

УДК 577.112:579.22

ПРОТЕИНОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПЕПТИДАЗ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Е. В. МАЦЕЛЮХ, Л. Д. ВАРБАНЕЦ

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Получено 18.03.2013

В обзоре систематизированы данные литературы о протеиновых ингибиторах пептидаз, синтезируемых различными видами микроорганизмов. Показано, что в настоящее время на основании гомологии последовательностей аминокислот протеиновые ингибиторы сгруппированы в 77 семейств, 29 из которых содержат ингибиторы микроорганизмов. Механизм ингибирования пептидаз протеинами может быть связан либо с каталитическим механизмом действия пептидаз, либо включать не связанное с ним блокирование активного центра или его окружения. Структурные элементы протеиновых ингибиторов, ответственные за связывание с пептидазами, в большинстве своем включают N- или C-концевые последовательности, незащищенные полипептидные петли (цепи), действующие независимо или в комбинации с другими элементами. Проанализированы основные свойства, структурные особенности и, где это установлено, функции протеиновых ингибиторов пептидаз. Поскольку некоторые протеины эффективно ингибируют такие пептидазы, как субтилизин, химоотрипсин, панкреатическую эластазу, возможно их практическое применение для лечения таких заболеваний, как эмфизема легких, артрит, панкреатит, тромбоз, повышение артериального давления, мышечная дистрофия, рак. Предполагают, что роль бактериального гомолога альфа-макроглобулина *Escherichia coli*, являющегося периплазматическим протеином, заключается в защите периплазматического пространства от действия собственных пептидаз бактерии. Благодаря специфическому свойству альфа-2-макроглобулинов связывать активные молекулы эндопептидаз они нашли применение в биотехнологии для выделения эндопептидаз из неочищенных биологических препаратов и для титрования их активных центров. У некоторых свободноживущих бактерий протеиновые ингибиторы могут синтезироваться для защиты от действия собственных энзимов, в то время как для патогенов наличие этих протеинов может играть определенную роль как в инфекционном процессе, так и в системе защиты от пептидаз хозяина.

Ключевые слова: микроорганизмы, протеиновые ингибиторы пептидаз.

Пептидазы имеют существенное значение для выживания всех живых организмов и кодируются приблизительно 2% всех генов. Однако, несмотря на свои важные биологические функции, пептидазы могут обладать повреждающими свойствами для живых систем, поэтому должны находиться под строгим контролем. Существует несколько механизмов контроля чрезмерной активности пептидаз. Наиболее важным среди них является взаимодействие энзимов с протеинами, подавляющими их активность. Для таких веществ был введен термин «протеиновый ингибитор пептидазы». Существует большая вероятность того, что все протеины можно рассматривать с точки зрения наличия ингибирующего влияния на

активность пептидаз *in vitro* и *in vivo* посредством образования комплексов с энзимами. В настоящее время пептидазы и их ингибиторы — наиболее интенсивно изучаемые протеиновые комплексы. Структура ингибиторов, типы ингибирования, кинетические и термодинамические параметры этих процессов, природа энзимингибиторных комплексов весьма разнообразны.

Изучение ингибиторов пептидаз началось практически одновременно с открытием этих энзимов. В настоящее время известны сотни ингибиторов пептидаз протеиновой природы, и они являются объектами множества исследований. Эти исследования могут быть чрезвычайно перспективными для использования ингибиторов в медицине,

сельском хозяйстве и биотехнологии. Понимание характера взаимодействия протеинового ингибитора с ферментами является предпосылкой для разработки новых подходов к синтезу синтетических ингибиторов, которые могут впоследствии применяться как лекарственные средства. Многие ингибиторы естественного происхождения, такие, например, как антикоагулянт «гирудин», используют в качестве основы препаратов протеинов для инъекций [1]. Существует ряд наследственных заболеваний, которые связаны с нарушениями во взаимодействии пептидаза–ингибитор. К ним относятся различные формы эмфиземы легких, эпилепсия, наследственный отек Квинке и синдром Нетертона [2–5]. Их патологический процесс можно корректировать введением синтетических или природных ингибиторов пептидаз. Причиной ряда болезней может стать также чрезмерная активность протеолитических ферментов, последствия которой может устранить генная терапия [6, 7]. Для удовлетворения потребностей сельского хозяйства изучают генетически модифицированные культуры растений, в которых экспрессируются ингибиторы гидролитических ферментов их насекомых-вредителей [8, 9].

Первый обзор по протеиновым ингибиторам пептидаз был опубликован в начале 80-х гг. XX в. [10]. Авторы отметили, что ранее ингибиторы называли по активности к известным ферментам (чаще всего трипсину, химотрипсину и субтилизину): например, «ингибитор субтилизина из *Streptomyces*» или «ингибитор трипсина из поджелудочной железы». Такие названия не давали возможности понять связь между ингибиторами и оценить, насколько информация о механизме действия одного ингибитора можно применить к другим. Было очевидно, что пептидазные ингибиторы необходимо классифицировать по гомологичным семействам, но в то время достоверная информация, касающаяся их аминокислотной последовательности, существовала лишь для ограниченного количества протеинов, поэтому официально признанными были лишь около десятка семейств. Главным препятствием классификации ингибиторов пептидаз по гомологии их аминокислотной последовательности является тот факт, что многие из этих протеинов содержат повторяющиеся ингибиторные домены на единственной полипептидной цепи. Эти области не идентичны друг другу, но обладают функцией ингибирования. Отличающееся число повторов позволяет объединять ингибиторы

на основании их аминокислотной последовательности.

Начиная с конца XX — начала XXI вв. была сделана новая попытка классифицировать и дать названия ингибиторам протеолитической активности протеиновой природы [11]. Веб-сайт MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/inhibitors/>) наряду с классификацией пептидаз и их субстратов включает информацию относительно ингибиторов пептидаз. Классификация протеиновых ингибиторов постоянно дополняется, и в настоящий момент на основании гомологии последовательностей аминокислот они сгруппированы в 77 семейств, объединенных в 51 клан исходя из сходства их третичной структуры. Механизм ингибирования пептидаз протеинами может быть связан с каталитическим механизмом действия фермента либо включать не связанное с ним блокирование активного центра или его окружения. Структурные элементы протеиновых ингибиторов, ответственные за связывание с пептидазами, в большинстве своем содержат N- или C-концевые последовательности, незащищенные полипептидные петли (цепи), действующие независимо или в комбинации с другими элементами. Отличающиеся по способу укладки протеиновые структуры ответственны за различные несвязанные типы ингибирования [12]. Например, β -складчатая структура вовлекается в ингибирование цистеиновых, сериновых и металлопептидаз [13]. Механизмы ингибирования охватывают: 1) образование комплекса Михаэлиса, либо комплекса фермент–продукт, либо интермедиата ацил–фермент; 2) непродуктивное связывание; 3) стерическое блокирование активного центра. По первому механизму действуют практически все традиционные протеиновые ингибиторы сериновых пептидаз типа бычьего панкреатического ингибитора трипсина или овомукоида, а также серпины, гирудин и многие другие. По этому механизму функционируют и некоторые ингибиторы цистеиновых (цистатины, стафостатины, тиропины), аспартильных (сахаропепсин) и металлопептидаз (ингибиторы из *Streptomyces nigrescens*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas aeruginosa*). Механизм ингибирования путем непродуктивного связывания характерен для ингибиторов апоптоза (IAPs), действующих на специфические каспазы [14]. В некоторых случаях полипептидная цепь ингибитора способна блокировать активный центр пептидазы таким образом, что контакт с каталитическим центром пептидазы не

устанавливается, а наблюдается стерическое блокирование активного центра. Классический пример такого взаимодействия — ингибирование цистатинами папаин-подобных цистеиновых пептидаз [15].

Регуляция протеолиза является общим свойством многоклеточных организмов и, в основном, отсутствует у прокариот и одноклеточных эукариот. Регулирование протеолиза у прокариот происходит на нескольких уровнях, в том числе транскрипции генов и синтеза протеина. Системы регулирования включают в себя синтез пептидаз в виде зимогенов (проэнзимов), которые активируются после достижения заданного места локализации, — в случае прокариот это периплазма или внеклеточная среда. Иногда протеолитическая активность регулируется также ингибиторами пептидаз. Однако некоторые бактерии и археи приобрели гены, кодирующие различные виды ингибиторов пептидаз [16] (табл. 1).

Ингибиторы семейства I1

Протеины семейства I1, часто называемые «семейство ингибиторов Kazal», ингибируют активность сериновых пептидаз как семейства химотрипсина (S1), так и субтилизина (S8). Они широко распространены среди растений и животных, в том числе беспозвоночных, а также бактерий, но редко встречаются у простейших, отсутствуют у грибов и вирусов. Гены, кодирующие гомологи ингибиторов семейства I1, были найдены у 11 видов бактерий типа *Proteobacteria*.

Представители этого семейства ингибируют пептидазы по «стандартному» механизму Laskowski-младшего [10]. Согласно этому механизму ингибитор взаимодействует с пептидазой по типу энзим-субстрат. Ингибиторы, подчиняющиеся этому механизму, высокоспецифичны и ограничивают протеолиз субстратов пептидазами. На поверхности каждой молекулы ингибитора находится по крайней мере одна (или больше — в мультидоменных ингибиторах) пептидная связь, называемая реактивным центром, которая взаимодействует с активным центром энзима. Значения k_{cat}/K_m для гидролиза этой связи пептидазой при нейтральных значениях pH очень высоки и составляют 10^4 – 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, в то время как для субстрата — 10^3 $M^{-1}s^{-1}$. Для ингибиторов значения как k_{cat} , так и K_m на несколько порядков ниже, чем для субстратов. Поэтому при обычно используемых концентрациях и нейтральном pH их гидролиз происходит крайне медленно, при этом

система ведет себя так, как если бы это было простое равновесие между энзимом и свободным ингибитором, с одной стороны, и их комплексом — с другой. Константа равновесия ассоциации этих комплексов чрезвычайно высока и находится в диапазоне от 10^7 – 10^{13} M^{-1} . Дополнительным свойством ингибиторов является то, что полный гидролиз их реактивного центра не происходит. При нейтральных значениях pH константа равновесия между модифицированным (пептидная связь реактивного центра гидролизована) и интактным (пептидная связь реактивного центра остается нетронутой) ингибиторами близка к единице. Стабильные комплексы образуются также между энзимом и свободным (или модифицированным) ингибитором, которые являются термодинамически одинаково активными ингибиторами для энзима.

