

MICHAŁ BIJAK, MICHAŁ BŁĄŻEJ PONCZEK, PAWEŁ NOWAK

*Katedra Biochemii Ogólnej  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki  
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź  
E-mail: mbijak@biol.uni.lodz.pl*

## PROTEAZY SERYNOWE I ICH KLASYFIKACJA WEDŁUG SYSTEMU MEROPS\*

## WPROWADZENIE

Enzymy proteolityczne (EC 3.4), inaczej nazywane także proteazami, proteinazami lub peptydazami, są to enzymy należące do klasy hydrolaz, które posiadają zdolność do hydrolytycznego rozkładu wiązania peptydowego, czyli proteolizy. Enzymy te zostały zidentyfikowane zarówno w organizmach prokariotycznych jak i eukariotycznych. Wykazano, że typowy genom ludzki zawiera około 2% genów, które odpowiedzialne są za ich kodowanie (PUENTE i współaut. 2005). Enzymy te ze względu na mechanizm proteolizy zostały podzielone na 5 grup: proteazy aspartylowe (zwane te z asparaginowymi), cysteinowe, treoninowe, serynowe oraz metaloproteazy (BARRETT i współaut. 2003).

Proteazy serynowe stanowią prawie jedną trzecią wszystkich enzymów hydrolizujących wiązanie peptydowe. Nazwa ich pochodzi od obecności nukleofilowego aminokwasu, seryny, znajdującej się w miejscu aktywnym enzymu, która atakuje grupę karbonylową

wiązania peptydowego tworząc produkt pośredni reakcji, tzw. acylo-enzym (HEDSTROM 2002). Peptydazy serynowe są białkami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie i występują we wszystkich królestwach organizmów komórkowych, a także obecność zakodowanej dla nich informacji stwierdza się w wielu genomach wirusowych (PAGE i DI CERA 2008).

Prawdopodobnie, pierwotną funkcją enzymów z grupy proteaz serynowych była zewnątrzkomórkowa proteoliza białek, za którą odpowiadały jako enzymy trawienne. Jednak w wyniku procesów ewolucyjnych u zwierząt tkankowych nastąpiła duplikacja genów, które je kodowały. Dzięki temu proteazy serynowe zaczęły pełnić nowe funkcje w organizmie, takie jak udział w embriogenezie, w procesach odpowiedzi immunologicznej czy udział w krzepnięciu krwi (KREM i DI CERA 2001).

## KLASYFIKACJA PROTEAZ SERYNOWYCH

Klasyfikacja wszystkich enzymów proteolitycznych, a co za tym idzie także proteaz serynowych, jest obecnie określana przez dwa częściowo nakładające się na siebie systemy. Pierwszy, to nomenklatura rekomendowana przez Komisję Enzymów (EC), na-

tomiast drugi system MEROPS jest oparty na podziale proteaz na klany i rodziny.

System klasyfikacji enzymów przy użyciu numeracji EC jest rekomendowany przez Komitet Nomenklatury (Nazewnictwa) Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Mo-

\*Praca powstała w ramach grantu Uniwersytetu Łódzkiego nr 506/1136 i 545/762.

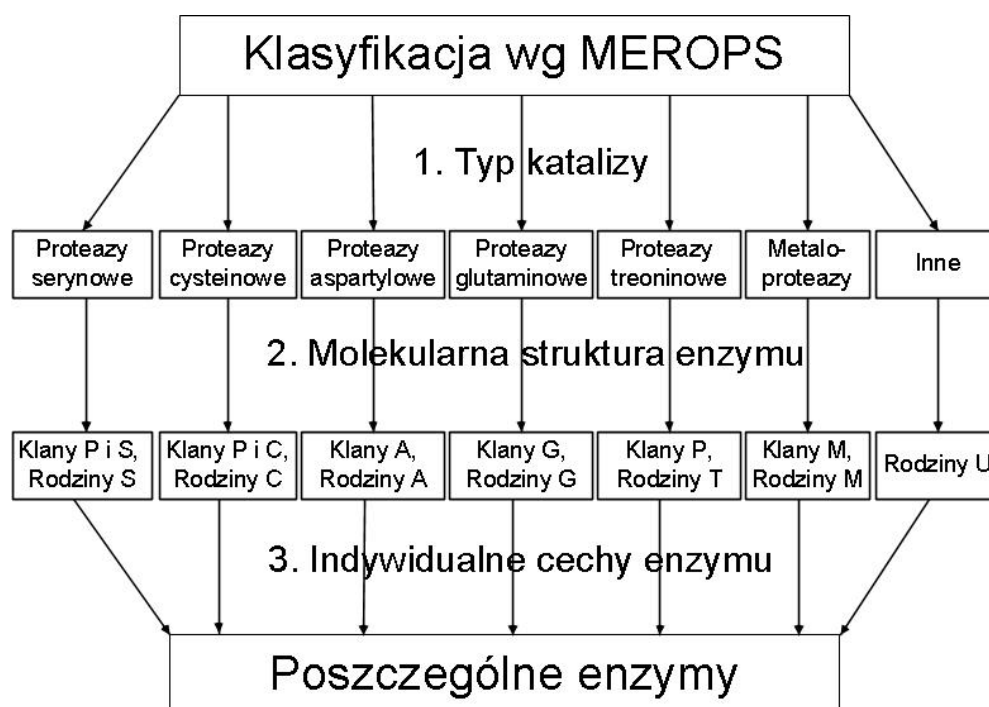
Tabela 1. Podział proteaz serynowych wg najnowszej bazy MEROPS (wydanie 9.8) <http://merops.sanger.ac.uk/>.

