацилированным нехарактерной ацильной группировкой. Далее при добавлении в реакционную среду аминокислотного компонента ацилфермент дезацилируется вне зависимости от природной субстратной специфичности протеиназы. Более того, благодаря связыванию неспецифичного аминокислотного остатка вновь формируемые пептидные связи не подвергаются вторичному гидролизу, что в данном случае позволяет говорить о протекании необратимой ферментативной реакции.

Поскольку уходящая группа субстрата-миметика занимает в активном центре фермента положение боковой цепи специфической аминокислоты обычного субстрата, то очень важными оказываются условия связывания анионной уходящей группы миметика с участком  $S_1$  активного центра фермента. Отсутствие данных о строении активных центров V8-GSE и BL-GSE приводит к необ-

ходимости конструировать миметики, у которых структуры анионных уходящих групп близкородственны боковым цепям глутаминовой и аспарагиновой кислот. На рис. 7 представлены субстраты-миметики с анионной уходящей группой [78].

Веховски и соавт. [79] показали, что и V8-GSE и BL-GSE являются эффективными катализаторами реакций, в которых в качестве карбоксильных компонентов используются субстраты-миметики, что, с учетом коммерческой доступности указанных ферментов, делает данный метод синтеза весьма перспективным. Исследования показали, что уходящая группа субстрата-миметика влияет только на скорость реакций гидролиза и аминолита, и то лишь в незначительной степени. Оказалось, что наиболее эффективными ацилирующими компонентами являются миметики с ароматическими уходящими группами, следовательно, их использование в ферментативном синтезе требует меньшего количества фермента. На схеме 2 приведены примеры катализируемых глутамилэндопептидазой (шт. V8) биокаталитических реакций синтеза пептидной связи (А) и введения защитной группы (Б) с использованием в качестве карбоксильных компонентов субстратов-миметиков [79].

Таким образом, с точки зрения применения, в ферментативном пептидном синтезе субстраты-миметики являются весьма эффективными ацилирующими агентами. В связи с этим расширение спектра используемых в ферментативном синтезе субстратов за счет структурно родственных соединений оказалось бы весьма полезным.



**Схема 2.** Ацилирование пептидного фрагмента субстратом-миметиком, катализируемое глутамилэндопептидазой V8 (по данным работы [79]).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из всего вышеизложенного становится очевидным, что глутамилэндопептидазы представляют собой весьма удобный инструмент как для научных исследований, так и для решения практических задач. Таким образом, очевидна необходимость поиска и выделения новых представителей этого класса, а также дальнейшего изучения уже известных глутамилспецифичных эндопептидаз с целью более полного их использования при исследовании белковых структур и в качестве катализаторов реакций синтеза биологически активных соединений – пептидов и их аналогов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Drapeau G.R., Boily Y., Houmard J. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 6720–6726.
- Houmard J., Drapeau G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. P. 3506–3509.
- Drapeau G.R. // Methods in Enzymology. 1977. V. 47. P. 189–191.
- Drapeau G.R. // Can. J. Biochem. 1978. V. 56. P. 534–544.
- Мосолова О.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М., Ходова О.М., Цаплина И.А. // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 414–422.
- Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н., Ревина Л.П., Степанов В.М., Егоров Н.С. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 46–53.
- Yoshida N., Tsuruyama S., Nagata K., Hirayama K., Noda K., Makisumi S. // J. Biochem. (Tokyo). 1988. V. 104. P. 451–456.
- Svendsen I., Jensen M.R., Breddam K. // FEBS Lett. 1991. V. 292. P. 165.
- Svendsen I., Breddam K. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. P. 165–171.
- Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovitch E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. // FEBS Lett. 1997. V. 404. P. 241–244.
- Dancer S.J., Garratt R., Saldanha J., Jhoti H., Evans R. // FEBS Lett. 1990. V. 268. P. 129–132.
- Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T. et al. // Nature (London). 1992. V. 356. P. 768–774.
- Thornberry N.A., Rano T.A., Peterson E.P., Raspey D.M., Timkey T. et al. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 17907–17911.
- Malcolm B.A., Lowe C., Shechosky Sh., McKay R.T., Yang Ch.Ch., Shah V.J., Simon R.J., Vederas J.C., Santi D.V. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 8172–8179.
- Webber S.E., Okano K., Little T.L., Reich S.H., Xin Y., Fuhrman S.A., Matthews D.A., Love R.A., Hendrickson T.F., Patick A.K., Meador III J. W., Ferre R.A., Brown E.L., Ford C.E., Binford S.L., Worland S.T. // J. Med. Chem. 1998. V. 41. P. 2786–2805.
- Birktoft J.J., Breddam K. // Methods Enzymol. 1994. V. 244. P. 114–126.
- Руденская Г.Н. // Биооргани. химия. 1998. Т. 24. С. 256–261.
- Carmona C., Gray G.L. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 6757.
- Yoshikawa K., Tsuzuki H., Fujiwara T., Nakamura E., Iwamoto H., Matsumoto K., Shin M., Yoshida N., Teraoka H. // Biochem. Biophys. Acta. 1992. V. 1221. P. 221–228.
- Kakudo Sh., Kikuchi N., Kitadokoro K., Fujiwara T., Nakamura E., Okamoto H., Shin M., Tamaki M., Teraoka H., Tsuzuki H., Yoshida N. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 23782–23788.
- Rufo G.A., Sullivan B.J., Sloma A., Pero J. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 1019–1023.
- Sloma A., Rudolph C.F., Rufo G.A., Sullivan B.J., Theriault K.A., Ally D., Pero J. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 1024–1029.