Ингибиторы семейства I2

Принадлежащие к этому семейству ингибиторы играют важную роль в регулировании активности сериновых пептидаз у животных. Гомологи этих энзимов были найдены у растений, простейших, вирусов. Известным представителем семейства является аprotинин. Его используют для лечения таких заболеваний, как острый панкреатит и нарушение процесса свертывания крови [17]. У бактерий гены, кодирующие гомологичные протеины, выявлены только у представителей 10 видов, относящихся к трем различным типам бактерий: *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* и *Proteobacteria*, при этом ничего не известно об их функциях. Механизм ингибирования такой же, как и для семейства I1 [10].

Ингибиторы семейства I4

В состав семейства I4 входят ингибиторы сериновых (S1, S8) и цистеиновых пептидаз (C1, C14).

Существование в плазме крови людей ингибитора трипсина было установлено в 50-х гг. XX в., а в течение 60-х гг. с помощью электрофоретических и иммунологических методов из плазмы были выделены несколько различных протеинов, ингибирующих трипсин; наиболее распространенный из них был назван «альфа-1-антитрипсин». Стало очевидно, что у человека встречаются различные формы ингибитора, в том числе и функционально недостаточные. Люди, у которых присутствуют такие формы ингибитора, имеют наследственные заболевания. Установлено также, что ингибитор

Таблица 1. Распределение гомологических протеиновых последовательностей ингибиторов пептидаз различных семейств среди микроорганизмов

Семейство	Тип ингибитора	Тип ингибируемых пептидаз (семейство)	Распространение гомологических последовательностей			Наличие установленной структуры (для микробных организмов)
			Bacteria	Archaea	Fungi (микроскопические)	
1	2	3	4	5	6	7
I1	Овомукоид из <i>Meleagris galloravo</i>	Сериновые пептидазы (S1, S8)	+	+	-	Нет
I2	Апротинин из <i>Bos taurus</i>	Сериновые пептидазы (S1)	+	-	-	Нет
I4	Альфа-1-антитрипсин из <i>Homo sapiens</i>	Сериновые (S1, S8), цистеиновые пептидазы (C1, C14)	+	+	+	Да (<i>Thermobifida fusca</i>)
I8	Ингибитор химотрипсина/эластазы из <i>Ascaris suum</i>	Сериновые пептидазы (S1) и металлопептидазы (M4)	-	-	+	Нет
I9	Ингибитор пептидазы В из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Сериновые пептидазы (S8)	+	-	+	Нет
I10	Мариностагин из <i>Alteromonas</i> sp.	Сериновые пептидазы (S1, S8)	+	-	-	Нет
I11	Экогин из <i>Escherichia coli</i>	Сериновые пептидазы (S1)	+	-	-	Да (<i>Escherichia coli</i>)
I13	Эглин из <i>Hirudo medicinalis</i>	Сериновые пептидазы (S1, S8)	+	-	-	Нет
I16	Ингибитор субтилизинов из <i>Streptomyces</i>	Сериновые пептидазы (S1), металлопептидазы (M4)	+	-	-	Да (<i>Streptomyces albo-griseolus</i>)
I25	Цистагин А из <i>Homo sapiens</i>	Цистеиновые пептидазы (C1)	-	-	+	Нет
I31	Эквистагин из <i>Actinia equina</i>	Цистеиновые пептидазы (C1)	+	-	-	Нет
I32	Сурвивин из <i>Homo sapiens</i>	Цистеиновые пептидазы (C14)	-	-	+	Нет
I34	Сахаропепсин из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Аспаргильные пептидазы (A1)	-	-	+	Да (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
I36	Ингибитор металлопептидаз из <i>Streptomyces</i>	Металлопептидазы (M4)	+	-	-	Да (<i>Streptomyces nigrescens</i>)
I38	Ингибитор металлопептидаз из <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Металлопептидазы (M4, M10)	+	-	-	Да (<i>Erwinia chrysanthemi</i>)
I39	Альфа-2-макроглобулин из <i>Homo sapiens</i>	Пептидазы различных каталитических типов	+	+	-	Нет
I42	Шагазин из <i>Leishmania major</i>	Цистеиновые пептидазы (C1)	+	+	-	Нет
I43	Оприн из <i>Didelphis marsupialis</i>	Металлопептидазы (M12)	+	-	-	Нет
I51	У-ингибитор из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Сериновые пептидазы (S1)	+	+	+	Да (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Sulfolobus</i> sp.)
I57	Стафостагин В из <i>Staphylococcus aureus</i>	Цистеиновые пептидазы (C47)	+	-	-	Да (<i>Staphylococcus aureus</i>)
I58	Стафостагин А из <i>Staphylococcus aureus</i>	Цистеиновые пептидазы (C47)	+	-	-	Да (<i>Staphylococcus aureus</i>)

Таблица 1. Окончание

1	2	3	4	5	6	7
I63	Прозоинофильный основной протеин <i>Homo sapiens</i>	Металлопептидазы (M43)	+	-	+	Нет
I66	Ингибитор из <i>Lentinula edodes</i>	Сериновые пептидазы (S1)	+	-	+	Нет
I69	Ингибитор стрептопаина из <i>Streptococcus pyogenes</i>	Цистеиновые пептидазы (C47)	+	-	-	Да (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
I75	Протеин СШ бактериофага лямбда	Металлопептидазы (M41)	+	-	-	Нет
I78	Ингибитор эластазы из <i>Aspergillus fumigatus</i>	Сериновые пептидазы (S1)	+	-	+	Нет
I79	AVR2 протеин из <i>Passalora fulva</i>	Цистеиновые пептидазы (C1)	-	-	+	Нет
I80	IseA протеин из <i>Bacillus subtilis</i>	Сериновые пептидазы (S1)	+	-	-	Нет
I87	HflC протеин из <i>Klebsiella</i> sp. 4_1_44FAA	Металлопептидазы (M41)	+	+	-	Нет

Примечание: «+» — наличие гомологичных последовательностей;
«-» — отсутствие гомологичных последовательностей.

эффективен в отношении многих других эндопептидаз, поэтому более соответствующее название для него «альфа-1-ингибитор пептидаз». В 1980 г. появились сведения, что несколько других известных ингибиторов, а также яичный альбумин, не являющийся ингибитором, обладают гомологией с альфа-1-ингибитором [18]. В том же году для ингибиторов этого семейства был введен термин «серпины», т. е. «ингибиторы сериновых пептидаз» [19].

Еще 10 лет тому назад считалось, что члены семейства I4 присутствуют только у высших многоклеточных эукариот (растений и животных) и вирусов [20]. Появление метода секвенирования генома и совершенствование баз данных методов поиска показало, что серпины есть и у одноклеточных микроорганизмов, в том числе у прокариот, простейших и грибов [21]. Первые 12 серпинподобных последовательностей в геноме прокариот были определены в 2002 г. [22]. Поскольку серпины, как правило, склонны к полимеризации при нагревании, особый интерес представляет их существование у термофильных бактерий *Thermobifida fusca*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* и гипертермофильных архей *Pyrobaculum aerophilum*. Точная роль большинства бактериальных серпинов остается невыясненной. Однако для *Clostridium thermocellum* показано, что гомолог серпинов локализуется в целлюлозосоме (мультиэнзимном комплексе, ассоциированном с клетками), а его роль заключается в предотвращении нежелательной активности экзопептидаз в отношении целлюлозосомы [23].

Типичная структура молекулы серпинов включает в себя 3 β -слоя (А, В и С) и 8 или 9 α -спиралей (hA–hI) (рис. 1). На поверхности молекулы серпинов также имеется участок полипептидной цепи — петля реактивного центра (RCL), который определяет специфичность ингибитора и участвует в формировании первичной связи с соответствующей пептидазой. Серпины используют конформационные перестройки для подавления активности сериновых и цистеиновых пептидаз. Серпин, выделенный из термофильной бактерии *Thermobifida fusca*, получил название «термопин». Было показано, что этот протеин ингибирует химотрипсин путем образования ковалентного комплекса и имеет высокую степень стабильности при 60 °С (при этой температуре альфа-1-ингибитор пептидаз утрачивает активность в течение нескольких минут). Повышенная стабильность объясняется тем, что С-конец

термопина удлинена и взаимодействует с высококонсервативными остатками, отвечающими за стабильность ингибитора [24].

Сравнение кристаллических структур нативного и расщепленного в петле реактивного сайта термопина показало, что нативная структура ингибитора относительно гибкая и рыхлая, а переход к расщепленной структуре происходит в результате значительного увеличения солевых мостиков. Различия в стабильности этих двух структур рассматривают как движущую силу, важную для быстрого конформационного изменения и функционирования термостабильных серпинов. Из *Pyrobaculum aerophilum* был выделен протеиновый ингибитор аэропин [26], который на основании секвенирования был отнесен к семейству серпинов. Показано, что у этого протеина отсутствует hD-спираль, но свойство ингибировать сериновые пептидазы сохранено (рис. 2, А). Кроме того, он обладает исключительной устойчивостью к химической и тепловой денатурации, не полимеризуется при низких концентрациях денатуранта как при нагревании, так и при изменении pH (рис. 2, Б), как это характерно для других серпинов.