		Przedstawiciel	
Klan	Rodzina	Oficjalna nazwa angielska	Używana nazwa polska
PA(S)	S1	chymotrypsin	chymotrypsyna
	S3	togavirin	proteinaza NsP2
	S6	IgA-specific serine endopeptidase	<i>proteaza IgA</i>
	S7	flavivirin	proteinaza NS2B-3
	S29	hepacivirin	proteaza NS3
	S30	potyviral P1 peptidases	-
	S31	pestivirus NS3 polyprotein peptidase	proteaza BVDV NS3
	S32	equine arteritis virus serine peptidase	proteinaza NSP4
	S39	sobemovirus peptidase	proteinaza sobemowirusa
	S46	dipeptidyl-peptidase 7	aminopeptydaza dipeptylowa II
	S55	SpoIVB peptidase	proteaza SpoIVB
	S64	Ssy5 peptidase	proteaza SSy5
S65	picornain-like cysteine peptidase	proteinaza 3cl	
S75	White bream virus serine peptidas	-	
PB(S)	S45	penicillin G acylase precursor	prekursor acylazy penicylinowej G
	S63	EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 2	-
PC(S)	S51	dipeptidase E	dipeptydaza E
SB	S8	subtilisin	subtylizyna
	S53	sedolisin	sedolizyna
SC	S9	prolyl oligopeptidas	oligopeptydaza prolilowa
	S10	carboxypeptidase Y	karboksypeptydaza Y
	S15	Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase	dipeptydyloaminopeptydaza <i>X-prolilowa</i>
	S28	lysosomal Pro-Xaa carboxypeptidase	lizosomalna karboksypeptydaza C
	S33	prolyl aminopeptidase	aminopeptydaza prolilowa
S37	PS-10 peptidase	-	
SE	S11	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase A	DD-karboksypeptydaza A
	S12	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase B	DD-karboksypeptydaza B
	S13	D-Ala-D-Ala peptidase C	DD-karboksypeptydaza C
SF	S24	repressor LexA	represor LexA
	S26	signal peptidase I	peptydaza sygnałowa 1
SH	S21	assemblin	asemblina
	S73	gpO peptidase	-
	S77	prohead peptidase gp21	-
	S78	prohead peptidase	-
	S80	prohead peptidase gp175	-
SJ	S16	Lon-A peptidase	<i>proteaza LON</i>
	S50	infectious pancreatic necrosis birnavirus Vp4 peptidase	proteaza Vp4
	S69	Tellina virus 1 VP4 peptidase	-
SK	S14	endopeptidase Clp	ATP zależna <i>Clp</i> proteaza
	S41	C-terminal processing peptidase-1	-
	S49	signal peptide peptidase A	proteaza A peptydów sygnałowych
SO	S74	phage K1F endosialidase CIMCD self-cleaving protein	-
SP	S59	nucleoporin 145	NUP98
SR	S60	lactoferrin	laktoferyna
SS	S66	murein tetrapeptidase LD-carboxypeptidase	-
ST	S54	rhomboid-1	proteaza romboidowa-1
	S48	HetR peptidase	-
Nie- przy- sany	S62	influenza A PA peptidase	-
	S68	PIDD auto-processing protein unit	-
	S71	MUC1 self-cleaving mucin	episialina
	S72	dystroglycan	dystroglikan
	S79	CARD8 self-cleaving protein	białko CARD8
	S81	destabilase	destabilaza

lekularnej (NC-IUBMB), która jest następcą Międzynarodowej Komisji Enzymów powołanej w 1956 r. (WEBB 1993). Klasyfikacja EC jest stosowana dla każdego rodzaju enzymu i każdy enzym ma zarekomendowaną nazwę i czteroczęściowy, specyficzny dla siebie numer. Klasyfikacja ta oparta jest na typie reakcji katalizowanej przez dany enzym, np. chymotrypsyna ma numer EC 3.4.21.1, w którym cyfra 3 oznacza klasę hydrolaz, czyli enzymów rozkładających wiązania przy udziale cząsteczki wody. Cyfra 4 oznacza podklasę peptydaz, czyli enzymów rozkładających wiązanie peptydowe, 21 oznacza natomiast grupę endopeptydaz serynowych. W grupie tej znajduje się 98 enzymów wg najnowszej bazy danych <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/21/>.

