

УДК 577.151.4

Глутамилэндопептидазы: загадка субстратной специфичности

И. В. Демидюк*, К. Н. Чухонцева, С. В. Костров

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2

*E-mail: duk@img.ras.ru

Поступила в редакцию 02.11.2016

Принята к печати 22.02.2017

РЕФЕРАТ Глутамилэндопептидазы (ГЭПазы) – ферменты, относящиеся к структурной группе химотрипсина и предпочтительно гидролизующие связи α -карбоксильных групп глутаминовой кислоты. Несмотря на многолетнюю историю исследований, структурные детерминанты, определяющие строгую субстратную специфичность ГЭПаз, остаются невыясненными. В обзоре обобщены данные о молекулярных механизмах, лежащих в основе субстратных предпочтений ГЭПаз, а также кратко рассмотрены современные направления изучения этих ферментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глутамилэндопептидаза, протеаза V8, субстратная специфичность, химотрипсиноподобная протеаза, 3С-подобная сериновая протеаза, эпидермолитический токсин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГЭПаза – глутамилэндопептидаза; ХПП – химотрипсиноподобная протеаза; 3Сpro – 3С протеаза пикорнавируса; 3CLpro – 3С-подобная протеаза; 3CLSP – 3С-подобная сериновая протеаза; BIGEP – ГЭПаза *Bacillus intermedius*; Вос-ААРЕ – *mpem*-бутилоксикарбонил-Ala-Ala-Pro-Glu; EAV-Nsp4 – неструктурный белок 4 вируса инфекционного артериита лошадей; Esp – внеклеточная сериновая протеаза *Staphylococcus epidermidis*; ET – эпидермолитический токсин; ETA и ETB – эпидермолитические токсины А и В *Staphylococcus aureus*; Glu-SGP – ГЭПаза *Streptomyces griseus*; Glu/Gln-P1 – аминокислотный остаток в положении P1 субстрата; Glu-V8 – протеаза V8 *S. aureus*; HAsV-pro – протеаза астровируса человека; PDB ID – номер доступа в Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>); PRRSV-Nsp4 – неструктурный белок 4 вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней; SeMV-pro – протеаза вируса мозаики себани.

ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ – ЧЛЕНЫ СТРУКТУРНОГО СЕМЕЙСТВА ХИМОТРИПСИНА

Глутамилэндопептидазы (ГЭПазы) – ферменты, предпочтительно гидролизующие связи α -карбоксильных групп глутаминовой кислоты [1, 2]. К настоящему времени охарактеризованы ГЭПазы целого ряда грамположительных бактерий [3–22], а также (+)РНК-вирусов [23–25]. Все ГЭПазы входят в структурное семейство химотрипсина – одно из самых обширных и хорошо изученных. Молекулы химотрипсиноподобных протеаз (ХПП) имеют общий принцип пространственной организации, так называемый химотрипсиновый (или трипсиновый) фолд (рис. 1). Ключевым для определения места гидролиза субстрата ХПП является остаток в положении P1 (по номенклатуре Шехтера и Бергера: расщепляемая связь субстрата находится после остатка P1, которому соответствует S1-связывающий сайт фермента [26]). Традиционно, как и в случае панкреатических сериновых протеаз, ХПП, исходя из первичной субстратной специфичности, делят на три основные группы: 1) гидролизующие связи, образованные α -карбоксильными группами крупных гидрофобных

аминокислотных остатков (химотрипсиноподобная специфичность); 2) расщепляющие связи после положительно заряженных остатков (трипсиноподобная специфичность) и 3) предпочитающие малые гидрофобные остатки в положении P1 (эластазоподобная специфичность) [27]. Кроме того, обнаружены ХПП со специфичностью смешанного типа. Например, коллагенолитические ферменты крабов сочетают специфичность трипсина, химотрипсина и эластазы [28], а дуоденаза крупного рогатого скота [29] и катепсин G [30] способны эффективно гидролизовать субстраты как трипсина, так и химотрипсина. Известны ХПП, расщепляющие связи преимущественно после остатка Gln, например, многие 3С-подобные протеазы вирусов [23], а также специфичные к отрицательно заряженным аминокислотным остаткам – гранзим В, предпочтительно гидролизующий связи после остатков Asp [31], и ГЭПазы, которым посвящен данный обзор.

Молекулы ХПП состоят из двух перпендикулярных β -цилиндрических доменов и С-концевой α -спирали (рис. 1). Каталитический и субстратсвязывающий сайты находятся в щели между дву-

мя β -цилиндрами. Функционально существенные остатки локализованы преимущественно в петлях, соединяющих β -тяжи. S1-карман, расположенный рядом с каталитическим остатком Ser(Cys)195 (здесь и далее нумерация по химотрипсину), сформирован участками 189–192, 214–216 и 224–228. В большинстве случаев ключевыми детерминантами субстратной специфичности являются остатки в позициях 189, 216 и 226 [32, 33]. Причем у ферментов, узнающих заряженные остатки в положении P1, в позиции 189 (Asp у трипсина [34]) или 226 (Arg у гранзима В [35], Glu у катепсина G [36], Asp у коллагеназы краба [37] и дуоденазы [38]) находятся остатки-компенсаторы заряда субстрата. Это позволяет полагать, что первичная субстратная специфичность ХПП контролируется относительно небольшим числом структурных элементов сайта S1. Однако простой перенос этих структурных элементов из одной молекулы в другую не приводит к «переключению» субстратной специфичности.

Как показано на примере конверсии трипсина в химотрипсин, на специфичность влияет также целый набор удаленных структурных элементов, не взаимодействующих с субстратом непосредственно. Сайты S1 обоих ферментов сходны. Однако замена главной детерминанты связывания заряженных субстратов трипсина Asp189 на Ser, характерный для химотрипсина, не приводит к возникновению соответствующей специфичности. Вместо этого формируется низкоэффективная неспецифичная протеаза [39]. Создание химотрипсиноподобной специфичности требует замены четырех остатков в S1-кармане вместе с модификацией удаленных от S1-сайта областей: двух поверхностных петель, которые не контактируют с субстратом непосредственно [40], и остатка Tyr172 [41]. Сравнение кристаллических структур и кинетических характеристик полученных вариантов со структурами и каталитическими свойствами химотрипсина и трипсина показывает, что дополнительные модификации существенны не для связывания собственно остатка P1, а для точного позиционирования расщепляемой связи относительно каталитического центра белка: пары Ser195–His57 и оксианионной впадины [40–43].

Таким образом, основываясь на данных о структурных детерминантах субстратной специфичности ХПП, можно ожидать, что предпочтительный выбор ГЭПазами отрицательно заряженных аминокислотных остатков в положении P1 определяется теми же участками полипептидной цепи, что и у других ферментов группы. Причем ключевой структурной детерминантой специфичности, как у всех распознающих заряженные P1-остатки ХПП, должен быть локализованный в S1-кармане компенсатор заряда субстрата.

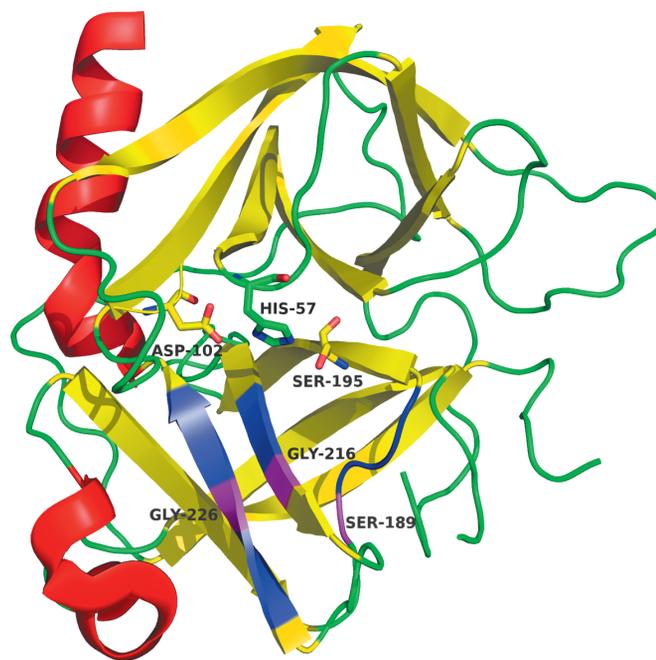


Рис. 1. Пространственная структура химотрипсина (PDB ID – 5cha). Показана структура остатков каталитической триады. Области, формирующие S1-карман, выделены синим цветом; позиции, соответствующие ключевым остаткам S1-кармана, – сиреневым. Все рисунки, содержащие изображения пространственных структур белков, построены с помощью PyMOL Molecular Graphics System (www.pymol.org)

В качестве кандидата на эту роль по аналогии можно предложить остаток Arg или Lys в положении 189 или 226. В то же время следует помнить, что для высокоэффективного взаимодействия с P1-остатком существенно структура регионов, удаленных от S1.

ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗА *STREPTOMYCES GRISEUS*

Первой ГЭПазой, пространственная структура которой была установлена, стала Glu-специфичная протеаза *S. griseus* (Glu-SGP) (PDB ID – 1hpg) [44]. Структура этого фермента в целом типична для ХПП (рис. 2А) и имеет наибольшее сходство с бактериальными ХПП (протеазами А и В из *Str. griseus* и α -литической протеазой). Общая геометрия области S1 также очень близка к геометрии этой области у перечисленных бактериальных ферментов. Вопреки ожиданиям, в структуре S1-сайта не удалось обнаружить явного компенсатора отрицательного заряда субстрата – остатка Lys или Arg. Карбоксильная группа Glu в положении P1 субстрата формирует водородные связи с Ser190 (192 в нумерации [44]), Ser216 и His213. Таким образом, эти остат-

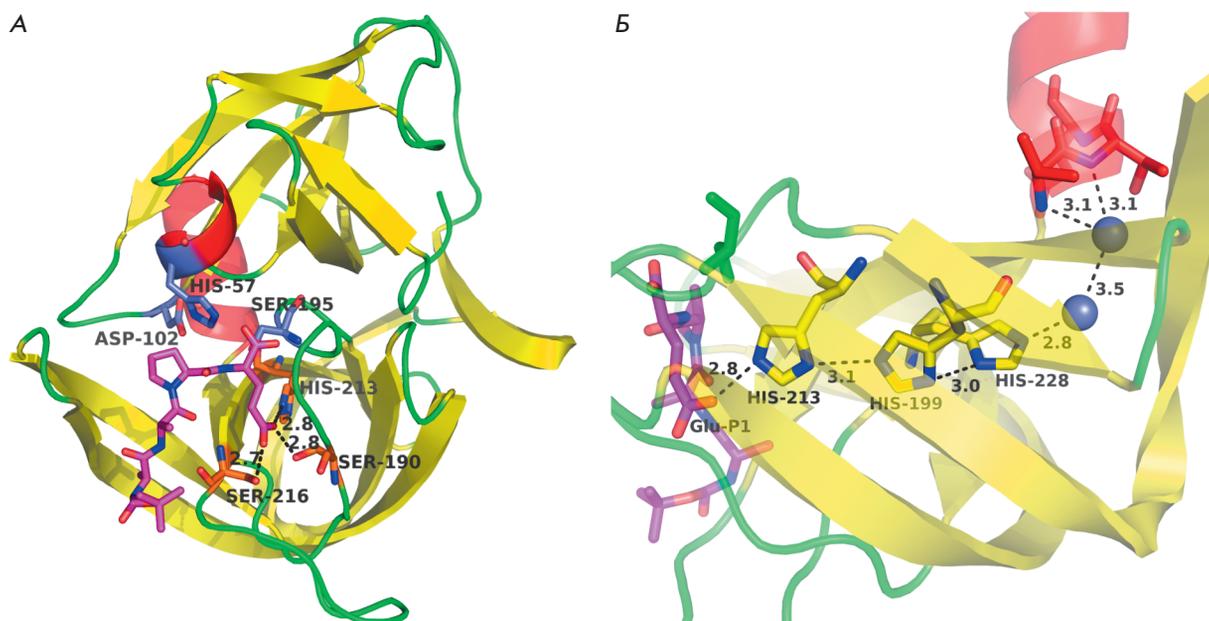


Рис. 2. Пространственная структура глутамилэндопептидазы *Streptomyces griseus* (1hpg). А – общий вид. Б – гистидиновая триада. Фиолетовым цветом выделен лиганд Вос-AAPE (защитная группа не показана); остатки каталитической триады – синим; остатки, непосредственно взаимодействующие с карбоксильной группой Glu-P1, – оранжевым; гистидиновая триада – желтым. Молекулы воды представлены синими сферами. Расстояния приведены в ангстремах

ки, вероятно, играют ключевую роль в узнавании субстрата. Боковая цепь гистидина способна нести положительный заряд. Однако, если считать, что pK_a бокового радикала His213 в отсутствие субстрата равна 6.4, то при pH 8.5, оптимальном для функционирования Glu-SGP, имидазольное кольцо будет протонировано менее чем на 1%, и, следовательно, гистидин должен быть нейтральным [44]. В то же время значение pK_a аминокислотных остатков в белке может существенно варьировать в зависимости от окружения [45].