23. Smith H., De Jong A., Bron S., Venema G. // *Gene*. 1988. V. 70. P. 351–361.
24. Rebricov D.A., Akimkina T.V., Shevelev A.B., Demidyuk I.V., Bushueva A.M., Kostrov S.V., Chestukhina G.G., Stepanov V.M. // *J. Protein Chem.* 1999. V. 18. P. 21–27.
25. Suzuki Y., Yabuta M., Ohsuye K. // *Gene*. 1994. V. 150. P. 149–151.
26. Kitadokoro K., Nakamura E., Tamaki M., Horii T., Okamoto H., Shin M., Sato T., Fujiwara T., Tsuzuki H., Yoshida N., Teraoka H. // *Biochem. Biophys. Acta*. 1993. V. 1163. P. 149–157.
27. Demidyuk I.V., Nosovskaya E.A., Tsaplina I.A., Karavaiko G.I., Kostrov S.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 1997. V. 62. P. 171–175.
28. Демидюк И.В., Костров С.В. // *Молекулярн. биология*. 1999. Т. 33. С. 100–105.
29. Barbosa J.A.R.G., Saldanha J.W., Garratt R.C. // *Protein Engineering*. 1996. V. 9. P. 591–601.
30. Nienaber V.L., Breddam K., Birktoft J.J. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 11469–11475.
31. Cavarelli J., Prevost G., Bourguet W., Moulinier L., Chevrier B., Delagoutte B., Bilwes A., Mourey L., Riffai S., Piemont Y., Moras D. // *Structure*. 1997. V. 5. P. 813–824.
32. Barbosa J.A.R.G., Garratt R.C., Saldanha J.W. // *FEBS*. 1993. V. 324. P. 45–50.
33. Sielecki A.R., Hendrikson W.A., Broughton C.G., Delbaere L.T.J., Brayer G.D., James M.N.G. // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 134. P. 781–803.
34. Read R.J., James M.N.G. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 4420–4433.
35. Fujinaga M., Delbaere L.T.J., Brayer G.D., James M.N.G. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 184. P. 479–502.
36. James M.N., Sielecki A.R., Brayer G.D., Delbaere L.T.J., Bauer C.-A. // *J. Mol. Biol.* 1980. V. 144. P. 43–88.
37. Birktoft J.J., Blow D.M. // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 68. P. 187–240.
38. Донсон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика*. М., Мир, 1991. С. 544.
39. Aqvist J., Luecke H., Quioco F., Warshel A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 2026–2030.
40. Stennicke H.R., Birktoft J.J., Breddam K. // *Prot. Sci.* 1996. V. 5. P. 2266–2275.
41. Prevost M. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 260. P. 99–110.
42. Loewenthal R., Sancho J., Fersht A.R. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 224. P. 759–770.
43. Sancho J., Serrano L., Fersht A.R. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 2253–2258.
44. Sorensen S.B., Sorensen T.L., Breddam K. // *FEBS*. 1991. V. 294. P. 195–197.
45. Read R.J., James M.N.G. // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 200. P. 523–551.
46. Sakiyama F., Masaki T. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 244. P. 126–137.
47. Breddam K., Meldal M. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 206. P. 103–107.
48. Meijers R., Blagova E.V., Ledvikov V.M., Rudenskaya G.N., Chestukhina G.G., Akimkina T.V., Kostrov S.V., Lamzin V.S., Kuranova I.P. // *Biochemistry (in press)*.
49. Houmard J. // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 68. P. 621–627.
50. Shuster M., Aaviksaar A., Schellenberger V., Jakubke H.-D. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1990. V. 1036. P. 245–247.
51. Warshel A., Naray-Szabo G., Sussman F., Hwang J.K. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 3629–3637.
52. Brayer G.D., Delbaere L.T., James M.N. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 124. P. 261–283.
53. Gebauer W., Harris J.R. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 262. P. 166–175.
54. Schuster M., Aaviksaar A., Jakubke H.-D. // *Tetrahedron*. 1990. V. 46. P. 8093–8102.
55. Gerisch S., Haensler M., Jakubke H.-D. // *Peptides 1996 / Eds R. Ramage, R. Epton. Kingswingford: Mayflower Scientific Ltd., 1998. P. 419–420.*
56. Wehofsky N., Bordusa F. // *FEBS Lett.* 1999. V. 443. P. 220–224.
57. Bongers J., Lui W., Lambros T., Breddam K., Campbell R.M., Felix A.M., Heimer E.P. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1994. V. 44. P. 123–129.
58. Kumaran S., Datta D., Roy R.P. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 734–741.
59. Taka H., Kaga N., Fujimura T., Mineki R., Imaizumi M., Suzuki Y., Suzuki R., Tanokura M., Shindo N., Murayama K. // *J. Biochem. (Tokyo)*. 2000. V. 127. P. 723–729.
60. Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Nedjar-Arroume N., Guillochon D. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2000. V. 31. P. 127–134.
61. Huang P.L., Sun Y., Chen H.C., Kung H.F., Lee-Huang S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 262. P. 615–623.
62. Гулько Л.Б., Огорокова Н.А., Воюшин К.Е., Дьяков Н.А., Честухина Г.Г., Вейко В.П., Дебабов В.Г. // *Биотехнология*. 2000. Т. 3. С. 3–8.
63. Widmer F., Bayne S., Hauen G., Moss B.A., Rigby R.D., Whittaker R.G., Johansen J.T. // *Peptides 1984 / Ed. U. Ragnasson. Stockholm: Almqvist and Wiksell, 1985. P. 193.*
64. Cerovsky V. // *Tetrahedron Lett.* 1991. V. 32. P. 3421–3424.
65. Haensler M., Wissmann H.-D., Wehofsky N. // *J. Peptide Sci.* 2000. V. 6. P. 366–371.
66. Haensler M., Wehofsky N., Gerisch S., Wissmann H.-D., Jakubke H.-D. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 379. P. 71–74.
67. Haensler M., Jakubke H.-D. // *Enzyme Microb. Technol.* 1998. V. 22. P. 617–620.
68. Haensler M., Ullmann G., Jakubke H.-D. // *J. Peptide Sci.* 1995. V. 1. P. 283–287.
69. Schuster M., Aaviksaar A., Haga M., Ullmann U., Jakubke H.-D. // *Biomed. Biochim. Acta*. 1991. V. 50. P. 84–89.
70. Seetharam R., Acharya A.S. // *J. Cell Biochem.* 1986. V. 30. P. 87–99.
71. Sahni G., Acharya A.S. // *FASEB J.* 1988. V. 2. P. 1767.
72. Sahni G., Cho Y.J., Iyer K.S., Khan S.A., Seetharam R., Acharya A.S. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 5456–5461.
73. Sahni G., Mallia A.K., Acharya A.S. // *Anal. Biochem.* 1991. V. 193. P. 178–185.