Ze względu na to, że reakcje katalizowane przez proteazy są bardzo złożone, często zdarza się, że zupełnie różne enzymy posiadają bardzo podobną aktywność. Dlatego RAWLINGS i BARRETT (1993) zaproponowali nowy, bardziej precyzyjny system opisujący klasyfikację enzymów proteolitycznych. System ten przez lata był intensywnie rozbudowywany i szczegółowo dopracowywany po to, aby w 1996 r. można było zaprezentować w pełni funkcjonalną internetową bazę MEROPS. Baza ta przez kolejne lata była aktualizowana. Najnowsza odsłona bazy MEROPS

(wydanie 9.8) (RAWLINGS i współaut. 2012) zawiera, oprócz enzymów proteolitycznych, również ich substraty i inhibitory. Klasyfikacja MEROPS opiera się na tzw. trójwarstwowym systemie: 1 warstwa to typ katalizy reakcji, 2 to molekularna struktura enzymu, a 3 warstwa to indywidualne cechy enzymu (Ryc. 1). Typ mechanizmu katalizy jest najwyższym poziomem klasyfikacji w systemie MEROPS i oparty jest na grupie chemicznej odpowiedzialnej za przeprowadzenie reakcji hydrolizy wiązania peptydowego. Powoduje to podział wszystkich proteaz na: serynowe, cysteinowe, aspartylowe, glutaminowe, treoninowe, metaloproteazy oraz na proteazy o nieznanym typie katalizy, przypisując im odpowiednie skróty literowe S, C, A, G, T, M i U. Podobieństwa w strukturze pierwszorzędowej białek na ogół odzwierciedlają wspólne ewolucyjne pochodzenie, co często jest także związane z podobieństwem w biologicznym znaczeniu danych białek. Dlatego też drugą warstwą klasyfikacji MEROPS stała się molekularna struktura enzymów (BARRETT 1999). SYSTEM KLASYFIKACJI MEROPS JEST HIERARCHICZNY, PODOBNIIE JAK W PRZYPADKU KLASYFIKACJI EC. NAJWYŻSZYM POZIOMEM W HIERARCHII JEST KLAN, W OBRĘBIE KÓREGO WSZYSTKIE PROTEAZY MUSZĄ POCHODZIĆ OD WSPÓLNEGO PRZODKA, NAWET JEŚLI NIE POSIADAJĄ istotnego podobieństwa w swojej sekwencji.



Ryc. 1. Trójpoziomowy system klasyfikacji proteaz wg systemu MEROPS (wg BARRETT 1999, zmienioma).

Najbardziej rygorystycznym kryterium przynależności białek do tego samego klanu jest podobieństwo w ich strukturze trzeciorzędowej. Następnie, w obrębie klanów homologii [określone dzięki poszukiwaniom podobieństw w sekwencji przy użyciu BlastP (ALTSCHUL i współaut. 1997), FastA (PEARSON i LIPMAN 1988) i HMMER (EDDY 2008)], są grupowane w rodziny, które zawierają dowolną liczbę białek homologicznych. Białko, które zostało najlepiej scharakteryzowane pod względem biochemicznym zostaje wybrane jako przedstawiciel rodziny i jest często określane jako „holotyp”. Według najnowszej bazy MEROPS proteazy serynowe są podzielone na 15 klanów, w których znajdują się łącznie 53 rodziny (Tabela 1).

#### KLAN PA

Białka należące do klanu PA, stanowią największą i najlepiej zbadaną grupę proteaz serynowych. Proteazy klanu PA są dość mocno rozpowszechnione u zwierzęcych eukariotów, natomiast występują rzadziej w organizmach prokariotycznych i u roślin. Występują także w genomie wirusowym, lecz prawdopodobnie zostały one przejęte przez wirusy z genomów ich gospodarzy (DI CERA 2009). Klan ten zawiera aż 14 różnych rodzin (S1, S3, S6, S7, S29, S30, S31, S32, S39, S46, S55, S64, S65 i S75), których mechanizm katalizy jest oparty na działaniu tzw. katalitycznej triady, do której należą His, Asp i Ser.

Największą i najważniejszą rodziną klanu PA, a zarazem wszystkich proteaz serynowych, jest rodzina S1. Z 699 proteaz odkrytych w ludzkim organizmie, 178 stanowią proteazy serynowe, a 138 należy właśnie do rodziny S1. Sugeruje to ich ewolucyjną przewagę nad innymi proteazami serynowymi znajdującymi się w organizmie człowieka (PUENTE i współaut. 2003). Głównym przedstawicielem rodziny S1 jest chymotrypsyna i stąd też pochodzi często używana nazwa tej rodziny, proteazy chymotrypsynopodobne (ang. chymotrypsin-like proteases). Są one najczęściej występującymi proteazami w świecie ożywionym, w najnowszej bazie MEROPS (wersja 9.8) (<http://merops.sanger.ac.uk/>) do tej grupy przypisano aż 684 białka, z których każde zawiera tę samą katalityczną triadę His, Asp i Ser. Rodzina ta posiada idealne cechy umożliwiające dużą wydajność katalityczną oraz wysoką selektywność substratową. Poprzez swoją domenową budowę proteazy te wykazują również wiele różnych poziomów regulacji swojej aktyw-