Анализ структуры Glu-SGP выявил в ней так называемую гистидиновую триаду, в состав которой, кроме His213, входят His199 и His228. Три остатка His пронизывают С-концевой β -цилиндрический домен, формируя цепь водородных связей, соединяющую карбоксильную группу Glu-P1 субстрата и, через связанные с ферментом две молекулы воды, N-концевой обвод С-концевой α -спирали молекулы (рис. 2Б). Постулировалось, что именно эта структура обеспечивает перенос положительного заряда, компенсирующего заряд субстрата, с микрополя α -спирали на His213 субстратсвязывающей области [44]. Отметим, что у глутамилэндопептидаз остатки гистидиновой триады не консервативны [46] и, кроме Glu-SGP, обнаружены лишь у высокомолекулярного фермента из *Str. fradiae* [13].

Роль остатков, формирующих S1-карман и гистидиновую триаду Glu-SGP, была изучена с помощью сайт-направленного мутагенеза. Любые модификации Ser190(192) (Ala/Gly/Asn/Thr/Val) и His213 (Ala/Gly/Lys/Asn/Arg/Ser/Val) приводят к прекращению автокаталитического процессинга (по связи Glu(-1)-Val1) предшественника ГЭПазы, что доказывает принципиальную роль этих остатков в формировании S1-сайта. В то же время Ser216, по-видимому, менее важен, так как его замена на Ala или Gly не приводит к потере ферментом соответствующей активности. Похожий результат наблюдается и при некоторых модификациях остатков гистидиновой триады: мутации His199→Val и His228→Ala/Asp/Asn/Ser/Val не препятствуют процессингу фермента. Все мутантные белки (His199→Val, Ser216→Ala, Ser216→Gly и His228→Ala), специфичность которых была исследована, сохраняли предпочтение к субстратам с Glu-P1 [47]. Итак, гипотеза о важности гистидиновой триады для компенсации заряда не была подтверждена экспериментально, и на ключевые роли в распознавании субстрата вышли остатки Ser190(192) и His213.

Таким образом, с одной стороны, известна структура S1-сайта. С другой стороны, неясно, каким образом формирующие этот сайт элементы могут обеспечивать наблюдаемую субстратную специфич-

ность. Это противоречие становится еще более явным при рассмотрении данных о структуре и специфичности вирусных 3С-подобных сериновых протеаз.

ВИРУСНЫЕ 3С-ПОДОБНЫЕ СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕАЗЫ

Процессинг полибелков-предшественников является важной частью жизненного цикла большинства (+)РНК-вирусов [48–50] и обычно осуществляется при участии вирусных папаиноподобных или химо-трипсиноподобных протеаз, которые входят в состав полибелка [51]. Большинство ХПП (+)РНК-вирусов это цистеиновые протеазы, например, 3С протеазы (3Сpro) пикорнавирусов или 3С-подобные протеазы (3СLpro) корона-, поти- или комовирусов [49]. В то же время обнаружены ферменты, активные центры которых содержат каталитический остаток серина. Такие белки обозначаются как 3С-подобные сериновые протеазы (3СLSP) [23]. ХПП (+)РНК-вирусов проявляют узкую субстратную специфичность. Сайты гидролиза 3С и 3С-подобных протеаз в целом похожи и обычно содержат остаток Gln или Glu в позиции P1 в сочетании с расположенным за ним небольшим аминокислотным остатком (Gly, Ala или Ser) [23, 52]. При этом одни протеазы гидролизуют связи, образованные как Gln, так и Glu [53–57]. Другие ферменты предпочитают Gln-P1 (например, 3Сpro и 3СLpro пикорна- и коронавируса [23, 48]) или являются истинными ГЭПазами, расщепляющими полипептидную цепь после Glu. Такую специфичность проявляют ХПП артери- [23], собемо- [25] и астровирусов [24].

ГЭПазы артеривирусов, обозначаемые как Nsp4 (неструктурный белок 4) [23], являются сериновыми протеазами [58, 59]. К настоящему времени изучены свойства и установлены пространственные структуры Nsp4 вируса артериита лошадей (EAV) и вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV). Пространственная структура EAV-Nsp4 в целом типична для ХПП (PDB ID – 1mbm). В то же время каталитический домен фермента, сформированный двумя перпендикулярными β-цилиндрами, дополнен С-концевым расширением (рис. 3А) [60]. Структура PRRSV-Nsp4 (PDB ID – 3fan) сходна со структурой EAV-Nsp4, заметно отличаясь, однако, взаимным расположением каталитического и С-концевого доменов (рис. 3Б) [59].

Организация S1-участков EAV-Nsp4 и Glu-SGP очень близка (рис. 4А). Карман S1 содержит те же три основных структурных элемента: His213 (134 в EAV-Nsp4, 1198 в полибелке), Thr190 (115, 1179), соответствующий Ser190 у Glu-SGP, и Ser216 (137, 1201) [60]. Все три остатка сохранены и в первичной структуре PRRSV-Nsp4 [58, 59]. Однако, судя по результатам рентгеноструктурного анализа, S1-сайт последнего

фермента имеет иную, чем у EAV-Nsp4 и Glu-SGP, структуру (рис. 4Б). Положение участка полипептидной цепи 190–194 (113–117 в PRRSV-Nsp4) изменено по сравнению с большинством ХПП, что приводит к нетипичной конфигурации оксианионной впадины и существенному удалению Thr190 (113) от карбоксильной группы Glu-P1. Кроме того, методом рентгеноструктурного анализа не удается определить положение содержащей Ser216 петли 216–220 (136–140), что свидетельствует о высокой подвижности этого участка. Расположение наиболее консервативного остатка S1-участка – His213 (133) в трех упомянутых белках не отличается [59]. Возможно, наблюдаемая картина не отражает состояние PRRSV-Nsp4 в растворе, а представляет артефакт кристаллизации свободного фермента.

Важность остатков His213 и Thr190 для функционирования EAV-Nsp4 подтверждена экспериментально по сайт-направленному мутагенезу. Путем модификации остатков каталитической триады показано, что процессинг полибелка с расщеплением связей после остатков Glu зависит от активности EAV-Nsp4. К полному прекращению процессинга приводили и модификации His213(1198)→Lys/Arg/Tyr. Тот же эффект вызывала замена Thr190(1179)→Asp, однако мутации Thr190(1179)→Ser/Gly лишь несколько снижали эффективность процессинга [58]. В совокупности с данными, полученными на модели Glu-SGP, эти результаты показывают принципиальное значение His213 и существенно меньшую важность остатков в позициях 190 и 216 для гидролиза специфических субстратов ГЭПазами. В то же время остается неясным, является ли His213 ключевым элементом в распознавании заряженного субстрата, а также какой вклад в формирование субстратной специфичности вносят Thr/Ser190 и Ser216. Помочь разобраться с некоторыми из этих вопросов может анализ структур других вирусных ГЭПаз.

Протеаза вируса мозаики себании (SeMV-pro) имеет типичную для ХПП пространственную структуру (PDB ID – 1zyo), которая ближе к структурам клеточных (в частности, Glu-SGP), а не вирусных представителей семейства (рис. 3В) [61]. Протеаза имеет классическую каталитическую триаду, модификация остатков которой приводит к прекращению процессинга полибелка [62]. В структуре S1-участка фермента сохранены, как и у всех ГЭПаз, консервативные остатки His213(298) и Thr190(279). Однако позицию 216(301) занимает крупный гидрофобный остаток Phe (рис. 4Б). Наложение пространственных структур SeMV-pro и Glu-SGP в комплексе с тетрапептидным продуктом протеолиза *трет*-бутилоксикарбонил-Ala-Ala-Pro-Glu (Вос-ААРЕ) показывает, что боковой радикал остатка

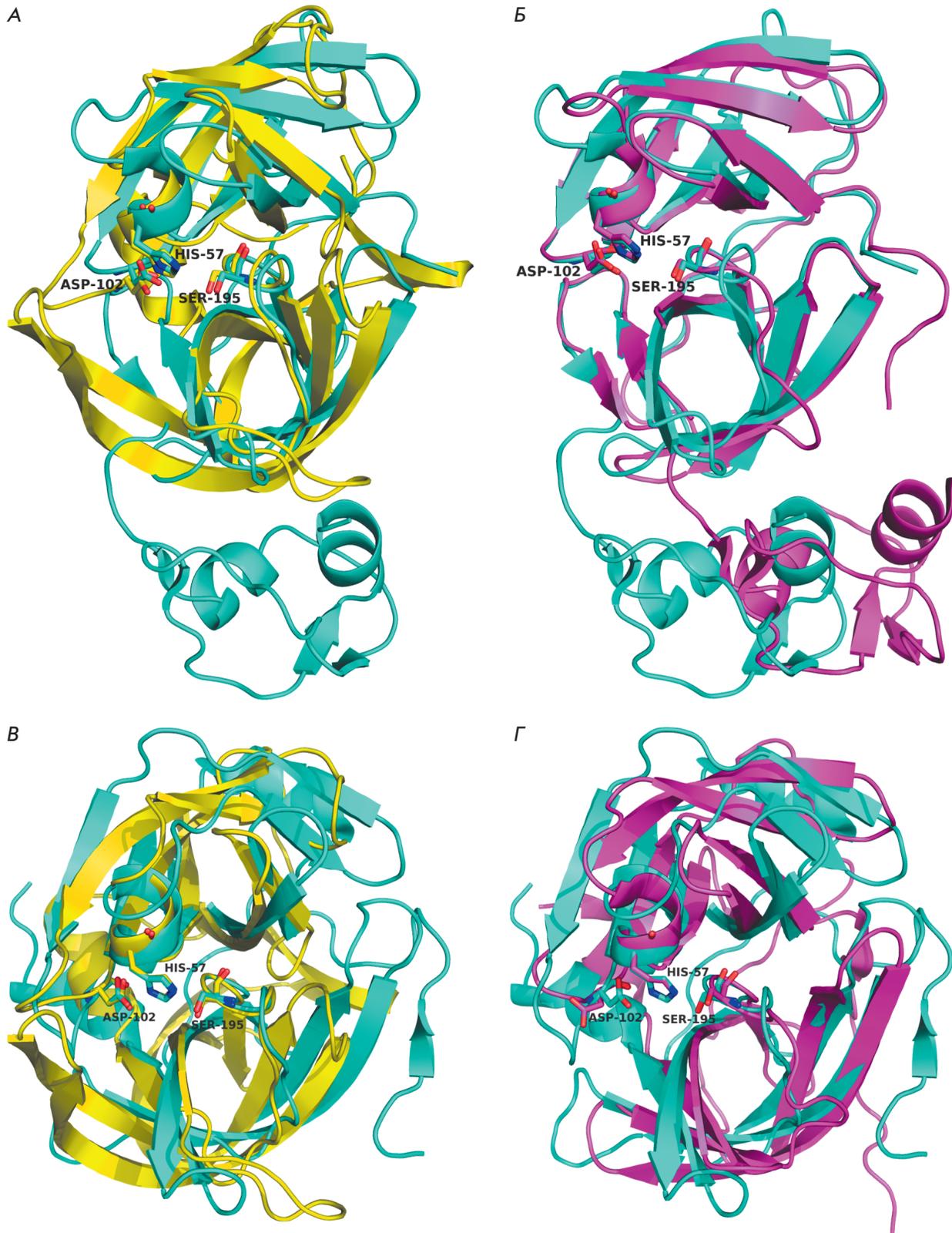


Рис. 3. Пространственные структуры вирусных глутамилэндопептидаз. А – EAV-Nsp4 (PDB ID – 1mbm; голубой) и Glu-SGP (1hrp; желтый). Б – EAV-Nsp4 (голубой) и PRRSV-Nsp4 (3fan; сиреневый). В – Glu-SGP (желтый) и SeMV-pro (1zyo; голубой). Г – SeMV-pro (голубой) и HAsV-pro (2w5e; сиреневый). Обозначены остатки каталитической триады