74. Schellenberger V., Jakubke H.-D., Zapevalova N.P., Mitin Y.V. // *Biotechnol. Bioeng.* 1991. V. 38. P. 104–108.
75. Sekizaki H., Itoh K., Toyota E., Tanizawa K. // *Chem. Pharm. Bull.* 1996. V. 44. P. 1585–1587.
76. Bordusa F., Ullmann D., Elsner C., Jakubke H.-D. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997. V. 36. P. 2473–2475.
77. Wehofsky N., Bordusa F. // *FEBS Lett.* 1999. V. 443. P. 220–224.
78. Wehofsky N., Wissmann J.-D., Alisch M., Bordusa F. // *Biochem. Biophys. Acta.* 2000. V. 1479. P. 114–122.
79. Wehofsky N., Bordusa F. // *Peptides 2000 / Eds J. Martinez, J.-Al. Fehrentz.* Paris: EDK, 2001. P. 351–352.
80. Cerovsky V., Bordusa F. // *J. Pept. Res.* 2000. V. 55. P. 325–329.

## Glutamyl Endopeptidases: Structure, Function, and Practical Application

E. I. Mil'gotina<sup>#</sup>, T. L. Voyushina, and G. G. Chestukhina

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 315-3738; fax: +7 (095) 315-0501; e-mail: milcha57@hotmail.com

Stepanov Laboratory of Protein Chemistry, Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Pervyi Dorozhnyi pr. 1, Moscow, 113545 Russia

Special features of the structural organization of serine proteases belonging to a new subfamily of glutamyl-specific endopeptidases, which possess an extremely strict substrate specificity, are discussed. Some areas of the practical application of these enzymes are considered. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* enzyme proteolysis, enzymatic synthesis, glutamyl endopeptidases, substrate specificity