У представителей семейства I4 механизм ингибирования определяется необратимыми ковалентными реакциями. Расщепляемая связь расположена в петле реактивного центра. Расщепление вызывает критическое конформационное изменение, которое происходит настолько быстро, что катализ приводит только к формированию ацильного интермедиата и высвобождению С-концевой части петли реактивного центра. При этом

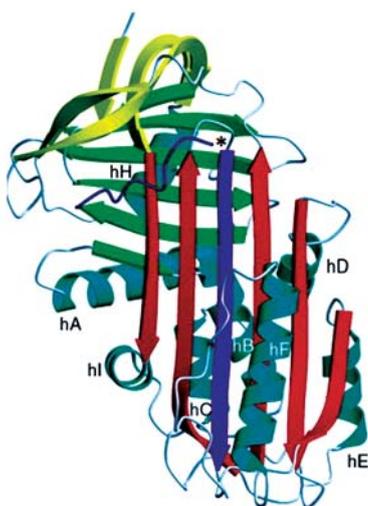
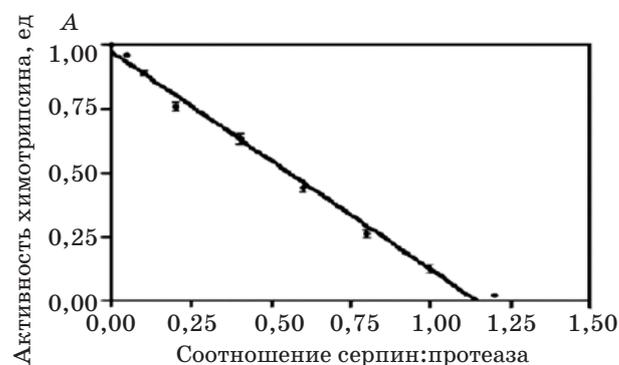


Рис. 1. Кристаллическая структура термопина: 8 α -спиралей обозначены как hA-hI; С-концевой хвост отмечен звездочкой (*) [25]

пептидаза перемещается от вершины до основания серпина, и ее конформация изменяется таким образом, что образованный ацильный интермедиат гидролизуетя чрезвычайно медленно, что приводит к ингибированию пептидазы. Механизм ингибирования был установлен на основании исследования кристаллографической структуры комплекса пептидаза–серпин [27].

Ингибиторы семейства I9

В эту группу входят ингибиторы сериновых пептидаз, в частности субтилизинов (S8), выделенные только у бактерий, дрожжей и грибов. Это, например, цереvizин из *Saccharomyces cerevisiae*, а также пропептиды (другое название — активационные пептиды), ответственные за процесс свертывания и функциональную активность проэнзимов (зимогенов) пептидаз [28, 29]. Пропептиды в неактивной форме пептидаз экранируют субстратсвязывающий центр, ингибируя таким образом энзим. Другое название таких пропептидов — «temporary inhibitor», т. е. «временный ингибитор», поскольку впоследствии такие ингибиторы деградируются пептидазой. Так, для пропептида субтилизина BPN показано ингибирующее действие по отношению к субтилизину в начальные моменты инкубирования [29].



Б	pH	Аэропин, T_m , °C	Антитрипсин, T_m , °C
	3,5	81	Unfoldet
	4,0	93	39
	5,0	>95	57
	6,0	>95	64
	7,0	>95	62
	8,0	>95	59

Рис. 2. А — стехиометрия ингибирования бычьего химотрипсина аэропином: показано, что комплекс аэропин-пептидаза формируется при соотношении 1:1; Б — влияние pH на стабильность аэропина и антитрипсина [25]

Однако с увеличением времени инкубации ингибиторная активность пропептида уменьшается (рис. 3). И даже при молярном соотношении 7 ингибиторная активность полностью исчезает через 30 мин инкубации, что указывает на деградацию пропептида субтилизином.

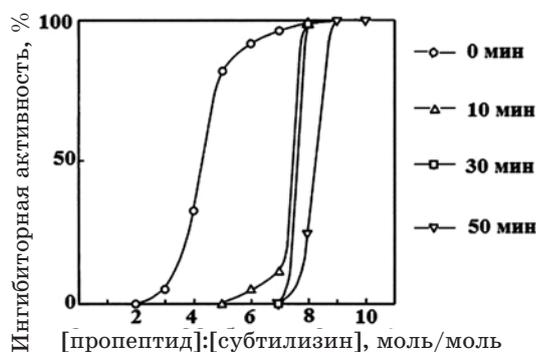


Рис. 3. Ингибиторная активность пропептида: концентрация 364 нМ в реакционной смеси с субтилизином ВРН в различных молярных соотношениях и при разном времени инкубации [29]

Пропептид имеет открытую антипараллельную-альфа/антипараллельную-бета сэндвич-структуру, включающую две альфа-спирали и четыре бета-листа [(бета/альфа/бета)·2-топологию]. Показано [30], что третичная структура комплекса такого пропептида с субтилизином ВРН представляет собой конформацию альфа/бета-протеина со складкой (рис. 4). Молекула церевизина состоит из 74 аминокислотных остатков и, что необычно для протеиновых ингибиторов, не содержит остатков цистеина [31]. Существуют две изоформы церевизина, незначительно отличающиеся структурой и свойствами.

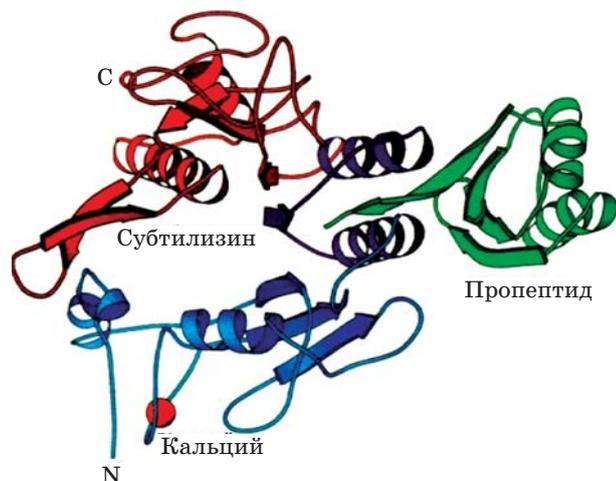


Рис. 4. Комплекс пропептида с субтилизином (77 остатков) с энзимом (266 остатков) [30]

Ингибиторы семейства I10

Протеиновые ингибиторы семейства I10 найдены только у представителей *Bacteria*. Они ингибируют сериновые пептидазы, такие как субтилизин, химотрипсин и панкреатическая эластаза, но при этом неактивны в отношении трипсина [32]. Типичным представителем семейства является мариностагин из *Alteromonas* sp. Ингибитор синтезируется в качестве предшественника — полипептида длиной от 45 до 100 аминокислотных остатков с реактивным центром, расположенным на С-конце. Во время созревания 11-й или 12-й аминокислотный остаток С-конца высвобождается в процессе протеолитического расщепления, и пептид подвергается посттрансляционной модификации путем образования двух эфирных связей между Thr₃-Asp₉ и Ser₈-Asp₁₁ (рис. 5).

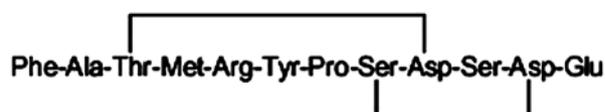


Рис. 5. Эфирные связи Thr₃-Asp₉ и Ser₈-Asp₁₁, стабилизирующие молекулу мариностагинов

Эти связи стабилизируют пространственную структуру и существенны для проявления ингибирующей активности [33]. Поэтому аминокислотные остатки, образующие эфирные связи, консервативны для всех мариностагинподобных ингибиторов.

Несмотря на свои небольшие размеры, мариностагин является достаточно активным ингибитором субтилизина ВРН ($K_i = 10^{-9}$ М). Биологическая роль мариностагинподобных пептидов в качестве ингибиторов пептидаз неизвестна, но, поскольку эти протеины эффективно ингибируют такие пептидазы, как химотрипсин и панкреатическая эластаза, возможно их практическое применение для лечения заболеваний, сопровождающихся системной гиперактивацией общего и специфического протеолиза, когда эндогенные ингибиторы не компенсируют избыток пептидаз (гастроэнтерологические и другие воспалительные заболевания) [34].

Ингибиторы семейства I11

Распространение генов, кодирующих ингибиторы I11, принадлежащие к семейству экотина, ограничивается геномами бактерий и простейших. Среди бактерий, кроме некоторых исключений (*Acidobacteria*, *Cyanobacteria* и *Planctomycetes*), экотинподобные протеины обнаружены исключительно

у различных видов типа *Proteobacteria*. Так, в геномах представителей всех известных видов рода *Yersinia* содержатся гены синтеза экотинподобных протеинов. Хотя у микроорганизмов из родов *Burkholderia*, *Rickettsia* и *Shewanella* гены синтеза экотинподобных протеинов встречаются наиболее часто, существуют близкородственные их виды, у которых такие гены отсутствуют [16].

Экотин был выделен из клеточного экстракта *E. coli* и охарактеризован как гомодимерный протеин с молекулярной массой 38 кДа, устойчивый к нагреванию и стабильный при pH 1,0. Он является активным ингибитором трипсина, химотрипсина, химазы из гепариноцитов крысы и эластазы из поджелудочной железы (табл. 2, рис. 6).

Очевидно, что ингибирующий спектр экотина ограничен сериновыми пептидазами семейства S1, однако потенциальными мишенями его действия являются разнообразные энзимы, такие как фактор Ха, чело-

веческая нейтрофильная эластаза, калликреин, урокиназа, фактор XIIa, коллагеназа краба-скрипача и гранзим В [35, 36]. Экотин обладает уникальным связывающим механизмом. Специфичность ингибирования обусловлена формированием гетеротетрамерного комплекса с целевой пептидазой. Каждый из мономеров, входящих в состав гомодимера экотина, связывает пептидазу с помощью первичных и вторичных взаимодействий [37]. Основные сайты связывания находятся на выступающих над поверхностью молекулы петлях (рис. 6) и взаимодействуют с активным центром пептидазы по субстратподобному механизму Laskowski [10]. При субмикромольных концентрациях димер ингибитора связывается с двумя молекулами трипсина со своих противоположных концов, таким образом формируется гетеротетрамер с двойной осью симметрии. Вторичный сайт связывания — меньший по размеру и взаимодействует с пептидазой по уникальному механизму с С-концом молекулы трипсина, т. е. в регионе, расположенном далеко от активного центра. Этот комплекс функционирует как шарнир и позволяет взаимодействовать с различными пептидазами семейства S1.