Glu-P1 хорошо вписывается в S1-карман вирусной протеазы. Сохранение объема S1-кармана при наличии остатка с крупным боковым радикалом требует существенного смещения основной цепи белка на участке 214(299)–223(308) и заполнения образовавшегося в результате этого смещения пространства боковой цепью остатка Asn223(308), который участвует в формировании дна S1-кармана, но, по-видимому, с Glu-P1 непосредственно не взаимодействует (рис. 4B). Эта ситуация показывает, что Ser в положении 216 и водородная связь остатка 216 с γ -карбоксильной группой Glu-P1 не принципиальны для обеспечения глутаматной специфичности. К сожалению, экспериментов по модификации Phe216(301) в составе SeMV-pro не проводилось. В то же время замены His213(298) и Thr190(279) на Ala, но не мутация Asn223(308)→Ala, полностью подавляют процессинг *in cis* слитого белка SeMV-pro/VPg (VPg – вирусный белок, который находится в полибелке за SeMV-pro) в модельной системе [61].

Субстратная специфичность протеазы астровируса человека (HAstV-pro) мало изучена. Данные о сайтах процессинга вирусного полибелка, осуществляемого этим ферментом, противоречивы [63]. Вместе с тем, с использованием рекомбинантного фермента и набора синтетических субстратов *in vitro* показано, что HAstV-pro гидролизует только связи, образованные α -карбоксильными группами Glu и Asp [24]. Пространственная структура HAstV-pro (PDB ID – 2w5e) в целом близка к структуре SeMV-pro (рис. 3Г), но имеет ряд специфических особенностей. Так, остаток Asp102 (489 в полибелке) каталитической триады, в которую входят также Ser195(551) и His57(461), имеет неканоническую конформацию [24].

Структура участка S1 также заметно отличается от рассмотренных выше. Несмотря на то что остаток His213 и его положение инвариантны, в позиции 216 вместо Ser находится Asn216(569), амидная группа которого, как показывает наложение структур HAstV-pro и Glu-SGP в комплексе с лигандом, практически занимает место γ -карбоксильной группы субстрата Glu-P1 (рис. 4Г). Это приводит к существенному уменьшению кармана S1 [24], объем которого не соответствует боковому радикалу Glu. Кроме того, конформация участка 189–193 (545–549) основной цепи иная, чем у большинства ХПП. Как следствие, консервативный остаток Thr190 удален от S1-сайта и развернут в сторону. (Положение участка 189–193 напоминает конфигурацию этого региона в PRRSV-Nsp4.) Учитывая описанные отличия от структур других ГЭПаз и ХПП, сложно сделать какие-либо определенные выводы о взаимодействиях HAstV-pro с остатком P1 субстрата.

Обобщая данные о вирусных ГЭПазах и Glu-SGP, можно заключить, что His213 является общим элементом S1-кармана, а его модификация во всех случаях приводит к инактивации ферментов. Этот остаток способен нести положительный заряд и поэтому представляется кандидатом на роль ключевого структурного элемента, определяющего субстратные предпочтения Glu-специфичных протеаз. Остаток Thr/Ser190 также консервативен у всех ГЭПаз, однако его модификация не приводит к потере ферментами специфической активности, и, вероятно, он не играет принципиальной роли в распознавании остатка Glu-P1 субстрата. Наконец, природа остатка 216 несущественна для обеспечения субстратной специфичности. Как следствие, в этой позиции у ГЭПаз обнаружены остатки, сильно отличающиеся по свойствам: Ser, Asn и Phe. Дополнительную информацию о структурных детерминантах субстратной специфичности ГЭПаз может дать анализ вирусных ЗС и ЗС-подобных протеаз, проявляющих специфичность к Gln в положении P1.

Сравнение первичных и пространственных структур ГЭПаз и ЗС/ЗСLpro выявляет сходство их S1-участков (рис. 4Д,Е). Во-первых, все ЗС/ЗСLpro, так же как и ГЭПазы, содержат консервативный остаток His213 [64–76], модификации которого приводят к инактивации ферментов [77–79]. Это позволяет заключить, что данный остаток не является ключевым элементом распознавания заряда субстрата, но принципиален для обеспечения корректной геометрии S1-сайта. Во-вторых, большинство ЗС/ЗСLpro сохраняют характерный для ГЭПаз остаток Thr/Ser190 [58], что подтверждает вывод о его важности для формирования правильной геометрии S1-кармана, а не для распознавания заряда. На месте третьего элемента S1-участка ГЭПаз, в положении 216, у ЗС/ЗСLpro, как правило, находятся остатки Gly (рис. 4Е) и иногда Ala (рис. 4Д), которые не встречаются у известных ГЭПаз. Последнее стало основанием для рассуждений об участии Ser216 в компенсации заряда субстрата у ГЭПаз [60]. Однако мутагенез на модели Glu-SGP показывает, что замены Ser216→Ala/Gly не делают субстраты с Gln-P1 предпочтительными, хотя и увеличивают эффективность их гидролиза [47]. Кроме того, обсуждавшиеся данные о ГЭПазах с остатками Phe/Asn216 также не свидетельствуют в пользу подобных предположений. Следует упомянуть еще об одной гипотезе, которая до сих пор остается непроверенной. Поскольку все ГЭПазы являются сериновыми, а Gln-специфичные ферменты – цистеиновыми протеазами, можно предположить, что различие в их субстратной специфичности определяется каталитическими остатками.

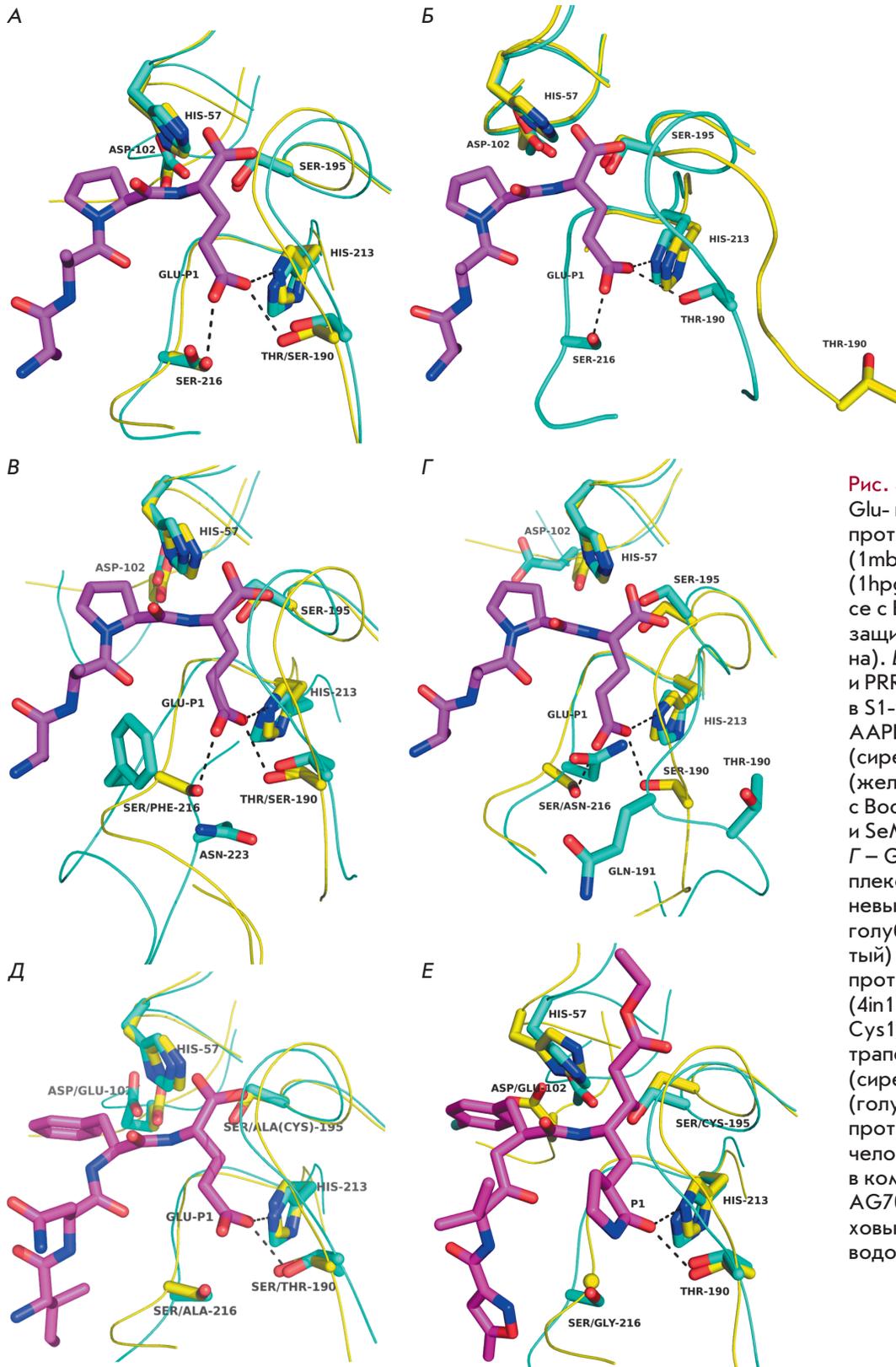


Рис. 4. S1-участки вирусных Glu- и Gln-специфичных протеаз. **А** – EAV-Nsp4 (1mbm; голубой) и Glu-SGP (1hpq; желтый) в комплексе с Voc-AAPE (сиреневый, защитная группа не показана). **Б** – EAV-Nsp4 (голубой) и PRRSV-Nsp4 (3fan; желтый), в S1-участок вписан Voc-AAPE из структуры Glu-SGP (сиреневый). **В** – Glu-SGP (желтый) в комплексе с Voc-AAPE (сиреневый) и SeMV-pro (1zuq; голубой). **Г** – Glu-SGP (желтый) в комплексе с Voc-AAPE (сиреневый) и HAsV-pro (2w5e; голубой). **Д** – Glu-SGP (желтый) и Gln/Glu-специфичная протеаза вируса Норуолк (4in1; голубой) с заменой Cys195→Ala в комплексе с тетрапептидом Ile-Asn-Phe-Glu (сиреневый). **Е** – EAV-Nsp4 (голубой) и Gln-специфичная протеаза 3С риновируса человека (1сqq, желтый) в комплексе с ингибитором AG7088 (сиреневый). Штриховые линии обозначают водородные связи

Итак, ни один из обнаруженных консервативных структурных элементов S1 участка Glu-SGP и вирусных 3CLSP, по-видимому, не определяет предпочтения этих ферментов к остатку Glu в положении P1 субстрата. Следовательно, такая специфичность ГЭПаз вирусов и стрептомицетов обеспечивается структурными детерминантами, не находящимися непосредственно в субстратсвязывающей области. Однако традиционный путь исследований, сочетающий анализ пространственных структур, сайт-направленный мутагенез и изучение каталитических свойств ферментов, до настоящего времени не позволил выявить эти детерминанты. Более успешными кажутся исследования ГЭПаз бактерий.