ności. Dzięki tym zaletom proteazy S1 stanowią główną składową degradomu złożonych systemów biologicznych. Proteazy chymotrypsynopodobne wykazują specyficzność do hydrolizy wiązań peptydowych znajdujących się po karboksylowej stronie aminokwasów z dodatnio naładowanymi łańcuchami bocznymi (Arg i Lys) lub aminokwasów hydrofobowych (Phe, Trp i Tyr) (PAGE i DI CERA 2008). Proteazy te są obecne zarówno w komórkach eukariotycznych, prokariotycznych, jak i w wirusach. Proteazy chymotrypsynopodobne biorą udział w wielu ważnych procesach fizjologicznych takich jak: trawienie, hemostaza, apoptoza, transdukcja sygnału czy odpowiedź immunologiczna organizmu. Kaskady wzajemnych aktywacji proteaz serynowych rodziny S1 stanowią główny element napędowy takich procesów jak krzepnięcie krwi, fibrynoliza, wiązanie dopełniacza, a nawet przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej czy gojenie się ran (HEDSTROM 2002). Potoczna nazwa rodziny S1 pochodzi od syntetyzowanej w trzustce chymotrypsyny, której struktura jako pierwsza została dokładnie opisana przez MATTHEWSA i współaut. (1967). Enzym ten posiada 245 aminokwasów ułożonych w dwie  $\beta$ -beczułki, z których każda składa się z 6 struktur  $\beta$  (BIRKTOFT i współaut. 1970). Beczułki te ułożone są w stosunku do siebie pod kątem prostym. Topologia ułożenia struktur  $\beta$  w  $\beta$ -beczułkach została opisana jako tzw. „klucz grecki” (Ryc. 2) (PAGE i DI CERA 2008). Centrum aktywne enzymu znajduje się pomiędzy dwoma  $\beta$ -beczułkami. Struktura chymotrypsyny, jak i wszystkich białek należących do rodziny S1, jest podzielona na miejsce katalityczne, miejsce rozpoznawania substratu oraz miejsce aktywacji zymogenu (KRAUT 1977). Większość proteaz serynowych należących do rodziny S1 jest syntetyzowana jako nieaktywne zymogeny i do spełnienia swojej biologicznej funkcji wymaga proteolitycznej aktywacji. W N-końcowej części zymogenu znajduje się domena, która podczas aktywacji zostaje usunięta. Proteoliza każdego znanego zymogenu z rodziny S1 zachodzi w wiązaniu peptydowym znajdującym się pomiędzy 15 a 16 resztą aminokwasową (przyjmując numerację wg chymotrypsyny). Powoduje to uwolnienie N-końcowej reszty izoleucyny 16, która natychmiast tworzy z resztą kwasu asparaginowego znajdującego się w pozycji 194 wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie elektrostatyczne zwane mostkiem solnym. Powoduje to zmianę konformacyjną w domenie aktyw-



Ryc. 2. Trzeciorzędowa struktura chymotrypsyny bydła domowego. Obraz wygenerowano na podstawie struktury 1YPH znajdującej się w bazie <http://www.rcsb.org/> przy pomocy programu Swiss-PdbViewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>) (GUEX i PEITSCH 1997).

cyjnej, przez co formuje się funkcjonalne miejsce wiązania substratu oraz dochodzi do pełnej ekspozycji centrum aktywnego enzymu (FEHLHAMMER i współaut. 1977, MATRAI i współaut. 2004).

Również ciekawym enzymem należącym do klanu PA jest reprezentująca rodzinę S6 proteaza IgA. Bakteryjna proteaza IgA jest wysoce specyficzną endopeptydazą prolilową, która powoduje hydrolizę ludzkich immunoglobulin typu A. Centrum aktywne tego enzymu obejmuje His101, Asp151 i Ser278. W strukturze enzymu można wyróżnić długą na 100 Å centralną domenę o strukturze  $\beta$ -harmonijki. N-końcowa domena proteazowa posiada budowę i aktywność enzymów należących do rodziny proteaz chymotrypsynopodobnych (JOHNSON i współaut. 2009). Proteaza IgA jest produkowana przez kilkanaście rodzajów bakterii chorobotwórczych, przez co bakterie te są w stanie wyeliminować jeden z głównych elementów obrony organizmu gospodarza. Stanowi to bardzo ważny czynnik wirulencji, który przyczynia się do infekcji bakteryjnej i kolonizacji (MISTRY i STOCKLEY 2006).

#### KLAN PB

Proteazy serynowe klanu PB są to enzymy, których centrum katalityczne zlokalizo-

wane jest w N-końcowej części dojrzałego białka, stąd też często nazywane są N-końcowymi hydrolazami nukleofilowymi (ang. N-terminal nucleophile hydrolases, Ntn). Wszystkie proteazy z tego klanu są aktywowane w procesie autokatalizy, po której następuje ekspozycja nukleofilowej N-końcowej części białka (LIN i współaut. 2004, YIN i współaut. 2011). Do klanu PB należą białka, które są także proteazami treoninowymi i cysteinowymi, a proteazy serynowe są reprezentowane tylko przez 2 rodziny: S45 i S63. Do S45 należą enzymy występujące w komórkach bakteryjnych, które rozkładają wiązania amidowe w antybiotykach, przez co odpowiedzialne są za występowanie u bakterii oporności na antybiotyki (HEWITT i współaut. 2000, KIM i współaut. 2003). Najważniejszymi przedstawicielami tej rodziny proteaz jest prekursor acylazy penicylinowej G i prekursor acylazy cefalosporynowej.