Благодаря уникальной структуре и своеобразному механизму ингибирования этот протеин является удобной мишенью для протеиновой инженерии. Точечная мутация, в результате которой P1-остаток метионина заменяется аргинином, делает экотин эффективным ингибитором тромбина и фактора XI [38]. Измененный таким образом экотин нашел применение для выделения и характеристики протеинов с конформацией трипсина (химотрипсина) [39]. С другой стороны, происходит скрининг экотинподобных ингибиторов с узкой специфичностью в отношении различных сериновых пептидаз [40, 41]. Такие сконструированные ингибиторы

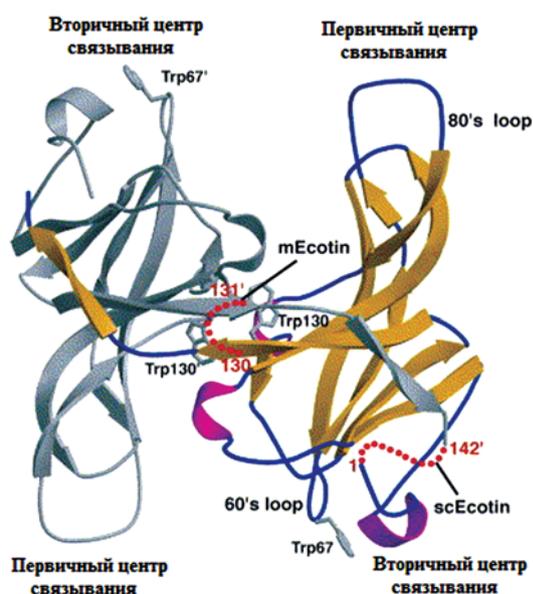


Рис. 6. Гомодимерная структура экотина [35]

Таблица 2. Константы ингибирования ортологов (гомологов) экотина, выделенных из различных микроорганизмов, по отношению к некоторым сериновым пептидазам

Пептидаза	K_i экотина <i>Escherichia coli</i> , нМ	K_i экотина <i>Yersinia pestis</i> , нМ	K_i экотина <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , нМ	K_i экотина <i>Pantoea citrea</i> , нМ
Нейтрофильная эластаза	0,012±0,004	0,016±0,003	<0,005	8,8±0,4
Катепсин G	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Трипсин	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Химотрипсин	<0,002	<0,002	<0,002	0,005±0,002
Фактор Ха	0,0046±0,001	0,23±0,01	0,007±0,001	0,22±0,005
Тромбин	770±80	1400±100	1500±100	24000±3000
Урокиназа	670±20	13900±1500	7,8±0,4	1,1±0,2

потенциально могут иметь широкий спектр биомедицинского применения с целью управления процессами с участием сериновых пептидаз, включая свертывание крови, фибринолиз и бесконтактную активацию.

У кишечной палочки и, вероятно, у всех других видов бактерий, экспрессирующих экотин, этот протеин транслоцируется в периплазматическое пространство. На основании установленной широкой ингибирующей специфичности в отношении сериновых пептидаз желудочно-кишечного тракта и отсутствия ингибирования бактериальных эндогенных энзимов был сделан вывод, что экотин защищает бактерии от действия внешних протеаз в кишечнике млекопитающих [42]. Это утверждение может быть справедливо также для экотин-подобных протеинов других видов *Enterobacteriaceae*, которые не подвержены воздействию панкреатических пептидаз, но не объясняет функции экотина у многих других видов, включая патогены человека, такие как *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia*, *Rickettsia* и *Yersinia* spp. Поэтому предположили [43], что экотин может защищать протеины от пептидаз, синтезирующихся в нейтрофилах — иммунных клетках, которые представляют первую линию защиты от бактериальной инвазии. Эта гипотеза была подтверждена выявлением того факта, что экотин защищает кишечную палочку от бактерицидного действия нейтрофильной эластазы. Помимо защиты от бактерицидной активности хозяина экотин может иметь и другие функции, поскольку гены, кодирующие ортологичные протеины, присутствуют у растительных патогенов и симбионтов, а также у некоторых непатогенных бактерий. С эволюционной точки зрения, вполне вероятно, что гены экотина появились у *Protobacteria* и были переданы другим типам бактерий путем случайного горизонтального переноса. У этих новых хозяев экотин мог не выполнять какие-либо функции. Очевидно представители рода *Rickettsia* находятся в процессе удаления гена экотина, поскольку у нескольких видов присутствует псевдоген экотина, а в качестве облигатных внутриклеточных возбудителей эти бактерии не подвержены действию протеолитических энзимов, вырабатываемых иммунными клетками [16].

Ингибиторы семейства I16

Кроме ингибитора субтилизина, выделенного из *Streptomyces albogriseolus* (SSI) в 1972 г. [44], в семейство I16 входит еще

несколько ингибиторов, присутствующих в ряде видов *Streptomyces*. SSI-протеины являются активными ингибиторами ($K_i \approx 1$ нМ) сериновых пептидаз семейств субтилизина (S8) и химотрипсина/трипсина (S1), в том числе бактериальных, грибных и эукариотических субтилизинов, плазмина, химотрипсинподобных эндогенных пептидаз из *Streptomyces* [45, 46]. Кроме того, некоторые SSI сильно ингибируют гризелизин, энзим из *Streptomyces griseus*, принадлежащий к семейству металлопептидаз (M4), но при этом ни один из протеинов не ингибирует термолизин. Ингибирование происходит через тот же реактивный сайт, что и для ингибиторов субтилизина [47]. SSI-подобный ингибитор из *S. caespitosus*, кроме субтилизина, подавляет эндогенную металлопептидазу (ScNP), принадлежащую к семейству метцинков [48]. Гомодимерный двуголовый ингибитор (рис. 7) образует стабильный комплекс с пептидазой ScNP и субтилизином BPN в соотношении 2:2:2.

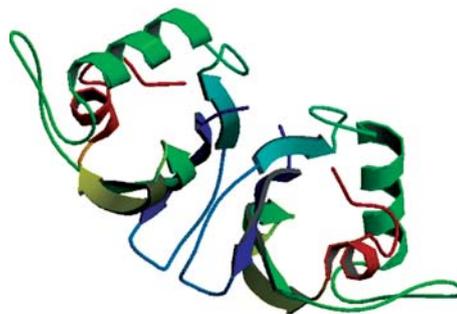


Рис. 7. Структура ингибитора субтилизина из *Streptomyces albogriseolus* (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3SSI>)

SSI-подобные протеины ингибируют пептидазы путем внедрения в их активный центр своей петли по субстратподобному механизму. Как и для ингибиторов других семейств, подчиняющихся механизму Laskowski [10], остаток в положении P_1 является определяющим для специфичности SSI. Интересно, что в этом положении в петлях реактивного сайта преобладают остатки Lys, Arg и Met. Анализ филогенетических связей дал возможность предположить, что SSI-подобные протеины с остатками Arg и Met возникали в процессе эволюции на независимых линиях от протеинов, содержащих Lys в положении P_1 [45]. Ограниченные вариации аминокислотных остатков дают основание предположить, что подобные пептидазы у различных видов бактерий являются мишенью для

ингибиторов SSI. Следует отметить, что последовательность аминокислот и укладка протеиновой молекулы вокруг связей реактивного сайта аналогичны таким, которые наблюдаются в семействе I1 [49], но при этом наличие различных конформационных структур этих протеинов свидетельствует против общего эволюционного происхождения представителей двух семейств.

В отличие от других семейств ингибиторов пептидаз бактериального происхождения, в которых гомологи рассредоточены по различным филогенетическим линиям, распределение SSI-протеинов строго ограничено порядком *Actinomycetales* типа *Actinobacteria* и их функция достаточно хорошо изучена. На основании анализа фенотипа мутантных штаммов, лишенных SSI или его целевой пептидазы, Taguchi с соавт. [50, 51] предположили, что SSI-подобные протеины играют важную роль в физиологической и (или) морфологической регуляции у *Streptomyces*. Гипотеза была полностью подтверждена данными [52] о широком распространении гена SSI-протеинов у видов *Streptomyces*: в 31 из 33, у которых был полностью секвенирован геном. По-видимому, одним из способов физиологической регуляции посредством SSI-протеинов является контроль протеолитической активации эндогенными пептидазами транслугтаминазы — внеклеточного энзима, который сшивает протеины поперечными связями с образованием высокомолекулярных агрегатов [53–55].

Ингибиторы семейства I31

Эквистатин — ингибитор, изолированный из морской актинии *Actinia equine* [56]. За исключением теоретически рассчитанного протеина, кодируемого локусом CBU0898 в *Coxiella burnetii*, распространение эквистатинподобных ингибиторов среди прокариот ограничено. Поскольку ингибитор проявляет сходство с тиреоглобулином типа 1, его также относят к тиропинам [57]. Тиропины ингибируют преимущественно папаинподобные цистеиновые пептидазы (C1), но при этом описано ингибирование ими аспартильной пептидазы катепсина D и металлопептидаз. *C. burnetii*, являющийся облигатным внутриклеточным патогеном, предположительно путем горизонтальной передачи от эукариотических хозяев приобрел ген, кодирующий синтез эквистатинподобных ингибиторов. Биоинформационный анализ предполагает, что продукт экспрессии локуса CBU0898 может проявлять ингибирующую активность. К сожалению, ниче-

го не известно о биологической роли этого потенциального ингибитора в жизненном цикле и патогенности возбудителя ку-лихорадки (или коксииеллеза), который рассматривается в качестве потенциального биологического оружия [58].

Ингибиторы семейства I34

Первый ингибитор данного семейства был выделен в 1974 г. из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [59]. Этот протеин высокоспецифично ингибирует ($K_i < 0,1$ нМ) сахаропепсионаспартильную пептидазу семейства A1. Примечательно, что другие пептидазы этого семейства, такие как пепсин человека, катепсин D и E, япсин из дрожжей, не подвержены влиянию этого ингибитора, но при этом сам ингибитор расщепляется под действием перечисленных энзимов [60]. Ингибитор сахаропепсина — протеин, состоящий из 68 аминокислотных остатков, имеет неупорядоченную структуру в отсутствие взаимодействия с сахаропепсином [61]. Однако, во время нахождения в щели каталитического центра (рис. 8) ингибитор претерпевает конформационные изменения, приобретая структуру α -спирали от Asn₂ to Met₃₂ [62]. Механизм ингибирования сахаропепсина таков: после попадания в активный центр энзима и последующих конформационных изменений ингибитора его ϵ -аминогруппа Lys₁₈ образует водородную связь с кислородом карбонильной группы Asp₃₂ пептидазы и Asp₂₂ самого ингибитора. Атом кислорода второй карбонильной группы Asp₂₂ ингибитора формирует связь с ОН-группой фенольного кольца Tyr₇₅ сахаропепсина — консервативного остатка, который есть практически у всех эукариотических аспартильных пептидаз. В конечном итоге протеолитическая активность сахаропепсина полностью блокируется. Установлено также, что С-концевая часть ингибитора не обладает ингибирующей активностью [62].