ЭПИДЕРМОЛИТИЧЕСКИЕ ТОКСИНЫ СТАФИЛОКОККОВ

Стафилококки продуцируют два типа ГЭПаз: ферменты, сходные с протеазой V8 *Staphylococcus aureus* (Glu-V8), о которых пойдет речь в следующем разделе, и эпидермолитические токсины (ЕТ). ЕТ являются основными факторами вирулентности, отвечающими за развитие буллезного импетиго и его генерализованной формы – стафилококкового синдрома ошпаренной кожи, а также сходных заболе-

ваний животных [80, 81]. Биологическая активность ЕТ связана с их способностью с высокой специфичностью гидролизовать связь Glu381-Gly в десмоглине 1 – десмосомальном белке кадгенинового типа, обеспечивающем межклеточные взаимодействия (более подробно см. обзор [80]). Кроме того, *in vitro* ЕТ расщепляют эфирные связи, образованные карбоксильными группами остатков Glu [82].

Пространственные структуры эпидермолитических токсинов А [83, 84] и В [85] из *S. aureus* указывают на принадлежность ЕТ к ХПП (рис. 5). В то же время эти белки обладают уникальными особенностями. Первая из них – N-концевая α -спираль. Вторая – необычное положение остатков, формирующих оксианионную впадину: пептидная связь Pro/Val192-Gly193 (нумерация по химотрипсину) развернута на 180° по сравнению с другими ХПП. Это приводит к формированию водородной связи между карбонильным кислородом остатка 192 и гидроксильной группой каталитического Ser195, что, по-видимому, препятствует проявлению активности. На основе анализа структур высказано предположение, что связывание ЕТ с субстратом (или рецептором), в которое вовлечена N-концевая α -спираль, приводит к перестройке активного центра и активации ферментов [83].

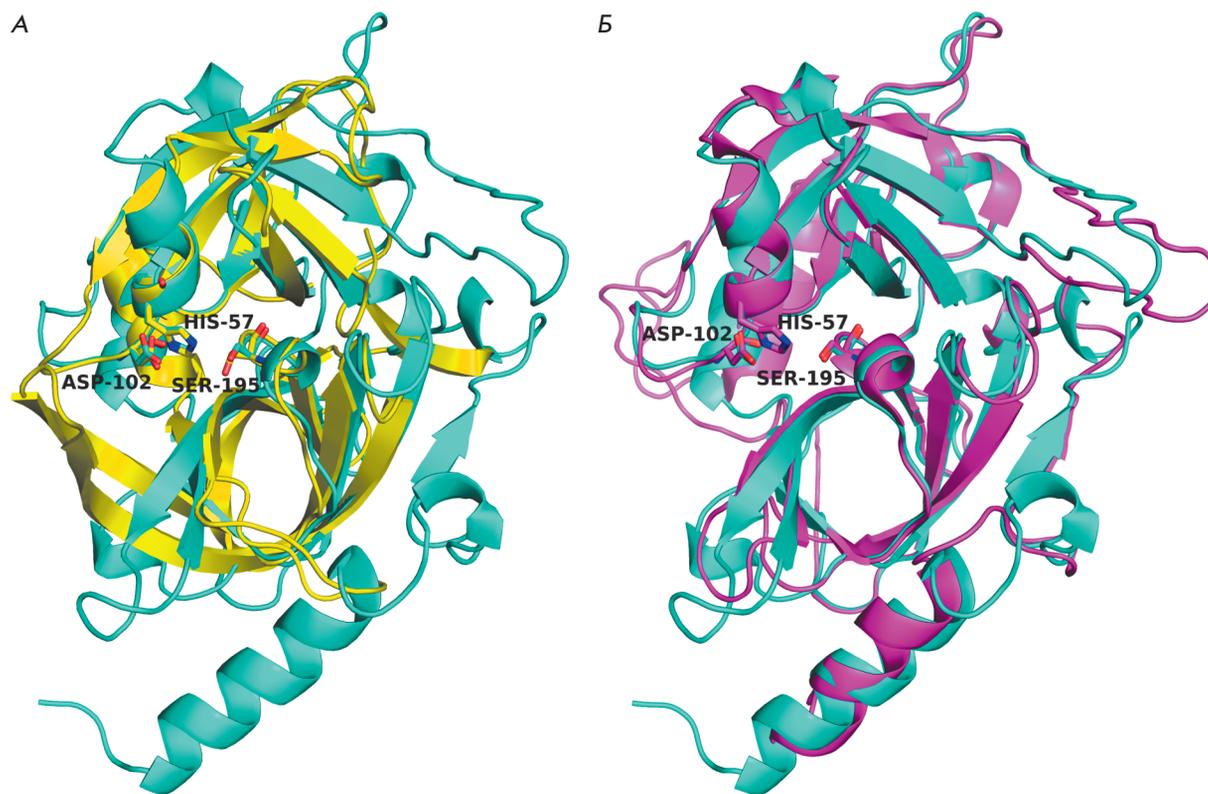


Рис. 5. Пространственные структуры эпидермолитических токсинов *S. aureus*. А – ЕТА (1agj; голубой) и Glu-SGP (1hrj; желтый). Б – ЕТА (голубой) и ЕТВ (1qtf; сиреневый). Обозначены остатки каталитической триады

Как у всех обсуждавшихся выше ГЭПаз, S1-карманы ET содержат три ключевых элемента, два из которых – консервативные остатки His213 и Thr190 (рис. 6). Третьим, как предсказано ранее на основе моделирования пространственных структур [46], является идеально подходящий на роль компенсатора отрицательного заряда Glu-P1 остаток Lys в позиции 216, где у других ГЭПаз обычно находится Ser. Остаток Lys консервативен у большинства ET *S. aureus* и *S. hyicus*, а у ExhA (ET из *S. hyicus*) в положении 216 обнаружен Arg [86, 87]. Важность Lys216 для гидролиза субстратов с остатком Glu подтверждена экспериментами по сайт-направленному мутагенезу, выполненными на модели ETA [88]. Любая из замен Lys216→Ala/Glu/Thr аналогично мутациям по остаткам каталитической триады приводила к потере белком способности гидролизовать α-фениловый эфир N-Вос-L-глутаминовой кислоты и утрате эпидермолитической активности.

Итак, в случае ET положительно заряженный остаток, вероятный компенсатор заряда субстрата, удастся обнаружить непосредственно в S1-участке, причем в положении 216, важном для распознавания субстрата всеми ХПП. Этот компенсатор принципиален для проявления ET ферментативной активности. В то же время прямые доказательства того, что Lys/Arg216 у ET отвечает за глутаматную специфич-

ность, в настоящее время отсутствуют. При этом S1-сайты ET, за исключением Lys216, очень похожи на соответствующие области ГЭПаз вирусов и стрептомицетов (рис. 6). Однако приведенные выше данные указывают на то, что остаток в положении 216 не существен для обеспечения субстратной специфичности этих ферментов. Тогда следует заключить, что разные группы ГЭПаз имеют разные механизмы распознавания субстрата. У ET ключевым является стандартный компенсатор заряда в S1-кармане, у ферментов вирусов и стрептомицетов – какой-то другой удаленный структурный элемент. Такой вывод подкрепляется данными, полученными для других бактериальных ГЭПаз.

ДРУГИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ

Кроме ГЭПаз стрептомицетов и ET охарактеризован целый ряд протеаз, секретируемых грамположительными бактериями и обладающих общими структурными особенностями. Проведенное на ранних этапах изучения ГЭПаз моделирование пространственных структур относящихся к этой группе Glu-V8, ГЭПаз *Bacillus licheniformis* и *B. subtilis* привело к предположению, что компенсацию заряда субстрата у всех трех белков обеспечивает α-аминогруппа остатка в положении 1 зрелого фер-

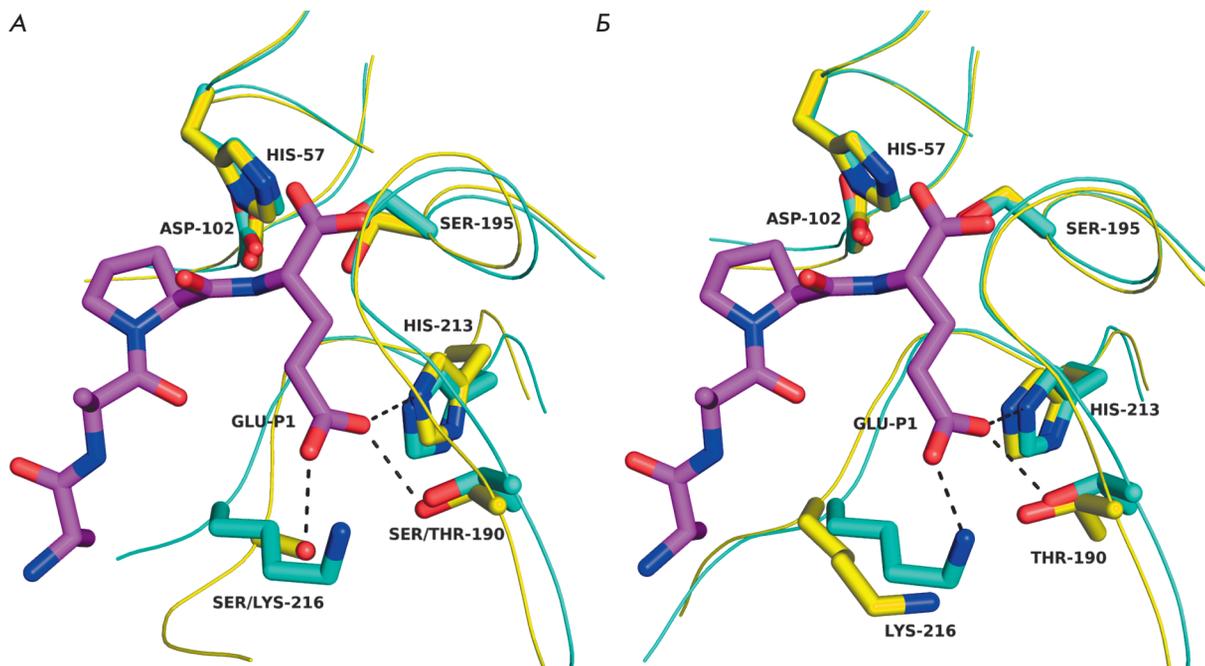


Рис. 6. S1-участки эпидермолитических токсинов *S. aureus*. А – ETA (1agj; голубой) и Glu-SGP (1hpg; желтый) в комплексе с Вос-ААРЕ (сиреневый, защитная группа не показана). Б – ETA (голубой) и ETB (1qtf; желтый), в S1-участок вписан лиганд Вос-ААРЕ из структуры Glu-SGP (сиреневый). Штриховые линии обозначают водородные связи

мента [46]. Сегодня локализация N-концевого остатка в S1-участке ГЭПаз этой группы подтверждена экспериментальными данными о третичных структурах ГЭПазы *B. intermedius* (BIGEP) [89], Glu-V8 [90] и внеклеточной сериновой протеазы *S. epidermidis* (Esp) [91].