Proces dojrzewania zarówno prekursora acylazy penicylinowej G jak i prekursora acylazy cefalosporynowej obejmuje dwa cięcia proteolityczne, które niezbędne są do usunięcia 10-aminokwasowego, peptydowego łącznika i utworzenia dojrzałego białka. Do pierwszej hydrolizy zachodzi po aminowej stronie nukleofilowej reszty seryny 170. Natomiast druga reakcja hydrolizy katalizowana przez Ser170 obejmuje rozszczepienie wiązania pomiędzy Glu159 a Gly160. Po uwolnieniu peptydu GDPPDLADQG dochodzi do zmian konformacyjnych, prowadzących do wypełnienia luki pomiędzy Glu159 a Ser170. Dojrzała forma acylazy cefalosporynowej jest heterotetramerem ( $\alpha, \beta$ )<sub>2</sub> zbudowanym z dwóch heterodimerów utworzonych podczas autokatalizy (YIN i współaut. 2011).

Obydwa wymienione enzymy należące do rodziny S45 mają ogromne znaczenie w przemyśle farmaceutycznym. Są one używane do usuwania łańcuchów bocznych z prekursorów antybiotyków, przez co możliwe jest otrzymywanie różnych wariantów penicyliny czy cefalosporyny. Dzięki temu możliwe było udoskonalenie produkcji antybiotyków beta-laktamowych (BARENDS i współaut. 2004, SONAWANE 2006).

Rodzina S63 to głównie enzymy występujące w organizmie człowieka i myszy, stanowiące białka transbłonowe należące do receptorów związanych z białkami G. Jednak białka te w wyniku dojrzewania ulegają autokatalizie odsłaniając miejsce aktywne, w którym znajduje się Ser518 (LIN i współaut. 2004). Pięciu członków (CD97, EMR1,

EMR2, EMR2 i EMR4) tej rodziny jest nazywanych ze względu na swoją budowę „epidermal growth factor-seven-transmembrane (EGF-TM7) family” (KWAKKENBOS i współpracownicy. 2004). Enzymy należące do tej rodziny mają N-kończącą domenę zewnątrzkomórkową, która posiada pięć powtórzeń składających się z modułów o strukturze podobnej do czynnika wzrostu naskórka. (EGF), C-kończąca domena natomiast zawiera siedem regionów transbłonowych (CHANG i współpracownicy. 2003).

Białka tej rodziny występują głównie na powierzchni komórek układu odpornościowego a wzrost ich ekspresji jest obserwowany podczas stanu zapalnego (GRAY i współpracownicy. 1996, KOP i współpracownicy. 2005). Białko CD97 odgrywa także ważną rolę w procesie migracji neutrofilów (LEEMANS i współpracownicy. 2004).

#### KLAN PC

W skład klanu PC wchodzi zarówno proteazy cysteinowe, jak i serynowe, które są w tym klanie reprezentowane tylko przez jedną rodzinę S51. Proteazy serynowe wchodzące w skład tego klanu składają się ze struktury beta (złożonej z 5 równoległych nici), która umieszczona jest pomiędzy dwoma alfa-helisami. Budowa ta jest podobna do białek klanu SC, ale uważa się, że jest to wynik konwergencji (HAKANSSON i współpracownicy. 2000). Centrum katalityczne enzymów zlokalizowane jest w obrębie triady katalitycznej, która obejmuje Ser120, His157 i Glu192 (LASSY i MILLER 2000). Jedyną poznaną dotychczas funkcją enzymów z rodziny S51 jest ich udział w odżywianiu drobnoustrojów. Dipeptydaza alfa-aspartylowa pomaga bakteriom *Salmonella typhimurium* używać dipeptydów aspartylowych jako źródła aminokwasów poprzez ich wewnątrzkomórkową proteolizę (LARSEN i współpracownicy. 2001). Natomiast inny enzym, cyjanoficynaza (ang. cyanophycinase), jest odpowiedzialny za degradację materiału zapasowego sinic jakim jest cyjanoficyna, białko złożone z polimerów argininy i kwasu asparaginowego (RICHTER i współpracownicy. 1999).