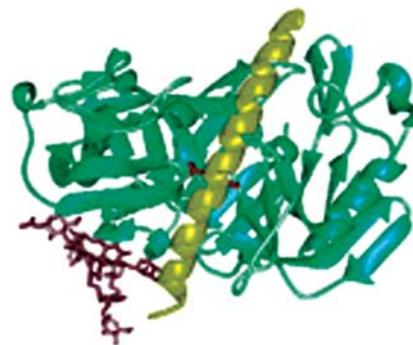


Рис. 8. Структура комплекса ингибитора (желтый цвет) и сахаропепсина [62]

Природные ингибиторы аспартильных пептидаз встречаются довольно редко. Поэтому структура и механизм ингибитора сахаропепсина может служить отправной точкой для разработки новых ингибиторов аспартильных пептидаз [61].

Ингибиторы семейства I36

Это семейство представлено одним протеином, выделенным в 1979 г. из *Streptomyces nigrescens* ТК-23 и названным ингибитором металлопептидаз из *Streptomyces* (SMPI) [63]. До сих пор не был идентифицирован ни один из ортологичных протеинов. SMPI содержат 102 аминокислотных остатка и две малые дисульфидные петли между шестым и седьмым остатками [64]. Полипептидная цепь SMPI представлена двумя бета-листами (рис. 9), каждый из которых состоит из четырех антипараллельных бета-спиралей [65].

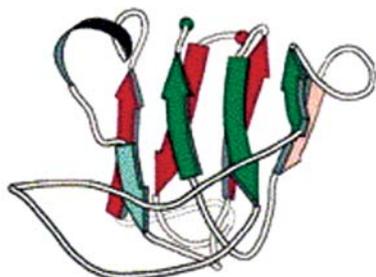


Рис. 9. Структура SMPI [65]

Эти протеины ингибируют активность металлопептидаз из семейства M4, образуя наиболее устойчивые комплексы с эластазой из *Pseudomonas aeruginosa* и гризелизином ($K_i \approx 2$ рМ), а также с термолизином ($K_i = 1,14 \cdot 10^{-10}$ М) [63, 66]. Реактивный сайт этих ингибиторов — пептидная связь между остатками Cys₆₄ и Val₆₅, находящаяся на поверхности выступающей петли. Замена валина на другие остатки, которые не соответствуют субстратной специфичности термолизина (например, изолейцин, лейцин, фенилаланин, тирозин), приводит к снижению ингибирующей активности SMPI и быстрой их деградации [67]. Интересно, что в отличие от других протеиновых ингибиторов металлопептидаз, взаимодействие SMPI с энзимом подчиняется стандартному механизму ингибирования, который характерен для ингибиторов сериновых пептидаз [10].

Ингибиторы семейства I38

Первый ингибитор семейства I38 был изолирован из периплазмы *Erwinia chrysanthemi* [68]. Было показано, что этот про-

теин ингибирует пептидазы А, В и С у представителей рода *Erwinia*, а также сerratализин из бактерий рода *Serratia*. Другой представитель семейства априн, выделенный из *Pseudomonas aeruginosa* [69], ингибирует только собственную пептидазу и не взаимодействует с другими представителями подсемейства метцинков: коллагеназой и желатиназами А и В. Семейство состоит из сравнительно небольших протеинов (около 11 кДа), которые строго (K_i находится в пиколярном диапазоне) ингибируют металлопептидазы подсемейства M10B (метцинки), в том числе сerratализин из *Serratia marcescens*, щелочную пептидазу из *Pseudomonas aeruginosa* и внеклеточную металлопептидазу из *E. chrysanthemi*. Гены, кодирующие протеины, подобные априну, нашли у 17 различных видов *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*. Поскольку эти протеины локализируются в периплазматическом пространстве, предполагают [68], что они защищают клетки от случайного протеолиза во время секреции металлопептидаз. Это предположение подтверждается положением генов пептидаз и ингибиторов в пределах одной транскрипционной единицы. Подобная организация генов наблюдается и в случае стафопайна и стафостатина, цистеиновой пептидазы, а также ее ингибитора (семейства I57 и 58).

Априн (рис. 10) состоит из восьми стабилизированных дисульфидными связями антипараллельных бета-баррелей с реактивным сайтом, расположенным на N-концевой цепи, которая представляет собой связанную с баррелями однооборотную альфа-спираль [70]. Структура априна напоминает структуру стафостатина и, следовательно, эти семейства входят в один и тот же клан ингибиторов (IK). Исследование третичной структуры комплекса априн-псевдолизин показало, что N-конец ингибитора образует

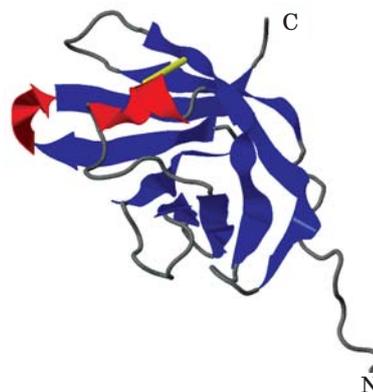


Рис. 10. Структура априна из *Pseudomonas aeruginosa* [70]

координационную связь с ионом цинка каталитического центра, в результате чего этот комплекс стабилизируется и хелатирует металл [71]. Подобный механизм взаимодействия консервативен и наблюдается между матриксными металлопептидазами (семейство M10A) и их родственными ингибиторами TIMP-1 и TIMP-2, хотя гомология между априном и этими ингибиторами отсутствует. Это подтверждает теорию о том, что протеиновые ингибиторы метцинков имеют сходный механизм ингибирования. Тем не менее, априн не ингибирует ММП, а TIMPs, в свою очередь, не оказывают ингибирующего действия на пептидазы, являющиеся мишенью апринов. Кроме того, активность металлопептидаз других подсемейств, отличных от M10B, не подавляется апринами [72]. Эти данные позволяют предположить, что априны эволюционировали в сторону ингибирования бактериальных металлопептидаз подсемейства M10B.

Ингибиторы семейства I39

Это семейство охватывает большое количество гомологичных протеинов, встречающихся в виде мономеров, гомодимеров или гомотетрамеров. Другое его название — «семейство альфа-2-макроглобулина». Еще в 1973 г. исследователи [73] заметили, что альфа-2-макроглобулин человека специфически взаимодействует со множеством эндопептидаз. При этом образовывались комплексы, в которых активность пептидазы сильно ингибировалась при действии на высокомолекулярные субстраты, но практически не снижалась при взаимодействии с низкомолекулярными. Было высказано предположение, что происходит расщепление пептидной связи высоковосприимчивой области молекулы макроглобулина, что приводит к дальнейшим конформационным изменениям, в результате которых молекула эндопептидазы попадает в ловушку внутри молекулы макроглобулина. Последующие исследования подтвердили это предположение. Работая в качестве «молекулярной ловушки», альфа-макроглобулин является универсальным ингибитором эндопептидаз независимо от того, к какому каталитическому семейству те принадлежат [74]. У млекопитающих альфа-2-макроглобулин функционирует как эндопептидазосвязывающая молекула широкого спектра действия, которая взаимодействует с эндопептидазами плазмы крови. Гомологи альфа-2-макроглобулина обнаружены также у беспозвоночных [75]. Существует мнение, что альфа-2-

макроглобулин может быть также составной частью системы защиты макроорганизма от бактериальной инфекции благодаря своей широкой специфичности взаимодействия с эндопептидазами различных патогенов. Мнение о том, что альфа-2-макроглобулин является частью древней иммунной системы, подтверждает также наличие гомологии с компонентами комплемента C3, C4 и C5 [76]. Члены семейства I39 являются самыми распространенными ингибиторами у бактерий, но не у архей. Только один гомолог был определен по геному археи *Methanococcoides burtonii*. У *Bacteria* распространение альфа-макроглобулинподобных гомологичных последовательностей неоднородно, они найдены у 14 из 29 эволюционных типов, в том числе у *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Thermotogae*, *Verrucomicrobia* и *Xenobacteria*. Вместе с тем гены, кодирующие альфа-макроглобулинподобные протеины, являются наиболее распространенными у *Proteobacteria*, где они встречаются у представителей пяти эволюционных подразделений (альфа-, бета-, гамма-, дельта и эпсилон-протеобактерий). *Bacteroidetes* стоят на втором месте по частоте выявления гомологов альфа-2-макроглобулина. Интересно, что некоторые виды *Bacteroidetes* содержат множество копий генов альфа-макроглобулина (до 56 у *Pedobacter heparinus*). Таким образом, корреляции между образом жизни бактерий и наличием у них гомологов альфа-2-макроглобулина не установлено, поскольку они встречаются с одинаковой частотой как у свободноживущих видов аутотрофных и сапрофитных видов, так и у возбудителей инфекций многоклеточных организмов. Кроме того, гены гомологов макроглобулина также присутствуют в геномах эволюционно древних видов гипертермофильных хемолитотрофов (*Thermotogae*), фотосинтетических аноксигенных (*Chloroflexi*) и фототрофных цианобактерий. Полученные результаты [77] опровергают мнение о том, что гены альфа-макроглобулинов, найденные у видов бактерий, колонизирующих многоклеточных хозяев, возникли в результате нескольких горизонтальных переносов. Это позволяет предположить, что гомологи альфа-макроглобулина играют важную роль в защите бактерий от протеолитических энзимов, попадающих в периплазматическое пространство через их внешнюю мембрану в результате действия

системы комплемента сложных и/или катионных антибактериальных пептидов и протеинов. Недавние исследования показали, что альфа-макроглобулинподобный протеин *E. coli* в действительности является периплазматическим протеином, который эффективно подавляет нейтрофильную эластазу человека [78]. Существует также мнение, что роль бактериального альфа-макроглобулина заключается в защите периплазматического пространства от действия собственных пептидаз бактерии.

Благодаря специфическому свойству этих протеинов, которое заключается в связывании активных молекул эндопептидаз, альфа-2-макроглобулины нашли применение в биотехнологии для выделения эндопептидаз из неочищенных биологических препаратов [79] и для титрования их активных центров [80].