Обсуждаемые белки обладают высоким структурным сходством между собой, а также с ET стафилококков, и имеют типичное для ХПП строение. Их молекулы состоят из двух β -доменов, разделенных глубокой щелью, в которой расположен активный центр (рис. 7). Участки S1 у Glu-V8, BIGEP и Esp в целом организованы сходно с аналогичными регионами других ГЭПаз и содержат обязательные элементы: His213 и Ser/Thr190 (рис. 8А,Б). В то же время в третьей ключевой позиции S1-кармана находится остаток Gly, что, как обсуждалось выше, является особенностью вирусных Gln-специфичных 3С- и 3СLpro. Однако отсутствие бокового радикала, способного формировать водородную связь с кислородом карбоксильной группы субстрата, у остатка в позиции 216 компенсируется, как и было предсказано, α -аминогруппой Val1, которая занимает место, соответствующее положению ϵ -аминогруппы остатка Lys216 у ET (рис. 8В). Таким образом, в случае Glu-V8, BIGEP и Esp, по-видимому, наблюдается уникальная ситуация, когда специфичность протеазы определяется N-концом полипептидной цепи. Своеобразие такого «конструктивного решения» состоит в том, что Glu-V8, BIGEP и Esp синтезируются клеткой в виде предшественников, включающих, кроме каталитической части, сигнальный пептид и пропептид. Следовательно, N-конец зрелого белка, а значит, и S1-карман формируются только после процессинга. Эта ситуация напоминает механизм активации ХПП млекопитающих: после удаления пропептида N-концевая NH_2 -группа зрелого белка образует солевой мостик с остатком Asp194, что индуцирует структурные перестройки молекулы фермента, приводящие к его активации благодаря формированию корректной структуры S1-участка и оксианионной впадины [92–96].

Направленная модификация остатков S1-участков BIGEP и Glu-V8 дала очень интересные результаты. Прежде всего, был впервые исследован вариант ГЭПазы с модификацией остатка His213. (Подобные мутации вводили и ранее [47, 58], но получить белки не удалось.) Показано, что BIGEP с заменой His213 (186 в BIGEP) на Thr не изменяет субстратных предпочтений и гидролизует белковый субстрат только после остатков Glu. В то же время модификация существенно влияет на эффективность катализа (k_{cat} снижается более чем в 600 раз), но при этом относительно мало сказывается на связывании субстрата

(K_M возрастает примерно в 5 раз) [97]. Интересно, что подобный эффект наблюдается в случае гидролиза нативными ГЭПазами субстратов, содержащих остаток Asp в положении P1: K_M растет примерно в 6 раз, а падение k_{cat} имеет тот же порядок (~150 раз) [98]. Полученные результаты позволяют заключить, что консервативный остаток His213 не является ключевым элементом, определяющим распознавание отрицательного заряда субстрата ГЭПазами, но, по-видимому, существен для точного позиционирования расщепляемой связи относительно нуклеофила – кислорода гидроксильной группы Ser195. Этот вывод хорошо согласуется с тем, что His213 является общим структурным элементом для Glu- и Gln-специфичных протеаз.

Данные о роли N-концевого остатка в функционировании ГЭПаз получены на модели Glu-V8. Показано, что замена N-концевого Val на Leu/Ala/Phe/Gly/Ser приводит к снижению эффективности гидролиза субстратов с остатком Glu в примерно 3, 20, 50, 100 и 200 раз соответственно [9, 99], и чем ближе остаток по своим свойствам к Val, тем меньше снижение активности. Этот результат свидетельствует о важности остатка 1 для функционирования фермента и может быть объяснен различным отклонением положения α -аминогруппы этого остатка у мутантов от оптимального. Кроме того, удалось получить варианты Glu-V8 с дополнительными аминокислотными остатками, фрагментами пропептида, на N-конце. Введение дополнительных остатков (от 1 до 39) во всех случаях приводило к значительному падению активности фермента при гидролизе субстратов с Glu-P1 [9, 100], но в меньшей степени влияло на эффективность гидролиза аналогичных субстратов с Gln-P1. При этом мутанты сохраняли предпочтение к субстратам с Glu-P1, которые они гидролизировали примерно в 10–20 раз эффективнее [100]. Таким образом, вероятно, α -аминогруппа N-концевого остатка Val вносит очень существенный вклад в узнавание заряженного субстрата обсуждаемыми бактериальными ГЭПазами, но не определяет специфичность ферментов полностью.

Обобщая всю имеющуюся информацию о ГЭПаз, можно сделать вывод о различиях в механизмах распознавания заряженного субстрата ферментами разных групп. Вероятно, это свидетельствует о том, что на эволюционном древе ХПП ветви ГЭПаз возникали несколько раз, возможно, на основе базовой структуры S1-кармана, одинаково хорошо подходящей для реализации как глутаматной, так и глутаминовой специфичности, и наиболее близкой, по-видимому, к структуре S1-областей вирусных ферментов. Необходимость реализации нескольких структурных вариантов оптимизации специфично-

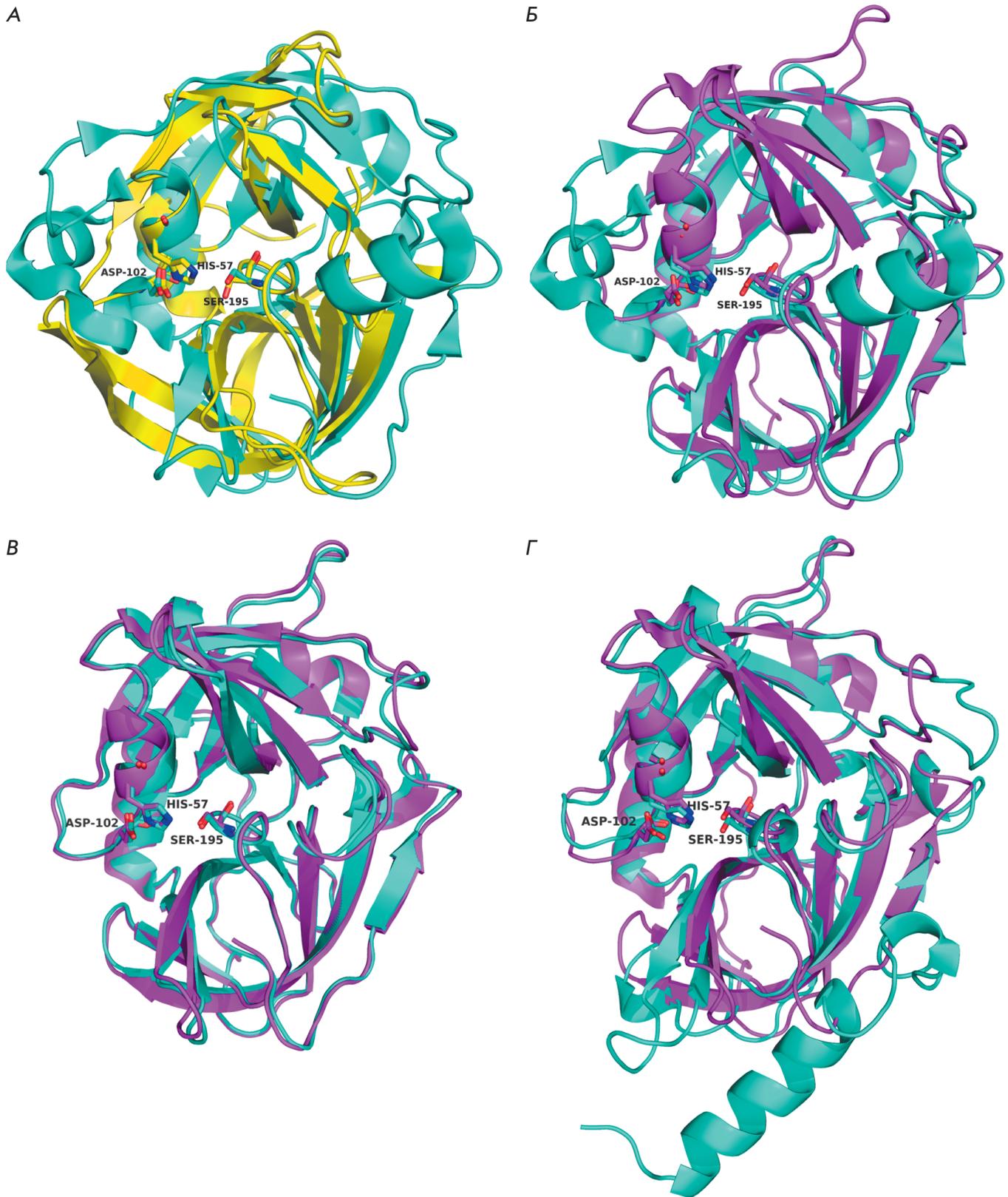


Рис. 7. Пространственные структуры бактериальных глутамилэндопептидаз. А – BIGEP (1p3c; голубой) и Glu-SGP (1hpg; желтый). Б – BIGEP (голубой) и Glu-V8 (1qy6; сиреневый). В – Glu-V8 (сиреневый) и Esp (4jcn; голубой). Г – Glu-V8 (сиреневый) и ETA *S. aureus* (1agj; голубой). Обозначены остатки каталитической триады

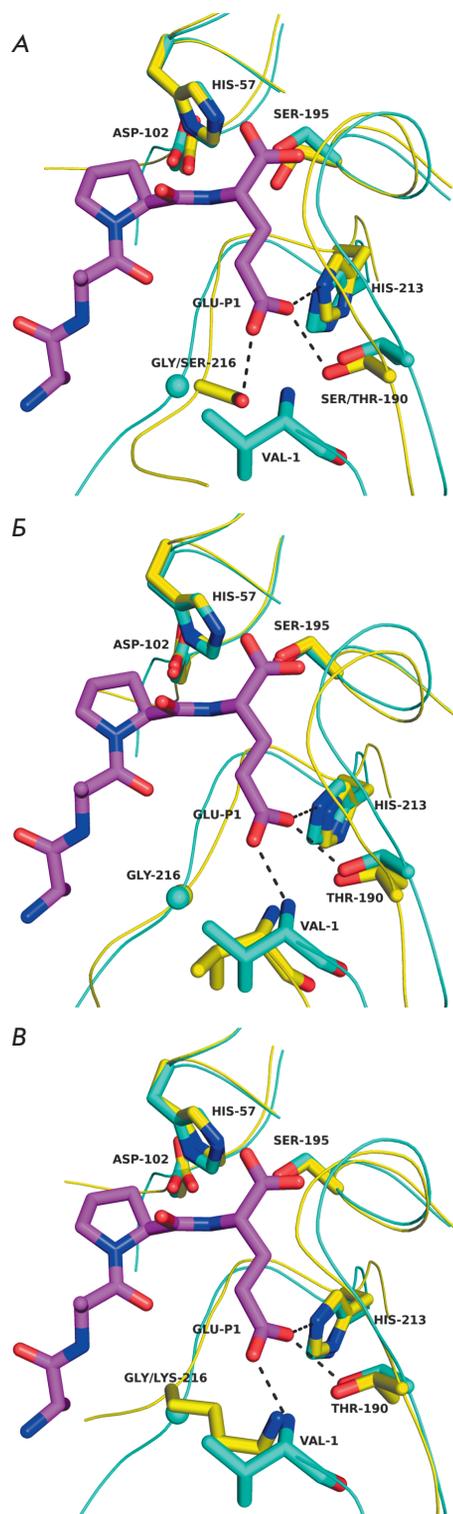


Рис. 8. S1-участки бактериальных глутамилэндопептидаз. А – BIGEP (1r3c; голубой) и Glu-SGP (1hrq; желтый) в комплексе с Boc-AAPE (сиреневый, защитная группа не показана). Б – BIGEP (голубой) и Glu-V8 (1qy6; желтый). В – BIGEP (голубой) и ETA (1agj; желтый). На частях Б и В в S1-сайт вписан лиганд Boc-AAPE из структуры Glu-SGP (сиреневый). Пунктирные линии обозначают водородные связи

сти очевидно должна быть обусловлена отличиями в функционировании протеаз, относящихся к разным группам. Анализ опубликованных данных о ГЭПазах позволяет обнаружить, что вариации в структуре S1-участков этих ферментов коррелируют с различиями в механизмах созревания их предшественников. Такое наблюдение позволяет выдвинуть гипотезу о том, что способ компенсации заряда диктуется путем созревания белка-предшественника.

СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И СОЗРЕВАНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗ

Все ГЭПазы синтезируются в виде предшественников. Однако механизмы процессинга ферментов существенно различаются и могут быть разделены на три группы. ГЭПазы стрептомицетов и вирусов процессируются автокаталитически [47, 51]. Предшественники ET содержат только секреторный лидер [3] и, следовательно, процессируются сигнальной пептидазой. В случае же бактериальных ГЭПаз, подобных Glu-V8 и BIGEP, удаление пропептида, за единственным исключением [21], осуществляется различными протеазами гетерокаталитически [22, 100–104]. Сопоставление структур S1-участков ГЭПаз и механизмов процессинга показывает, что у автоактивирующихся ферментов в S1-кармане не удастся обнаружить явного компенсатора заряда субстрата, для S1-участка ET характерно наличие остатка Lys216, а для ГЭПаз, сходных с Glu-V8 и процессирующихся гетерокаталитически, – α-аминогруппы N-концевого остатка. Рассмотрим эти соответствия с точки зрения биологических функций протеаз каждой группы.

Вирусные ГЭПазы синтезируются как часть протяженного полибелка, селективный гидролиз которого является основной функцией данных ферментов [25, 51, 105, 106]. Таким образом, вирусные ГЭПазы функционируют внутри клетки, начиная действовать сразу после синтеза полибелка. Следовательно, активный центр фермента, включая определяющие специфичность участки, должен быть сформирован и способен осуществлять высокоспецифический гидролиз уже в составе полибелка-предшественника, сохраняя структуру после процессинга. Функционирование ГЭПаз стрептомицетов кажется существенно иным. Эти внеклеточные ферменты синтезируются как классические предшественники протеаз, содержащие препептид. Функции пропоследовательностей ГЭПаз стрептомицетов не установлены, однако по аналогии с близкородственной протеазой В из *Str. griseus* [107, 108] можно полагать, что пропептиды обеспечивают кинетическую стабильность зрелых молекул и участвуют

в их секреции. В то же время автокаталитический процессинг и отсутствие видимой регуляции активности на посттрансляционном уровне делают ситуацию сходной с описанной для вирусных ферментов: активный центр должен быть полностью сформирован в составе предшественника и сохраняться неизменным после образования зрелой молекулы. Эта задача в обоих случаях, по-видимому, имеет одно структурное решение (рис. 4). В S1-кармане нет прямого компенсатора заряда. N-Конец удален от активного центра в зрелом белке и, следовательно, не участвует в формировании S1-участка, так как вовлечен в процессинг. Не установленные до настоящего времени структурные элементы, отвечающие за глутаматную специфичность, локализованы вне S1-области и, вероятно, формируются до процессинга предшественника. Таким образом, изменяющиеся в ходе созревания элементы структуры не участвуют в образовании значимых для катализа регионов молекулы.

Противоположная ситуация наблюдается в случае синтезируемых в виде препробелков ГЭПаз, подобных Glu-V8. Эти протеазы не только подвергаются гетероактивации [101–103, 109], но и, как показано на примере Glu-V8, вовлечены в регуляторные активационные каскады [110–112]. Это предполагает строгий контроль активности, который реализуется достаточно сложным и в чем-то противоречивым способом. На первый взгляд, предшественники Glu-V8, BIGEP и Esp должны быть неактивны, поскольку S1-участок у этих белков формируется только в зрелой молекуле (рис. 7 и 8). В то же время опубликованы данные, которые показывают, что предшественники Glu-V8 [113], BIGEP [109], Esp [7], а также ГЭПаз *B. licheniformis* [114], *B. subtilis* [102] и *Thermoactinomyces* sp. [21] способны к автопроцессингу, причем в большинстве случаев гидролизу подвергаются связи, соответствующие специфичности зрелых ферментов [7, 21, 109, 114]. Кроме того, обнаружена глутаматная активность *in trans* аналогов предшественников [100]. Эти факты ставят под сомнение саму возможность управления активностью обсуждаемых протеаз, однако внимательный анализ пути активации предшественников показывает, что ситуация более сложная.

Автопроцессинг, возможно внутримолекулярный, нативных ферментов, проходящий спонтанно как *in vitro*, так и *in vivo*, приводит не к полному удалению пропоследовательности, а к формированию форм белков с «обрезками» пропептидов (обычно протяженностью 3–15 аминокислотных остатков) [7, 100, 109, 113, 114], т.е. соответствующих по размеру пропептидам ХПП млекопитающих. Эти формы не проявляют активности по отноше-

нию к белковым субстратам (а также малоактивны по отношению к пептидам) *in trans* и могут быть активированы только гетерокаталитически [7, 100, 109, 113, 114]. (Для полноты картины следует отметить, что недавно опубликованы данные о ферменте *Thermoactinomyces* sp. с остатком Glu в положении -1, который способен к автоактивации в гетерологичной экспрессионной системе *in vitro* [21], как и полученные ранее искусственно мутанты других ГЭПаз [109, 114].) Таким образом, созревание ферментов, сходных с Glu-V8, происходит ступенчато. По-видимому, эти белки содержат как бы два пропептида. Первый, протяженный фолдинг-ассистент [99, 109], обеспечивающий кинетическую стабильность зрелого белка, как это часто бывает у бактериальных протеаз [115]. Второй – короткий, формирующийся после первого акта процессинга, – активационный модуль [109, 113, 114], поддерживающий фермент в неактивном состоянии. Нельзя исключить также, что структура активного центра протеаз меняется после удаления первой части пропептида. Можно сказать, что пропептиды ГЭПаз описываемой группы одновременно сочетают в себе свойства, типичные для пропептидов бактериальных ХПП и ферментов млекопитающих. Таким образом, необходимость строгого контроля активности ферментов, подобных Glu-V8, обеспечивается за счет формирования полноценного S1-кармана только после удаления пропептида. Для этого используется механизм, сходный с механизмом активации ХПП млекопитающих, – участие N-концевой аминокислотной группы в структуре существенных для катализа элементов молекулы. Но удаление фолдинг-ассистента при этом происходит автокаталитически за счет базовой специфичности ферментов.

ЕТ стафилококков представляют собой промежуточный вариант. С одной стороны, их предшественники процессируются гетерокаталитически. С другой стороны, процессинг не связан с регуляцией активности, поскольку заключается лишь в удалении сигнального пептида. Таким образом, формирование функционально активного фермента до процессинга, как и строгий контроль активности, очевидно, не являются необходимыми. Здесь, по-видимому, подошел бы вариант, реализованный у ГЭПаз вирусов и стрептомицетов. Однако филогенетический анализ показывает, что ЕТ с наибольшей вероятностью представляют собой паралоги Glu-V8 (рис. 9, см. обсуждение ниже), т.е. эти белки «созданы» на одной базе с Glu-V8 и, по существу, используют ту же схему строения S1-участка (рис. 8). В то же время, в отличие от Glu-V8, ЕТ не содержат пропептидов, что указывает на иной путь сворачивания [115], и имеют значительно более узкую специфичность.

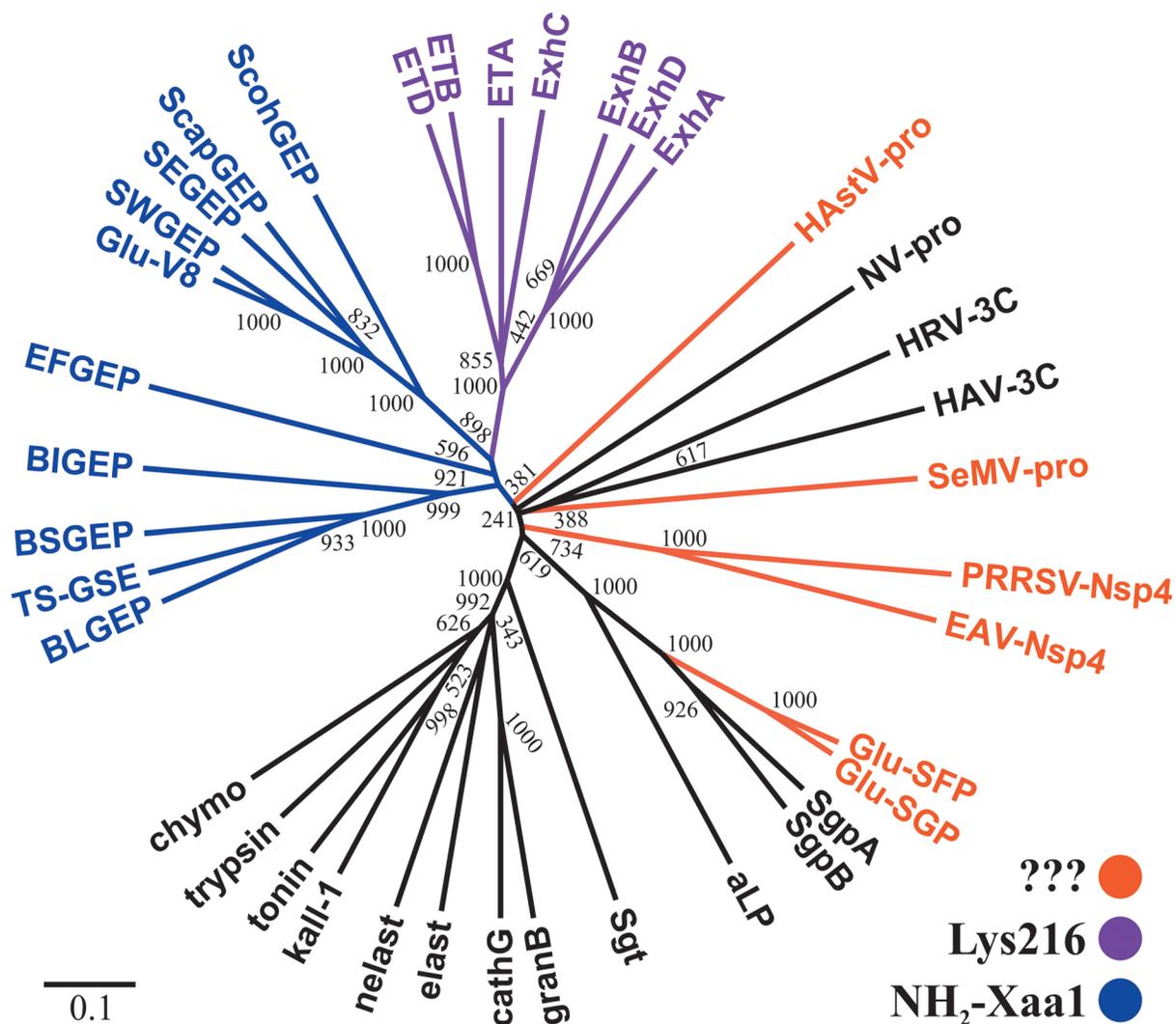


Рис. 9. Филогенетическое дерево химотрипсиноподобных протеаз. Ветви, соответствующие ГЭПамам, выделены цветом: оранжевый – компенсатор заряда в S1-сайте ферментов не выявлен, сиреневый – Lys216 в S1-участке, синий – α-аминогруппа N-концевого остатка в S1-сайте. ГЭПазы: Glu-SFP из *Str. fradiae*, SEGEP из *S. epidermidis*, SWGEP из *S. warneri*, ScohGEP из *S. cohnii*, ScapGEP из *S. caprae*, BLGEP из *B. licheniformis*, BSGEP из *B. subtilis*, TS-GSE из *Thermoactinomyces* sp., EFGEp из *Ent. faecalis*; ExhA, ExhB, ExhC и ExhD – эпидермолитические токсины A, B, C и D из *S. hyicus*. NV-pro – протеаза вируса Норфолк; HRV-3C, HAV-3C – протеазы 3C риновируса и вируса гепатита A человека; aLP – α-литическая протеаза *Lysobacter enzymogenes*; Sgt, SgpA, SgpB – трипсин, протеазы A и B *Str. griseus*; kall-1, trypsin, nelast, cathG, granB – калликреин 1, трипсин 1, эластаза нейтрофилов, катепсин G, гранзим B человека; chymo, elast – химотрипсин A и эластаза 1 быка; tonin – тонин крысы. Выравнивание последовательностей и построение дерева с использованием метода присоединения соседей осуществлены с помощью программы ClustalX 2.1 (www.clustal.org). Дерево визуализировано при помощи программы FigTree (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). Цифры соответствуют числу дендрограмм, в которых были представлены индивидуальные бифуркации при бутстреп-анализе 1000 вариантов филогенетических деревьев

Они неактивны по отношению к большинству белков и пептидов, что достигается, возможно, за счет введения остатка Lys216 и уменьшения объема S1-кармана, а также за счет необычной конформации оксианионной впадины [83].