#### KLAN SB

Proteazy należące do klanu SB są szeroko rozpowszechnione u roślin i bakterii, jednakże kilku przedstawicieli tego klanu znajduje się także w świecie zwierząt. Klan SB zawiera dwie rodziny: S8 i S53, które mają różny mechanizm katalizy reakcji hydrolizy wiąza-

nia peptydowego. W przypadku rodziny S8 centrum aktywne zlokalizowane jest w obrębie katalitycznej triady obejmującej Asp, His i Ser, natomiast proteazy z rodziny S53 zawierają w swoim centrum aktywnym katalityczną tetradę (Glu295, Asp299, Asp385, Ser502). Jedynie reszta seryny w obydwu rodzinach ma zachowaną pozycję i znajduje się w motywie Gly-Thr-Ser-Xaa-Ala-Xbb-Pro, gdzie Xaa oznacza alifatyczny, hydrofobowy aminokwas, a Xbb to aminokwas mały, o krótkim łańcuchu bocznym. W ludzkim genomie zidentyfikowano 10 białek należących do klanu SB, 9 z rodziny S8 i tylko 1 z rodziny S53 (PAGE i DI CERA 2008).

Białka klanu SB składają się z siedmioniciowej struktury beta umieszczonej pomiędzy dwoma alfa-helisami. Większość proteaz z klanu SB preferuje hydrolizę wiązań peptydowych znajdujących się w silnie hydrofobowych C-końcach peptydów (WŁODAWER i współpracownicy. 2003). Białka te wydzielane są na zewnątrz komórki lub są zlokalizowane w błonie komórkowej, a ich główna funkcja związana jest z odżywianiem komórek bakteryjnych oraz grzybów (PAGE i DI CERA 2008).

Pierwowzorem enzymów z klanu SB jest subtylizyna, odkryta w Gram dodatnich bakteriach *Bacillus subtilis*, która, podobnie jak chymotrypsyna, była jednym z pierwszych białek, których struktura została określona za pomocą krystalografii (WRIGHT i współpracownicy. 1969). Subtylizyna, dzięki swoim właściwościom takim jak: termostabilność czy stabilność w rozpuszczalnikach organicznych, znalazła duże zastosowanie w przemyśle. Poprawiła znacznie skuteczność używanych obecnie detergentów (BRYAN 2000).

Ważnymi białkami należącymi do klanu SB są również sedolizyna, proteinaza K, laktopecyna, furyna czy proteaza KEX2.

#### KLAN SC

Klan SC tworzą zarówno endo-, jak i egzopeptydazy, których centrum aktywne stanowią Ser, Asp i His. Białka należące do tego klanu zbudowane są ze struktury beta, która otoczona jest przez alfa-helisę (LIAO i REMINGTON 1990). Ze względu na swoją strukturę zaliczane są do grupy tzw. alfa-beta hydrolaz (OLLIS i współpracownicy. 1992, HOLMQUIST 2000). Białka klanu SC stanowią drugą pod względem liczebności grupę proteaz serynowych obecną w ludzkim genomie (HOTELIER i współpracownicy. 2004). Proteazy klanu SC mają identyczną geometrię katalitycznej triady co klan PA i SB, jednak posiadają inne ułożenie

aminokwasów w sekwencji łańcucha polipeptydowego. Większość proteaz z klanu SC powoduje hydrolizę wiązania peptydowego po karboksylowej stronie proliny (PAGE i DI CERA 2008).

W skład klanu SC wchodzi 6 rodzin: S9, S10, S15, S28, S33 i S37, jednak w ludzkim genomie największą część stanowi rodzina S9 (aż 41 homologów) (PAGE i DI CERA 2008). W skład tej rodziny wchodzi głównie białka, których fizjologiczną rolą jest degradowanie biologicznie aktywnych peptydów. Przykładem białka o takim działaniu jest peptydaza dipeptylowa 4 (DPP-4), odpowiedzialna za metabolizowanie chemokin i hormonów, np. glukozozależnego peptydu *insulinotropowego* czy glukagonopodobnego peptydu 1 (KIEFFER i współaut. 1995, KIEFFER i HABENER 1999, DEACON i współaut. 2002). Do rodziny S9 zalicza się także acetylocholinesterazę, która nie posiada właściwości proteolitycznych, natomiast powoduje hydrolizę ważnego neuroprzekaźnika, acetylocholinę do cholinę i reszty kwasu octowego (MASSOULIE i współaut. 1993).

Ważnymi dla funkcjonowania organizmu ludzkiego są również dwie proteazy należące do rodziny S28: lizosomalna karboksypeptydaza C i peptydaza dipeptylowa 2 (DPP-2). Lizosomalna karboksypeptydaza C powoduje inaktywację angiotensyny II poprzez proteolizę wiązania pomiędzy resztą proliny a fenylalaniny w jej C-końcowej części. Enzym ten w połączeniu z wysokocząsteczkowym kininogenem jest zdolny do aktywacji osoczowej prekalikreiny (SHARIAT-MADAR i współaut. 2004, 2005). DPP-2 natomiast jest wewnątrzkomórkową proteazą, której funkcją jest usuwanie N-terminalnych dipeptydów, w których występuje prolina lub alanina. Prawdopodobną rolą biologiczną DPP-2 jest udział w procesach różnicowania komórek, ochronie komórek przed śmiercią oraz w degradacji kolagenu i białek *miofibrylarnych* (MAES i współaut. 2007).