Ингибиторы семейства I42

Эти протеины ингибируют цистеиновые пептидазы семейства С1 (папаина) [81, 82]. Первый ингибитор семейства I42 (chagasin) был выделен сравнительно недавно из *Trypanosoma cruzi* — возбудителя болезни Шагаса (американский трипаносомоз) [83], а также из некоторых других простейших [84, 85]. К настоящему времени в результате полного секвенирования геномов гомологичные шагазину (chagasin) аминокислотные последовательности протеинов найдены также как у свободноживущих, так и у патогенных представителей прокариот (*Bacteria*, *Archaea*). У архей распространение гомологичных последовательностей ограничено представителями метанотрофных микроорганизмов. Большинство бактериальных шагазинподобных протеинов являются секреторными. Пока нет выделенных и охарактеризованных прокариотических шагазинов и достоверных сведений об их функциях. Предполагают, что у некоторых свободноживущих бактерий эти протеины могут синтезироваться для защиты от действия собственных энзимов; для патогенов наличие этих протеинов может играть определенную роль как в инфекционном процессе, так и в системе защиты от пептидаз хозяина [16].

Ингибиторы семейства I51

В состав этого семейства входят ингибиторы сериновых карбоксипептидаз. Первый представитель — протеин, ингибирующий дрожжевую карбоксипептидазу Y (CPY) (рис. 11), был выделен из дрожжей в 1974 г. [86]. CPY имеет высокую степень родства

с последовательностями фосфатидилэтаноламинсвязывающих протеинов (РЕВР), которые ингибируют различные киназы [87]. Вероятно, многочисленные гомологичные последовательности протеинов, найденные у бактерий и архей, представляют собой РЕВРs. Тем не менее, биологические функции CPY- и РЕВР-подобных протеинов у прокариот пока неясны.

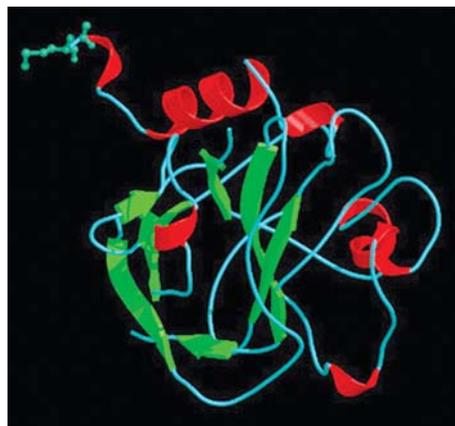


Рис. 11. Структура ингибитора дрожжевой карбоксипептидазы Y (CPY) из *Saccharomyces cerevisiae* (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/structure?mid=I51.001>)

Исследование структуры комплекса ингибитора и карбоксипептидазы Y [87] показывает, что их взаимодействие имеет три особенности, за счет которых механизм действия CPY отличается от механизма Laskowski [10]: 1) перекрытие активного центра пептидазы не субстратподобным образом; 2) включение N-концевой ацетильной группы в ингибирование пептидазы; 3) наличие множественных центров связывания с пептидазой. Принимая во внимание низкую аффинность мутантных протеинов с удаленным N-концом, вполне вероятно, что ингибитор связывается сначала через свой реактивный сайт, а затем подключается взаимодействие через вторичный сайт, в результате чего стабилизируется протеиновый комплекс.

Ингибиторы семейства I57, I58

Основными представителями этих семейств являются стафостатины А и В — протеины с уникальным механизмом действия, ингибирующие цистеиновые пептидазы (С47). Каждый из этих цитоплазматических протеинов синтезируется из одного оперона совместно с соответствующей им целевой внеклеточной пептидазой (стафопаин)

[88]. Путем анализа реципрокных взаимодействий между представителями семейств стафопаина и стафостатина было показано, что транскрибируемая совместно с ингибитором пептидаза и является его мишенью. Однако ингибитор, выделенный от одного из видов стафилококка, может ингибировать стафопаин другого, хотя значения констант ингибирования, как правило, при этом выше, а ингибирование происходит только в том случае, если оба протеина принадлежат к одной и той же ортологичной подгруппе: либо стафопаин А/стафостатин А (α -группа), либо стафопаин В/стафостатин В (β -группа). Это указывает на то, что обе подгруппы возникли в результате родового аллельного дублирования с последующей параллельной эволюцией пар пептидаза/ингибитор. Тесная коэволюция, вероятнее всего, — результат известного вредного влияния неконтролируемого действия стафопаина.

На основании исследования кристаллических структур стафостатина В в комплексе как с неактивной мутантной формой стафопаина В, так и с активным энзимом, был изучен механизм ингибирования [89]. Стафопаин В попадает в щель активного центра в такой же комплементарности к нему, что и субстрат, у которого остатки Pe-Gly-Thr-Ser находятся в положениях P_2 и P_2'' , однако при этом расщепление пептида не происходит.

Ингибиторы семейства I69

Ингибитор стрептопаина SPI (C1) представляет собой гомолог пропептида этой цистеиновой пептидазы. Оба протеина синтезируются бактерией *Streptococcus pyogenes* [90]. Ген SPI расположен за геном стрептопаина и аналогично стафопаинам и стафостатинам находится в одном опероне и совместно регулируется. Изучение третичной структуры зимогена стрептопаина показало, что этот пропептид имеет уникальную конформацию и механизм инактивации. Предшественник стрептопаина неактивен из-за размещенной в активном центре петли пропептида, которая вытесняет каталитически активный гистидин [91]. Предполагают, что SPI действует по аналогичному механизму. Хотя сходное генетическое расположение пептидазы и ингибитора существует у стафилококков, этот случай — первый пример того, что молекула ингибитора

является структурным гомологом родственной пептидазы и генетически связана с ее геном. Биологическая роль этой системы состоит в том, что таким образом бактерия может контролировать внутриклеточную активность своих пептидаз.

Ингибиторы семейства I78

Показано, что ингибитор эластазы, выделенный из *Aspergillus flavus*, ингибирует эластолитические сериновые пептидазы (S1 и S8), но не влияет на металлопептидазы со схожей субстратной специфичностью [92]. Показано, что ингибитор из *A. flavus* уменьшает кровотечение в легких инфицированных крыс и поэтому может найти применение для лечения аспергиллезов. В бактериальных геномах было выявлено свыше 30 гомологов — большинство из класса *Actinobacteria* и только 1 гомолог из класса *Actinobacteria* — *Kineococcus radiotolerans*. Однако ни один из этих гомологов не был охарактеризован биохимически [16].

Таким образом, данные литературы о протеиновых ингибиторах пептидаз, синтезируемых различными видами микроорганизмов, свидетельствуют о разнообразии их свойств, структурных особенностей и функций. Показано, что некоторые бактерии и археи приобрели гены, кодирующие различные виды ингибиторов пептидаз. На основании гомологии последовательностей аминокислот, согласно базе данных MEROPS, протеиновые ингибиторы сгруппированы в 77 семейств, 29 из которых включают ингибиторы микроорганизмов. Понимание характера взаимодействия протеинового ингибитора с энзимами является предпосылкой для разработки новых подходов к дизайну синтетических ингибиторов, которые могут впоследствии применяться как лекарственные средства. Некоторые протеиновые ингибиторы, например альфа-2-макроглобулины и их гомологи, используются в биотехнологии для выделения эндопептидаз из неочищенных биологических препаратов и для титрования их активных центров. Протеиновые ингибиторы, эффективно подавляющие активность субтилизина, химотрипсина, панкреатической эластазы, находят практическое применение для лечения таких заболеваний, как эмфизема легких, артрит, панкреатит, тромбоз, гипертония, мышечная дистрофия, рак.

ЛИТЕРАТУРА

1. *De Filippis V., Colombo G., Russo I. et al.* Probing the hirudin–thrombin interaction by incorporation of noncoded amino acids and molecular dynamics simulation // *Biochemistry*. — 2002. — V. 41. — P. 13556–13569.
2. *Lomas D. A., Lourbakos A., Cumming S. A., Belorgey D.* Hypersensitive mousetraps, alpha1-antitrypsin deficiency and dementia // *Biochem. Soc. Trans.* — 2002. — V. 30. — P. 89–92.
3. *Bitoun E., Chavanas S., Irvine A.D. et al.* Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families // *J. Invest. Dermatol.* — 2002. — V. 118. — P. 352–361.
4. *Ritchie B. C.* Protease inhibitors in the treatment of hereditary angioedema // *Transfus. Apheresis. Sci.* — 2003. — V. 29. — P. 259–267.
5. *Lehesjoki A. E.* Molecular background of progressive myoclonus epilepsy // *EMBO J.* — 2003. — V. 22. — P. 3473–3478.
6. *Krol J., Kopitz C., Kirschenhofer A. et al.* Inhibition of intraperitoneal tumor growth of human ovarian cancer cells by bi- and tri-functional inhibitors of tumor-associated proteolytic systems // *Biol. Chem.* — 2003. — V. 384. — P. 1097–1102.
7. *McKay T. R., Bell S., Tenev T. et al.* Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy // *Oncogene*. — 2003. — V. 22. — P. 3539–3547.
8. *Samac D. A., Smigocki A. C.* Expression of oryzacystatin I and II in alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode // *Phytopathology*. — 2003. — V. 93. — P. 799–804.
9. *Telang M., Srinivasan A., Patankar A. et al.* Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* // *Phytochemistry*. — 2003. — V. 63. — P. 643–652.
10. *Laskowski M. J., Kato I.* Protein inhibitors of proteinases // *Annu. Rev. Biochem.* — 1980. — V. 49. — P. 593–626.
11. *Rawlings N. D., Barrett A. J., Bateman A.* MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors // *Nucl. Acids Res.* — 2012. — V. 40. — P. D343–D350.
12. *Otlewski J., Jelen F., Zakrzewska M., Oleksy A.* The many faces of protease–protein inhibitor interaction // *EMBO J.* — 2005. — V. 24. — P. 1303–1310.
13. *Rzychon M., Filipek R., Sabat A. et al.* Staphostatins resemble lipocalins, not cystatins in fold // *Prot. Sci.* — 2003. — V. 12. — P. 2252–2256.
14. *Callus B. A., Vaux D. L.* Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical // *Cell Death Differ.* — 2007. — V. 14, N 1. — P. 73–78.
15. *Rzychon M., Chmiel D., Stec-Niemczyk J.* Modes of inhibition of cysteine proteases // *Acta Biochim. Pol.* — 2004. — V. 51, N 4. — P. 861–873.
16. *Kantyka T., Rawlings N. D., Potempa J.* Prokaryote-derived protein inhibitors of peptidases: a sketchy occurrence and mostly unknown function // *Biochimie*. — 2010. — V. 92, N 11. — P. 1644–1656.
17. *Shiga T., Wajima Z., Inoue T., Sakamoto A.* Aprotinin in major orthopedic surgery: a systematic review of randomized controlled trials // *Anesth. Analg.* — 2005. — V. 101, N 6. — P. 1602–1607.
18. *Hunt L. T., Dayhoff M. O.* A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1980. — V. 95. — P. 864–871.
19. *Carrell R., Travis J.* Alpha1-antitrypsin and the serpins: variation and countervariation // *Trends Biochem. Sci.* — 1985. — V. 10. — P. 20–24.
20. *Irving J. A., Pike R. N., Lesk A. M., Whisstock J. C.* Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function // *Genome Res.* — 2000. — V. 12. — P. 1845–1864.
21. *Roberts T. H., Hejgaard J., Saunders N. F. et al.* Serpins in unicellular *Eukarya*, *Archaea* and *Bacteria*: sequence analysis and evolution // *J. Mol. Evol.* — 2004. — V. 59, N 4. — P. 437–447.
22. *Irving J. A., Steenbakkers P. J., Lesk A. M. et al.* Serpins in prokaryotes // *Mol. Biol. Evol.* — 2002. — V. 19, N 11. — P. 1881–1890.
23. *Kang S., Barak Y., Lamed R. et al.* The functional repertoire of prokaryote cellulosomes includes the serpin superfamily of serine proteinase inhibitors // *Mol. Microbiol.* — 2006. — V. 60, N 6. — P. 1344–1354.
24. *Fulton K. F., Buckle A. M., Cabrera L. D. et al.* The high resolution crystal structure of a native thermostable serpin reveals the complex mechanism underpinning the stressed to relaxed transition // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280. — P. 8435–8442.
25. *Irving J. A., Cabrera L. D., Rossjohn J., Pike R. N. et al.* The 1.5 Å crystal structure of a prokaryote serpin: controlling conformational change in a heated environment //