В контексте нашего обсуждения интересно было бы проследить филогению ГЭПа.

Единственную опубликованную попытку филогенетического анализа ферментов этой группы мы обнаружили в работе, вышедшей в свет 20 лет назад [46]. Поэтому в рамках данного обзора на основе сравнения последовательностей охарактеризованных ГЭПа и некоторых ХПП с другой специфичностью мы построили филогенетическое дерево,

которое представлено на *рис. 9*. Первое, что хочется отметить вслед за авторами работы [46], – складывается впечатление, что ГЭПазы возникали на эволюционном древе ХПП по меньшей мере 2 раза. На это указывает наличие двух удаленных ветвей бактериальных ГЭПаз, одна из которых включает белки, сходные с Glu-V8 и ET, а другая соответствует ферментам стрептомицетов. (Судить об эволюционном положении вирусных протеаз сложно, поскольку топология полученного дерева в части, касающейся этих белков, недостоверна.) Особенно показательно, что ГЭПазы стрептомицетов представляют собой лишь небольшой побег на ветви бактериальных протеаз с широкой специфичностью. Это наблюдение позволяет предположить, что вероятность реализации глутаматной специфичности (как, впрочем, и любой другой) на базе химотрипсинового фолда достаточно велика. По-видимому, для этого достаточно модификации ключевых остатков S1-кармана (His213, Thr/Ser190), обеспечивающих необходимую геометрию и минимальные взаимодействия для связывания остатков Glu/Gln. Однако такая базовая специфичность, вероятно, требует «усиления», которое может быть достигнуто разными путями, в частности, введением компенсатора в S1-сайт, но эта возможность, как показывает анализ ферментов вирусов и стрептомицетов, не единственная. Ветвь, объединяющую все бактериальные ГЭПазы, кроме ферментов стрептомицетов, следует рассмотреть отдельно. Топология этой ветви ожидаемо соответствует таксономии бактерий-продуцентов. При этом ET и ферменты стафилококков, подобные Glu-V8, локализируются на одной общей ветви, т.е. они структурно ближе друг к другу, чем к остальным бактериальным ГЭПазам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный нами анализ показывает, что все известные ГЭПазы относятся к структурному семейству химотрипсина и имеют в целом сходное строение S1-субстратсвязывающего участка. При этом у ферментов этой группы существует несколько разных систем компенсации заряда субстрата. Отличия в механизмах распознавания отрицательного заря-

да коррелируют с различиями в архитектуре и путях процессинга предшественников, что, вероятно, определяется биологическими функциями соответствующих протеаз. Все это позволяет предположить, что ГЭПазы возникли на эволюционном древе ХПП, по крайней мере, дважды. В то же время мы вынуждены констатировать, что имеющаяся в настоящее время информация о структуре и механизмах действия ГЭПаз не позволяет до конца справиться с загадкой их строгой субстратной специфичности.

Следует подчеркнуть, однако, что сегодня центр тяжести исследований ГЭПаз смещается от изучения собственно ферментов к анализу их биологических функций, как правило, в связи с патогенезом. Так, например, активно изучают участие ГЭПаз стафилококков в регуляции роста биопленок, что определяется, в первую очередь, надеждами на обнаружение новых средств борьбы со стафилококковой инфекцией [116]. Интенсивно ведутся работы по изучению вирусных ГЭПаз, что связано с попытками создания эффективных противовирусных препаратов. При этом ГЭПазы обычно не выделяют из всего пула ЗС-подобных протеаз в поисках универсальных ингибиторов процессинга вирусных полибелков. Инженерия ингибиторов требует экстенсивного изучения белок-лигандных взаимодействий, что влечет за собой получение большого объема структурных данных (см., например, [76, 117]). Не прекращается изучение роли ГЭПаз в жизненном цикле вирусов [24, 118]. Отдельно следует отметить появление работ, посвященных изучению вирусных ЗС и ЗС-подобных протеаз, в том числе и ГЭПаз, в качестве индукторов программируемой клеточной гибели [119–122]. Несомненно, исследования ГЭПаз в медицинском контексте будут активно продолжаться. При этом важно подчеркнуть, что, поскольку строгая субстратная специфичность является основой биологического действия ГЭПаз, в ходе таких исследований неизбежно будут получены новые данные, касающиеся ее структурных детерминант. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00526).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демидюк И.В., Костров С.В. // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33. № 1. С. 100–105.
2. Мильготина Е.И., Воюшина Т.Л., Честухина Г.Г. // Биоорг. химия. 2003. Т. 29. № 6. С. 563–576.
3. Dancer S.J., Garratt R., Saldanha J., Jhoti H., Evans R. // FEBS Lett. 1990. V. 268. № 1. P. 129–132.
4. Hanakawa Y., Schechter N.M., Lin C., Nishifuji K., Amagai M., Stanley J.R. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 7. P. 5268–5277.
5. Dubin G., Chmiel D., Mak P., Rakwalska M., Rzychon M., Dubin A. // Biol. Chem. 2001. V. 382. № 11. P. 1575–1582.
6. Moon J.L., Banbula A., Oleksy A., Mayo J.A., Travis J. // Biol. Chem. 2001. V. 382. № 7. P. 1095–1099.
7. Ohara-Nemoto Y., Ikeda Y., Kobayashi M., Sasaki M., Tajika S., Kimura S. // Microb. Pathog. 2002. V. 33. № 1. P. 33–41.
8. Yokoi K., Kakikawa M., Kimoto H., Watanabe K., Yasukawa H., Yamakawa A., Taketo A., Kodaira K.I. // Gene. 2001. V. 281. № 1–2. P. 115–122.
9. Ono T., Ohara-Nemoto Y., Shimoyama Y., Okawara H., Kobayakawa T., Baba T.T., Kimura S., Nemoto T.K. // Biol. Chem. 2010. V. 391. № 10. P. 1221–1232.
10. Fudaba Y., Nishifuji K., Andresen L.O., Yamaguchi T.,

- Komatsuzawa H., Amagai M., Sugai M. // *Microb. Pathog.* 2005. V. 39. № 5–6. P. 171–176.
11. Nishifuji K., Fudaba Y., Yamaguchi T., Iwasaki T., Sugai M., Amagai M. // *Vet. Dermatol.* 2005. V. 16. № 5. P. 315–323.
 12. Yoshida N., Tsuruyama S., Nagata K., Hirayama K., Noda K., Makisumi S. // *J. Biochem.* 1988. V. 104. № 3. P. 451–456.
 13. Kitadokoro K., Nakamura E., Tamaki M., Horii T., Okamoto H., Shin M., Sato T., Fujiwara T., Tsuzuki H., Yoshida N., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1163. № 2. P. 149–157.
 14. Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н., Ревина Л.П., Степанов В.М., Егоров Н.С. // *Биохимия.* 1989. Т. 54. № 1. С. 46–53.
 15. Svendsen I., Breddam K. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 204. № 1. P. 165–171.
 16. Rufo G.A., Jr., Sullivan B.J., Sloma A., Pero J. // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. № 2. P. 1019–1023.
 17. 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. № 2–3. P. 241–244.
 18. Rebrikov D.V., 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. № 1. P. 21–27.
 19. Мосолова О.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М., Ходова О.М., Цаплина И.А. // *Биохимия.* 1987. Т. 52. № 3. С. 414–422.
 20. Демидюк И.В., Носовская Е.А., Цаплина И.А., Каравайко Г.И., Костров С.В. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. № 2. С. 202–207.
 21. Liu F., Zhao Z.S., Ren Y., Cheng G., Tang X.F., Tang B. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. № 24. P. 10429–10441.
 22. Kawalec M., Potempa J., Moon J.L., Travis J., Murray B.E. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 1. P. 266–275.
 23. Ziebuhr J., Snijder E.J., Gorbalenya A.E. // *J. Gen. Virol.* 2000. V. 81. № 4. P. 853–879.
 24. Speroni S., Rohayem J., Nenci S., Bonivento D., Robel I., Barthel J., Luzhkov V.B., Coutard B., Canard B., Mattevi A. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 387. № 5. P. 1137–1152.
 25. Somera M., Sarmiento C., Truve E. // *Viruses.* 2015. V. 7. № 6. P. 3076–3115.
 26. Schechter I., Berger A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967. V. 27. № 2. P. 157–162.
 27. Stroud R.M. // *Sci. Am.* 1974. V. 231. № 1. P. 74–88.
 28. Руденская Г.Н. // *Биоорган. химия.* 2003. Т. 29. № 2. С. 117–128.
 29. Zamolodchikova T.S., Sokolova E.A., Alexandrov S.L., Mikhaleva I.I., Prudchenko I.A., Morozov I.A., Kononenko N.V., Mirgorodskaya O.A., Da U., Larionova N.I., et al. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 249. № 2. P. 612–621.
 30. Polanowska J., Krokoszynska I., Czapinska H., Watorek W., Dadlez M., Otlewski J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1386. № 1. P. 189–198.
 31. Poe M., Blake J.T., Boulton D.A., Gammon M., Sigal N.H., Wu J.K., Zweerink H.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 1. P. 98–103.
 32. Perona J.J., Craik C.S. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 3. P. 337–360.
 33. Hedstrom L. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 12. P. 4501–4524.
 34. Krieger M., Kay L.M., Stroud R.M. // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 83. № 2. P. 209–230.
 35. Waugh S.M., Harris J.L., Fletterick R., Craik C.S. // *Nat. Struct. Biol.* 2000. V. 7. № 9. P. 762–765.
 36. Hof P., Mayr I., Huber R., Korzus E., Potempa J., Travis J., Powers J.C., Bode W. // *EMBO J.* 1996. V. 15. № 20. P. 5481–5491.
 37. Tsu C.A., Perona J.J., Fletterick R.J., Craik C.S. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 18. P. 5393–5401.
 38. Pletnev V.Z., Zamolodchikova T.S., Pangborn W.A., Duax W.L. // *Proteins.* 2000. V. 41. № 1. P. 8–16.
 39. Graf L., Jancso A., Szilagyi L., Hegyi G., Pinter K., Naray-Szabo G., Hepp J., Medzihradzsky K., Rutter W.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 14. P. 4961–4965.
 40. Hedstrom L., Szilagyi L., Rutter W.J. // *Science.* 1992. V. 255. № 5049. P. 1249–1253.
 41. Hedstrom L., Perona J.J., Rutter W.J. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 29. P. 8757–8763.
 42. Hedstrom L., Farr-Jones S., Kettner C.A., Rutter W.J. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 29. P. 8764–8769.
 43. Perona J.J., Hedstrom L., Rutter W.J., Fletterick R.J. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 5. P. 1489–1499.
 44. Nienaber V.L., Breddam K., Birktoft J.J. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. № 43. P. 11469–11475.
 45. Cortes A., Emery D.C., Halsall D.J., Jackson R.M., Clarke A.R., Holbrook J.J. // *Protein Sci.* 1992. V. 1. № 7. P. 892–901.
 46. Barbosa J.A., Saldanha J.W., Garratt R.C. // *Protein Eng.* 1996. V. 9. № 7. P. 591–601.
 47. Stennicke H.R., Birktoft J.J., Breddam K. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. № 11. P. 2266–2275.
 48. Dougherty W.G., Semler B.L. // *Microbiol. Rev.* 1993. V. 57. № 4. P. 781–822.
 49. Gorbalenya A., Snijder E. // *Perspectives Drug Discov. Design.* 1996. V. 6. № 1. P. 64–86.
 50. Spall V.E., Shanks M., Lomonosoff G.P. // *Semin. Virol.* 1997. V. 8. № 1. P. 15–23.
 51. Gorbalenya A.E., Koonin E.V. // *Sov. Sci. Rev. Sect. D Physicochem. Biol.* 1993. V. 11. № 3. P. 1–84.
 52. Blanck S., Stinn A., Tsiklauri L., Zirkel F., Junglen S., Ziebuhr J. // *J. Virol.* 2014. V. 88. № 23. P. 13747–13758.
 53. Meyers G., Wirblich C., Thiel H.J., Thumfart J.O. // *Virology.* 2000. V. 276. № 2. P. 349–363.
 54. Belliot G., Sosnovtsev S.V., Mitra T., Hammer C., Garfield M., Green K.Y. // *J. Virol.* 2003. V. 77. № 20. P. 10957–10974.
 55. Sosnovtsev S.V., Belliot G., Chang K.O., Prikhodko V.G., Thackray L.B., Wobus C.E., Karst S.M., Virgin H.W., Green K.Y. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 16. P. 7816–7831.
 56. Robel I., Gebhardt J., Mesters J.R., Gorbalenya A., Coutard B., Canard B., Hilgenfeld R., Rohayem J. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 16. P. 8085–8093.
 57. Wei C., Meller J., Jiang X. // *Virology.* 2013. V. 436. № 1. P. 24–32.
 58. Snijder E.J., Wassenaar A.L., van Dinten L.C., Spaan W.J., Gorbalenya A.E. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 9. P. 4864–4871.
 59. Tian X., Lu G., Gao F., Peng H., Feng Y., Ma G., Bartlam M., Tian K., Yan J., Hilgenfeld R., et al. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 392. № 4. P. 977–993.
 60. Barrette-Ng I.H., Ng K.K., Mark B.L., van Aken D., Cherney M.M., Garen C., Kolodenco Y., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., James M.N. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 42. P. 39960–39966.
 61. Gayathri P., Satheshkumar P.S., Prasad K., Nair S., Savithri H.S., Murthy M.R. // *Virology.* 2006. V. 346. № 2. P. 440–451.
 62. Satheshkumar P.S., Lokesh G.L., Savithri H.S. // *Virology.* 2004. V. 318. № 1. P. 429–438.
 63. Bosch A., Pinto R.M., Guix S. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2014. V. 27. № 4. P. 1048–1074.
 64. Matthews D.A., Smith W.W., Ferre R.A., Condon B., Budahazi G., Sisson W., Villafranca J.E., Janson C.A., McElroy H.E., Gribskov C.L., et al. // *Cell.* 1994. V. 77. № 5. P. 761–771.
 65. Mosimann S.C., Cherney M.M., Sia S., Plotch S., James M.N. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. № 5. P. 1032–1047.
 66. Bergmann E.M., Mosimann S.C., Chernaia M.M., Malcolm B.A., James M.N. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 3. P. 2436–2448.
 67. Matthews D.A., Dragovich P.S., Webber S.E., Fuhrman S.A., Patick A.K., Zalman L.S., Hendrickson T.F., Love R.A., Prins T.J., Marakovits J.T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 20. P. 11000–11007.
 68. Anand K., Palm G.J., Mesters J.R., Siddell S.G., Ziebuhr J., Hilgenfeld R. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 13. P. 3213–3224.