Ciekawymi przedstawicielami klanu SC są również białka należące do rodziny S33, które nie posiadają zdolności proteolitycznych ale powodują hydrolizę wiązania epoksydowego, dzięki czemu odgrywają istotną rolę w procesach detoksyfikacyjnych (ARAND i współaut. 2005). Jednak hydrolaza epoksydowa jest również zaangażowana w przemianę kwasu epoksyeko-zatrienowego (EETs). Kwas ten jest metabolitem powstałym podczas przemian kwasu arachidonowego i odpowiedzialny jest za rozszerzanie naczyń krwiono-

śnych. EETs działa również przeciwzapalnie oraz przeciwplytkowo. Hydrolaza epoksydowa powoduje rozkład kwasu epoksyeko-zatrienowego hamując w ten sposób jego aktywność. Nadmierna aktywność hydrolazy epoksydowej może stanowić jedną z przyczyn chorób układu sercowo-naczyniowego, dlatego enzym ten jest rozpatrywany jako potencjalny cel w farmakoterapii przeciwmiążdżycowej (GROSS i NITHIPATIKOM 2009, WANG i współaut. 2010, IMIG 2012).

#### KLAN SE

Do klanu SE należą przede wszystkim enzymy o aktywności karboksypeptydaz. Proteazy tego klanu występują u bakterii i są głównie zaangażowane w metabolizm ściany komórkowej. Enzymy te powodują hydrolizę połączeń D-Ala-D-Ala w bakteryjnej ścianie komórkowej, jednakże nie są zdolne do rozszczepiania wiązań  $\alpha$ -peptydowych (PAGE i DI CERA 2008). Do klanu SE należą 3 rodziny: S11, S12 i S13, które są ze sobą bardzo blisko spokrewnione. W strukturze trzeciorzędowej wszystkich białek należących do tego klanu możemy wyróżnić 2 domeny: N-końcowy kłębek złożony z  $\alpha$ -helisy, w którym znajduje się centrum aktywne oraz C-końcową  $\alpha/\beta/\alpha$ -kanapkę (KELLY i współaut. 1998, SAUVAGE i współaut. 2005). Centrum aktywne obejmuje znajdujące się blisko siebie aminokwasy Ser66 i Lys69, zlokalizowane w silnie zakonserwowanym motywie Ser-Xaa-Xaa-Lys. Trzeci aminokwas, który bierze udział w katalizie reakcji znajduje się w pozycji 130 i jest to seryna (w rodzinie S11 i S13) lub tyrozyna (w rodzinie S12) (RHAZI i współaut. 2003). Białka z tego klanu wykazują strukturalne podobieństwo do klasy  $\beta$ -laktamaz. Dzięki temu podobieństwu enzymy klanu SE mogą wiązać się do penicyliny, jednakże to wiązanie nie powoduje zmiany właściwości antybiotyku (GOFFIN i GHUYSEN 1998).

#### KLAN SF

Białka należące do klanu SF to grupa enzymów, w której za mechanizm katalityczny odpowiedzialne są dwa aminokwasy (tzw. katalityczna diada); w przypadku enzymów prokariotycznych jest to Ser i Lys, a w przypadku proteaz eukariotycznych jest to Ser i His (PAGE i DI CERA 2008). W skład tego klanu wchodzi 2 rodziny: S24 i S26, które wykazują pomiędzy sobą duże podobieństwo strukturalne. Proteazy klanu SF są zbudowane całkowicie ze struktur beta: zawierają kilka struktur  $\beta$ -harmonijek oraz strukturę



Ryc. 3. Trzeciorzędowa struktura represora LexA *Escherichia coli*. Obraz wygenerowano na podstawie struktury 1HJJ (LUO i współpracownicy, 2001) znajdującej się w bazie <http://www.rcsb.org/> przy pomocy programu Swiss-PdbViewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

$\beta$ -beczułki. Dodatkowo, członkowie rodziny S24 mają jeszcze w swoim C-końcowym odcinku domenę zawierającą kłębek trzech  $\alpha$ -helis, których funkcją jest najprawdopodobniej oddziaływanie z DNA (PAETZEL i współpracownicy, 1995, LUO i współpracownicy, 2001). Głównym przedstawicielem rodziny S24 jest białko pochodzące z bakterii *E. coli*: represor LexA (Ryc. 3). Białko to jest zaangażowane w tzw. odpowiedź SOS komórki bakteryjnej, która prowadzi do naprawy cząsteczek bakteryjnego DNA. Autokatalityczna aktywacja represora LexA jest zależna od utworzenia kompleksu z aktywowanym przez jednoniciowe DNA białkiem RecA. Aktywacja represora LexA powoduje oddzielenie domeny wiążącej DNA, przez co białko to nie działa już dłużej jako represor i kontrolowane przez niego geny mogą ulegać ekspresji. Geny te są głównie odpowiedzialne za procesy naprawy DNA (LITTLE 1993, REUVEN i współpracownicy, 1999, LUO i współpracownicy, 2001, INDIANI i O'DONNELL 2013).