- Structure. — 2003. — V. 11. — P. 387–26.397.
26. *Cabrita L. D., Irving J. A., Pearce M. C. et al.* Aeropin from the extremophile *Pyrobaculum aerophilum* bypasses the serpin misfolding trap // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282, N 37. — P. 26802–26809.
27. *Khan M. S., Singh P., Azhar A. et al.* Serpin inhibition mechanism: a delicate balance between native metastable state and polymerization [Электронный ресурс] // *J. Amino Acids.* — 2011. — V. 2011. — Режим доступа до журн.: <http://www.hindawi.com/journals/jaa/2011/606797/>.
28. *Li Y., Hu Z., Jordan F., Inouye M.* Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants // *J. Biol. Chem.* — 1995. — V. 270. — P. 25127–25132.
29. *Kojima S., Minagawa T., Miura K.* The propeptide of subtilisin BPN' as a temporary inhibitor and effect of an amino acid replacement on its inhibitory activity // *FEBS Lett.* — 1997. — V. 411. — P. 128–132.
30. *Gallagher T., Gilliland G., Wang L., Bryan P.* The prosegment-subtilisin BPN' complex: crystal structure of a specific «foldase» // *Structure.* — 1995. — V. 3. — P. 907–914.
31. *Maier K., Muller H., Tesch R. et al.* Primary structure of yeast proteinase B inhibitor 2 // *J. Biol. Chem.* — 1979. — V. 254. — P. 12555–12561.
32. *Kanaori K., Kamei K., Taniguchi M. et al.* Solution structure of marinostatin, a natural ester-linked protein protease inhibitor // *Biochemistry.* — 2005. — V. 44. — P. 2462–2468.
33. *Taniguchi M., Kamei K., Kanaori K. et al.* Relationship between temporary inhibition and structure of disulfide-linkage analogs of marinostatin, a natural ester-linked protein protease inhibitor // *J. Pept. Res.* — 2005. — V. 66. — P. 49–58.
34. *Imada C.* Enzyme inhibitors of marine microbial origin with pharmaceutical importance // *Mar. Biotechnol. (NY).* — 2004. — V. 6. — P. 193–198.
35. *Eggers C. T., Wang S. X., Fletterick R. J., Craik C. S.* The role of ecotin dimerization in protease inhibition // *J. Mol. Biol.* — 2001. — V. 308. — P. 975–991.
36. *McGrath M. E., Gillmor S. A., Fletterick R. J.* Ecotin: lessons on survival in a protease-filled world // *Prot. Sci.* — 1995. — V. 4, N 2. — P. 141–148.
37. *Yang S. Q., Wang C. I., Gillmor S. A. et al.* Ecotin: a serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites // *J. Mol. Biol.* — 1998. — V. 279, N 4. — P. 945–957.
38. *Jin L., Pandey P., Babine R. E., Gorga J. C. et al.* Crystal structures of the FXIa catalytic domain in complex with ecotin mutants reveal substrate-like interactions // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280. — P. 4704–4712.
39. *Sathler P. C., Craik C. S., Takeuchi T. et al.* Engineering ecotin for identifying proteins with a trypsin fold // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2010. — V. 160. — P. 2355–2365.
40. *Stoop A. A., Craik C. S.* Engineering of a macromolecular scaffold to develop specific protease inhibitors // *Nat. Biotechnol.* — 2003. — V. 21. — P. 1063–1068.
41. *Stoop A. A., Joshi R. V., Eggers C. T., Craik C. S.* Analysis of an engineered plasma kallikrein inhibitor and its effect on contact activation // *Biol. Chem.* — 2010. — V. 391. — P. 425–433.
42. *Chung C. H., Ives H. E., Almeda S., Goldberg A. L.* Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases // *J. Biol. Chem.* — 1983. — V. 258. — P. 11032–11038.
43. *Eggers C. T., Murray I. A., Delmar V. A. et al.* The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase // *Biochem J.* — 2004. — V. 379. — P. 107–118.
44. *Murao S., Sato S.* S-SI, a new alkaline protease inhibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253 // *Agric. Biol. Chem.* — 1972. — V. 36. — P. 160–163.
45. *Taguchi S., Kojima S., Terabe M. et al.* Molecular phylogenetic characterization of *Streptomyces* protease inhibitor family // *J. Mol. Evol.* — 1997. — V. 44, N 5. — P. 542–551.
46. *Taguchi S., Yamada S., Kojima S., Momose H.* An endogenous target protease, SAM-P26, of *Streptomyces* protease inhibitor (SSI): primary structure, enzymatic characterization, and its interaction with SSI // *J. Biochem.* — 1998. — V. 124. — P. 804–810.
47. *Kumazaki T., Kajiwara K., Kojima S. et al.* Interaction of *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI) with *Streptomyces griseus* metallo-endopeptidase II (SGMP II) // *Ibid.* — 1993. — V. 114. — P. 570–575.
48. *Hiraga K., Suzuki T., Oda K.* A novel double-headed proteinaceous inhibitor for metallo-proteinase and serine proteinase // *J. Biol. Chem.* — 2000. — V. 275. — P. 25173–25179.
49. *Hirono S., Akagawa H., Mitsui Y., Iitaka Y.* Crystal structure at 2.6 Å resolution of the

- complex of subtilisin BPN' with streptomyces subtilisin inhibitor // *J. Mol. Biol.* — 1984. — V. 178. — P. 389–414.
50. *Taguchi S., Odaka A., Watanabe Y., Momose H.* Molecular characterization of a gene encoding extracellular serine protease isolated from a subtilisin inhibitor-deficient mutant of *Streptomyces albogriseolus* S-3253 // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1995. — V. 61. — P. 180–186.
51. *Taguchi S., Suzuki M., Kojima S. et al.* Streptomyces serine protease (SAM-P20): recombinant production, characterization, and interaction with endogenous protease inhibitor // *J. Bacteriol.* — 1995. — V. 177. — P. 6638–6643.
52. *Kato J. Y., Hirano S., Ohnishi Y., Horinouchi S.* The Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI) gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2005. — V. 69. — P. 1624–1629.
53. *Schmidt S., Adolf F., Fuchsbaue H. L.* The transglutaminase activating metalloprotease inhibitor from *Streptomyces mobaraensis* is a glutamine and lysine donor substrate of the intrinsic transglutaminase // *FEBS Lett.* — 2008. — V. 582. — P. 3132–3138.
54. *Zhang D., Wang M., Du G. et al.* Surfactant protein of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor family inhibits transglutaminase activation in *Streptomyces hygroscopicus* // *J. Agric. Food Chem.* — 2008. — V. 56. — P. 3403–3408.
55. *Zhang D., Wang M., Wu J. et al.* Two different proteases from *Streptomyces hygroscopicus* are involved in transglutaminase activation // *Ibid.* — 2008. — V. 56. — P. 10261–10264.
56. *Lenarcic B., Ritonja A., Strukelj B. et al.* Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain // *J. Biol. Chem.* — 1997. — V. 272. — P. 13899–13903.
57. *Mihelic M., Turk D.* Two decades of thyroglobulin type-1 domain research // *Biol. Chem.* — 2007. — V. 388. — P. 1123–1130.
58. *Ghigo E., Pretat L., Desnues B. et al.* Intracellular life of *Coxiella burnetii* in macrophages // *Ann. NY Acad. Sci.* — 2009. — V. 1166. — P. 55–66.
59. *Saheki T., Matsuda Y., Holzer H.* Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast // *Eur. J. Biochem.* — 1974. — V. 47. — P. 325–332.
60. *Phylip L. H., Lees W. E., Brownsey B. G. et al.* The potency and specificity of the interaction between the IA3 inhibitor and its target aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276. — P. 2023–2030.
61. *Green T. B., Ganesh O., Perry K. et al.* IA3, an aspartic proteinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*, is intrinsically unstructured in solution // *Biochemistry.* — 2004. — V. 43. — P. 4071–4081.
62. *Li M., Phylip L. H., Lees W. E. et al.* The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix // *Nat. Struct. Biol.* — 2000. — V. 7. — P. 113–117.
63. *Oda K., Koyama T., Murao S.* Purification and properties of a proteinaceous metalloproteinase inhibitor from *Streptomyces nigrescens* TK-23 // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1979. — V. 571. — P. 147–156.
64. *Murai H., Hara S., Ikenaka T. et al.* Amino acid sequence of Streptomyces metalloproteinase inhibitor from *Streptomyces nigrescens* TK-23 // *J. Biochem.* — 1985. — V. 97. — P. 173–180.
65. *Ohno A., Tate S., Seeram S. S. et al.* NMR structure of the Streptomyces metalloproteinase inhibitor, SMPI, isolated from *Streptomyces nigrescens* TK-23: another example of an ancestral beta gamma-crystallin precursor structure // *J. Mol. Biol.* — 1998. — V. 282. — P. 421–433.
66. *Seeram S. S., Hiraga K., Oda K.* Resynthesis of reactive site peptide bond and temporary inhibition of *Streptomyces* metalloproteinase inhibitor // *J. Biochem.* — 1997. — V. 122. — P. 788–794.
67. *Hiraga K., Seeram S. S., Tate S. et al.* Mutational analysis of the reactive site loop of *Streptomyces* metalloproteinase inhibitor, SMPI // *J. Biochem.* — 1999. — V. 125, N 1. — P. 202–209.
68. *Letoffe S., Delepelaire P., Wandersman C.* Characterization of a protein inhibitor of extracellular proteases produced by *Erwinia chrysanthemi* // *Mol. Microbiol.* — 1989. — V. 3. — P. 79–86.
69. *Feltzer R. E., Trent J. O., Gray R. D.* Alkaline proteinase inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*: a mutational and molecular dynamics study of the role of N-terminal residues in the inhibition of *Pseudomonas* alkaline proteinase // *J. Biol. Chem.* — 2003. — V. 278. — P. 25952–25957.
70. *Arumugam S., Gray R. D., Lane A. N.* NMR structure note: alkaline proteinase inhibitor APRin from *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Biomol. NMR.* — 2008. — V. 40, N 3. — P. 213–217.
71. *Hege T., Feltzer R. E., Gray R. D., Baumann U.* Crystal structure of a complex between

- Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and its cognate inhibitor: inhibition by a zinc-NH₂ coordinative bond // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276. — P. 35087–35092.
72. Gray R. D., Trent J. O. Contribution of a single-turn alpha-helix to the conformational stability and activity of the alkaline proteinase inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* // *Biochemistry*. — 2005. — V. 44. — P. 2469–2477.
73. Barrett A. J., Starkey P. M. The interaction of alpha₂-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism // *Biochem. J.* — 1973. — V. 133. — P. 709–724.
74. Kolodziej S. J., Wagenknecht T., Strickland D. K., Stoops J. K. The three-dimensional structure of the human alpha₂-macroglobulin dimer reveals its structural organization in the tetrameric native and chymotrypsin alpha₂-macroglobulin complexes // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277. — P. 28031–28037.
75. Armstrong P. B., Melchior R., Quigley J. P. Humoral immunity in long-lived arthropods // *J. Insect. Physiol.* — 1996. — V. 42. — P. 53–64.
76. Little T. J., Colbourne J. K., Crease T. J. Molecular evolution of *Daphnia* immunity genes: polymorphism in a gram-negative binding protein gene and an alpha₂-macroglobulin gene // *J. Mol. Evol.* — 2004. — V. 59. — P. 498–506.
77. Budd A., Blandin S., Levashina E. A., Gibson T. J. Bacterial alpha₂-macroglobulins: colonization factors acquired by horizontal gene transfer from the metazoan genome? // *Genome Biol.* — 2004. — V. 5. — Article R38.
78. Doan N., Gettins P. G. alpha-Macroglobulins are present in some gram-negative bacteria: characterization of the alpha₂-macroglobulin from *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283. — P. 28747–28756.
79. Slot L. A., Hendil K. B. alpha₂-Macroglobulin used to isolate intracellular endopeptidases from mammalian cells in culture // *Biochem. J.* — 1988. — V. 255. — P. 437–443.
80. Osada T., Ookata K., Athauda S. B. et al. The active site titration of proteinases by using alpha₂-macroglobulin and high-performance liquid chromatography // *Anal. Biochem.* — 1992. — V. 207. — P. 76–79.
81. Sanderson S. J., Westrop G. D., Scharfstein J. et al. Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens // *FEBS Lett.* — 2003. — V. 542. — P. 12–16.
82. Ljunggren A., Redzynia I., Alvarez-Fernandez M. et al. Crystal structure of the parasite protease inhibitor chagasin in complex with a host target cysteine protease // *J. Mol. Biol.* — 2007. — V. 371. — P. 137–153.
83. Monteiro A. C., Abrahamson M., Lima A. P. et al. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi* // *J. Cell Sci.* — 2001. — V. 114. — P. 3933–3942.
84. Riekenberg S., Witjes B., Saric M. et al. Identification of EhICP1, a chagasin-like cysteine protease inhibitor of *Entamoeba histolytica* // *FEBS Lett.* — 2005. — V. 579. — P. 1573–1578.
85. Kang J. M., Ju H. L., Yu J. R. et al. Cryptostatin, a chagasin-family cysteine protease inhibitor of *Cryptosporidium parvum* // *Parasitology*. — 2012. — V. 139, N 8. — P. 1029–1037.
86. Matern H., Hoffmann M., Holzer H. Isolation and characterization of the carboxypeptidase Y inhibitor from yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1974. — V. 71. — P. 4874–4878.
87. Mima J., Hayashida M., Fujii T. et al. Structure of the carboxypeptidase Y inhibitor IC in complex with the cognate proteinase reveals a novel mode of the proteinase-protein inhibitor interaction // *J. Mol. Biol.* — 2005. — V. 346, N 5. — P. 1323–1334.
88. Dubin G., Wladyka B., Stec-Niemczyk J. et al. The staphostatin family of cysteine protease inhibitors in the genus *Staphylococcus* as an example of parallel evolution of protease and inhibitor specificity // *Biol. Chem.* — 2007. — V. 388. — P. 227–235.
89. Filipek R., Potempa J., Bochtler M. A comparison of staphostatin B with standard mechanism serine protease inhibitors // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280. — P. 14669–14674.
90. Kagawa T. F., O'Toole P. W., Cooney J. C. SpeB-Spi: a novel protease-inhibitor pair from *Streptococcus pyogenes* // *Mol. Microbiol.* — 2005. — V. 57. — P. 650–666.
91. Kagawa T. F., Cooney J. C., Baker H. M. et al. Crystal structure of the zymogen form of the group A *Streptococcus* virulence factor SpeB: an integrin-binding cysteine protease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — V. 97. — P. 2235–2240.
92. Okumura Y., Ogawa K., Uchiya K. et al. Biological properties of elastase inhibitor, AFLEI from *Aspergillus flavus* // *Nippon. Ishinkin. Gakkai. Zasshi.* — 2008. — V. 49. — P. 87–93.

ПРОТЕЇНОВІ ІНГІБИТОРИ ПЕПТИДАЗ, ЯКІ СИНТЕЗУЮТЬСЯ МІКРООРГАНІЗМАМИ

О. В. Мацелюх
Л. Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

В огляді систематизовано дані літератури щодо протеїнових інгібіторів пептидаз, які синтезуються різними видами мікроорганізмів. Показано, що на сьогодні на основі гомології послідовностей амінокислот протеїнові інгібітори згруповано в 77 родин, 29 з яких включають інгібітори мікроорганізмів. Механізм інгібування пептидаз протеїнами може бути пов'язаний або з каталітичним механізмом дії пептидаз, або включати не зв'язане з ним блокування активного центру та його оточення. Структурні елементи протеїнових інгібіторів, відповідальні за зв'язування з пептидазами, здебільшого включають N- або C-кінцеві послідовності, незахищені поліпептидні петлі (ланцюги), які діють незалежно або в комбінації з іншими елементами. Проаналізовано основні властивості, структурні особливості та, де це встановлено, функції протеїнових інгібіторів пептидаз. Оскільки деякі протеїни ефективно інгібують такі пептидази, як субтилізин, хімотрипсин, панкреатичну еластазу, можливе їх практичне застосування для лікування таких захворювань, як емфізема легенів, артрит, панкреатит, тромбоз, підвищення артеріального тиску, м'язова дистрофія, рак. Припускають, що роль бактеріального гомолога альфа-макроглобуліну *Escherichia coli*, який є периплазматичним протеїном, полягає в захисті периплазматичного простору від дії власних пептидаз бактерії. Завдяки специфічній властивості альфа-2-макроглобулінів зв'язувати активні молекули ендопептидаз вони набули застосування в біотехнології для виділення ендопептидаз із неочищених біологічних препаратів та для титрування їхніх активних центрів. У деяких вільноіснуючих бактерій протеїнові інгібітори можуть синтезуватися для захисту від дії власних ензимів, тимчасом як для патогенів наявність цих протеїнів може відігравати певну роль як в інфекційному процесі, так і в системі захисту від пептидаз хазяїна.

Ключові слова: мікроорганізми, протеїнові інгібітори пептидаз.

PROTEIN INHIBITORS SYNTHESISED BY MICROORGANISMS

O. V. Matseliukh
L. D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and
Virology
of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

In a review the literature data on protein inhibitors of peptidases synthesised by different types of microorganisms are systematized. It is shown that at the present time on the basis of amino acid sequence homology protein inhibitors are grouped into 77 families, 29 of which include inhibitors of microorganisms. The mechanism of inhibition of peptidases by proteins may be related to their catalytic mechanism of action or include unrelated blocking of the active site or its surroundings. The structural elements of the protein inhibitors are responsible for binding to the peptidases, mostly include the N- or C-terminal sequences, the unprotected polypeptide loops (chains), which are acting independently or in combination with other elements. The basic properties, structural features and, where it is established, the functions of the protein inhibitors of peptidases are considered. Since some of these proteins effectively inhibit such peptidases as subtilisin, chymotrypsin, pancreatic elastase, their practical use in the treatment of diseases such as emphysema, arthritis, pancreatitis, thrombosis, hypertension, muscular dystrophy, cancer. It is suggested that the role of a bacterial homologue of *Escherichia coli* alpha-macroglobulin, which is a periplasmic protein, is to protect the periplasmic space from the action of bacteria own proteases. Based on the specific properties of alpha-2-macroglobulin to bind endopeptidases active molecules, they are used in biotechnology to isolate endopeptidases from crude biological preparations and titration of its active centers. Some free-living bacteria are able to synthesize protein inhibitors to protect from the effects of its own enzymes, while the presence of these proteins in pathogens may play a certain role both in the infectious process and in the protection of the host proteases.

Key words: microorganisms, protein inhibitors of proteases.