69. Anand K., Ziebuhr J., Wadhvani P., Mesters J.R., Hilgenfeld R. // *Science*. 2003. V. 300. № 5626. P. 1763–1767.
70. Yang H., Yang M., Ding Y., Liu Y., Lou Z., Zhou Z., Sun L., Mo L., Ye S., Pang H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 23. P. 13190–13195.
71. Birtley J.R., Knox S.R., Jaulent A.M., Brick P., Leatherbarrow R.J., Curry S. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 12. P. 11520–11527.
72. Nakamura K., Someya Y., Kumasaka T., Ueno G., Yamamoto M., Sato T., Takeda N., Miyamura T., Tanaka N. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 21. P. 13685–13693.
73. Zeitler C.E., Estes M.K., Venkataram Prasad B.V. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 10. P. 5050–5058.
74. Leen E.N., Baeza G., Curry S. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 6. P. e38723.
75. Muhaxhiri Z., Deng L., Shanker S., Sankaran B., Estes M.K., Palzkill T., Song Y., Prasad B.V. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 8. P. 4281–4292.
76. Damalanka V.C., Kim Y., Alliston K.R., Weerawarna P.M., Galasiti Kankanamalage A.C., Lushington G.H., Mehzebain N., Battaile K.P., Lovell S., Chang K.O., et al. // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. № 5. P. 1899–1913.
77. Ziebuhr J., Heusipp G., Siddell S.G. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 5. P. 3992–3997.
78. Hegyi A., Friebe A., Gorbalenya A.E., Ziebuhr J. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. № 3. P. 581–593.
79. Someya Y., Takeda N., Miyamura T. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 12. P. 5949–5958.
80. Nishifuji K., Sugai M., Amagai M. // *J. Dermatol. Sci.* 2008. V. 49. № 1. P. 21–31.
81. Bukowski M., Wladyka B., Dubin G. // *Toxins (Basel)*. 2010. V. 2. № 5. P. 1148–1165.
82. Bailey C.J., Redpath M.B. // *Biochem. J.* 1992. V. 284. № 1. P. 177–180.
83. Vath G.M., Earhart C.A., Rago J.V., Kim M.H., Bohach G.A., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. № 7. P. 1559–1566.
84. Cavarelli J., Prevost G., Bourguet W., Moulinier L., Chevrier B., Delagoutte B., Bilwes A., Mourey L., Rifai S., Piemont Y., et al. // *Structure*. 1997. V. 5. № 6. P. 813–824.
85. Vath G.M., Earhart C.A., Monie D.D., Iandolo J.J., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. № 32. P. 10239–10246.
86. Yamaguchi T., Nishifuji K., Sasaki M., Fudaba Y., Aepfelbacher M., Takata T., Ohara M., Komatsuzawa H., Amagai M., Sugai M. // *Infect. Immun.* 2002. V. 70. № 10. P. 5835–5845.
87. Ahrens P., Andresen L.O. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 6. P. 1833–1837.
88. Rago J.V., Vath G.M., Bohach G.A., Ohlendorf D.H., Schlievert P.M. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. № 4. P. 2207–2213.
89. Meijers R., Blagova E.V., Levnikov V.M., Rudenskaya G.N., Chestukhina G.G., Akimkina T.V., Kostrov S.V., Lamzin V.S., Kuranova I.P. // *Biochemistry*. 2004. V. 43. № 10. P. 2784–2791.
90. Prasad L., Leduc Y., Hayakawa K., Delbaere L.T. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004. V. 60. № 2. P. 256–259.
91. Chen C., Krishnan V., Macon K., Manne K., Narayana S.V., Schneewind O. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 41. P. 29440–29452.
92. Bode W. // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 127. № 4. P. 357–374.
93. Bode W., Schwager P., Huber R. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 118. № 1. P. 99–112.
94. Wang D., Bode W., Huber R. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 185. № 3. P. 595–624.
95. Wroblowski B., Diaz J.F., Schlitter J., Engelborghs Y. // *Protein Eng.* 1997. V. 10. № 10. P. 1163–1174.
96. Gomis-Ruth F.X., Bayes A., Sotiropoulou G., Pampalakis G., Tsetsenis T., Villegas V., Aviles F.X., Coll M. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 30. P. 27273–27281.
97. Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. V. 17. № 5. P. 411–416.
98. Breddam K., Meldal M. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 206. № 1. P. 103–107.
99. Nemoto T.K., Ohara-Nemoto Y., Ono T., Kobayakawa T., Shimoyama Y., Kimura S., Takagi T. // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 3. P. 573–587.
100. Rouf S.M., Ohara-Nemoto Y., Shimoyama Y., Kimura S., Ono T., Nemoto T.K. // *Indian J. Biochem. Biophys.* 2012. V. 49. № 6. P. 421–427.
101. Drapeau G.R. // *J. Bacteriol.* 1978. V. 136. № 2. P. 607–613.
102. Park C.H., Lee S.J., Lee S.G., Lee W.S., Byun S.M. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 19. P. 6457–6464.
103. Велишаева Н.С., Гасанов Е.В., Громова Т.Ю., Демидюк И.В. // *Биоорган. химия*. 2008. Т. 34. № 6. С. 786–791.
104. Demidyuk I.V., Gasanov E.V., Safina D.R., Kostrov S.V. // *Protein J.* 2008. V. 27. № 6. P. 343–354.
105. Geigenmuller U., Chew T., Ginzton N., Matsui S.M. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 4. P. 2003–2008.
106. Kiang D., Matsui S.M. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. № 1. P. 25–34.
107. Truhlar S.M., Cunningham E.L., Agard D.A. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. № 2. P. 381–390.
108. Baardsnes J., Sidhu S., MacLeod A., Elliott J., Morden D., Watson J., Borgford T. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 12. P. 3241–3244.
109. Gasanov E.V., Demidyuk I.V., Shubin A.V., Kozlovskiy V.I., Leonova O.G., Kostrov S.V. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2008. V. 21. № 11. P. 653–658.
110. Rice K., Peralta R., Bast D., de Azavedo J., McGavin M.J. // *Infect. Immunol.* 2001. V. 69. № 1. P. 159–169.
111. Massimi I., Park E., Rice K., Muller-Esterl W., Sauder D., McGavin M.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 44. P. 41770–41777.
112. Shaw L., Golonka E., Potempa J., Foster S.J. // *Microbiology*. 2004. V. 150. № 1. P. 217–228.
113. Nickerson N.N., Prasad L., Jacob L., Delbaere L.T., McGavin M.J. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 47. P. 34129–34138.
114. Trachuk L.A., Shcheglov A.S., Milgotina E.I., Chestukhina G.G. // *Biochimie*. 2005. V. 87. № 6. P. 529–537.
115. Demidyuk I.V., Shubin A.V., Gasanov E.V., Kostrov S.V. // *BioMolecular Concepts*. 2010. V. 1. № 3–4. P. 305–322.
116. Iwase T., Uehara Y., Shinji H., Tajima A., Seo H., Takada K., Agata T., Mizunoe Y. // *Nature*. 2010. V. 465. № 7296. P. 346–349.
117. Kim Y., Lovell S., Tiew K.C., Mandadapu S.R., Alliston K.R., Battaile K.P., Groutas W.C., Chang K.O. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 21. P. 11754–11762.
118. Nair S., Savithri H.S. // *Virology*. 2010. V. 396. № 1. P. 106–117.
119. Calandria C., Irurzun A., Barco A., Carrasco L. // *Virus Res.* 2004. V. 104. № 1. P. 39–49.
120. Chau D.H., Yuan J., Zhang H., Cheung P., Lim T., Liu Z., Sall A., Yang D. // *Apoptosis*. 2007. V. 12. № 3. P. 513–524.
121. Ma Z., Wang Y., Zhao H., Xu A.T., Wang Y., Tang J., Feng W.H. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 7. P. e69387.
122. Shubin A.V., Demidyuk I.V., Lunina N.A., Komissarov A.A., Roschina M.P., Leonova O.G., Kostrov S.V. // *BMC Cell Biol.* 2015. V. 16. № 1. P. 4.