Rodzinę S26 stanowią natomiast endopeptydazy błonowe zaangażowane w syntezę bakteryjnych białek sekrecyjnych. Enzymy te powodują odcięcie hydrofobowych N-końco-

wych peptydów sygnałowych podczas translokacji białek przez błonę komórkową (DALBEY i współpracownicy, 1997). Motywem, który najczęściej występuje przed miejscem hydrolizy jest Ala-X-Ala (CARLOS i współpracownicy, 2000). W strukturze białek rodziny S26 można wyróżnić dwa N-końcowe segmenty transbłonowe, mały region cytoplazmatyczny i C-końcowy peryplazmatyczny region katalityczny (PAETZEL i współpracownicy, 2002).

Aktywność białek należących do rodziny S26 jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek bakteryjnych i ich żywotności, dlatego też stają się one potencjalnym celem działania dla nowoczesnej antybiotykoterapii przeciwko szczepom bakteryjnym opornym na leczenie tradycyjne (PAETZEL i współpracownicy, 2000, SMITHA RAO i ANNE 2011).

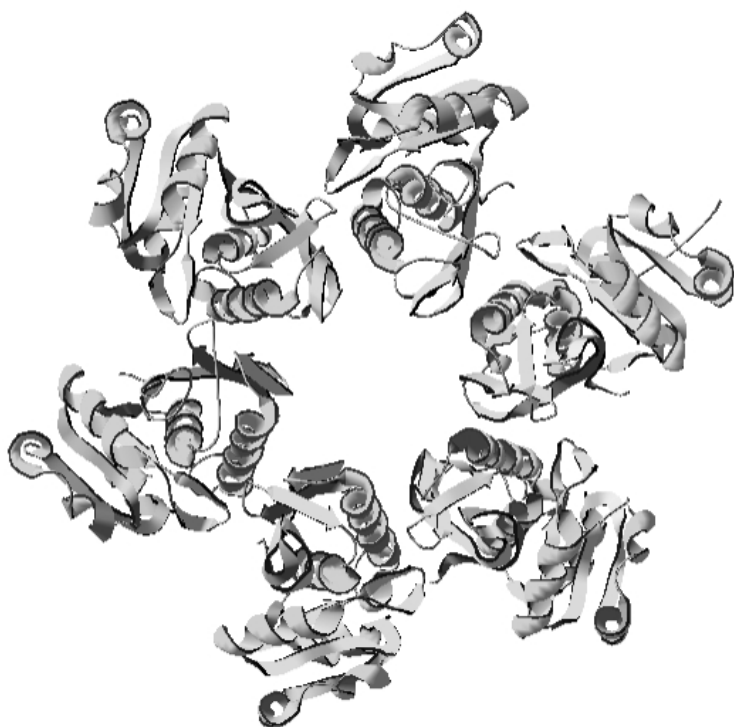
#### KLAN SH

Klan SH stanowią proteazy wirusów zawierających swój materiał genetyczny w postaci DNA. Enzymy te zaangażowane są w proces montowania kapsydu wirusowego. Białka należące do tego klanu posiadają strukturę  $\beta$ -beczułki zawierającą centrum aktywne, która jest otoczona przez  $\alpha$ -helisy (CHEN i współpracownicy, 1996). Klan ten składa się z kilku rodzin: S21, S73, S77, S78 i S80, jednak najciekawsza wydaje się być rodzina S21, do której należy asemblina. W rodzinie tej ułożenie aminokwasów wchodzących w skład katalitycznej triady (His63, Ser132, His157) nie jest spotykane w żadnej innej rodzinie proteaz serynowych (PAGE i DI CERA 2008).

#### KLAN SJ

Klan proteaz SJ stanowią 3 rodziny białek: S16, S50 i S59, których mechanizm katalizy reakcji hydrolizy wiązania peptydowego jest oparty na działaniu katalitycznej diady, w której skład wchodzi Ser i Lys. Białka te złożone są z 2 warstw, w których występują zarówno struktury  $\beta$ -harmonijki, jak i  $\alpha$ -helisy. Centrum aktywne enzymu znajduje się pomiędzy utworzonymi przez te struktury warstwami (BOTOS i współpracownicy, 2004). Największą i najlepiej poznaną rodziną wchodzącą w skład tego klanu jest rodzina S16, której przedstawicielem jest proteaza lon. Jednak nadal nie wiadomo zbyt wiele o biologicznej funkcji tego białka. Proteaza lon jest uformowana z 6 podjednostek w postaci heksametrycznego pierścienia (Ryc. 4) (BESCHE i ZWICKL 2004). Zarówno proteaza lon, jak i inne białka na-





Ryc. 4. Trzeciorzędowa struktura proteazy lon bakterii *Escherichia coli*. Obraz wygenerowano na podstawie struktury 1RR9 (BOTOS I WSPÓŁAUT. 2004) znajdującej się w bazie <http://www.rcsb.org/> przy pomocy programu Swiss-PdbViewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

leżące do tej rodziny posiadają równocześnie aktywność ATP-zależnej proteazy, jak i ATP-azy, ponieważ reakcje hydrolizy peptydów i ATP są ze sobą powiązane. Głównym zadaniem tych proteaz jest wewnątrzkomórkowa degradacja białek (ROTANOVA i współaut. 2006).

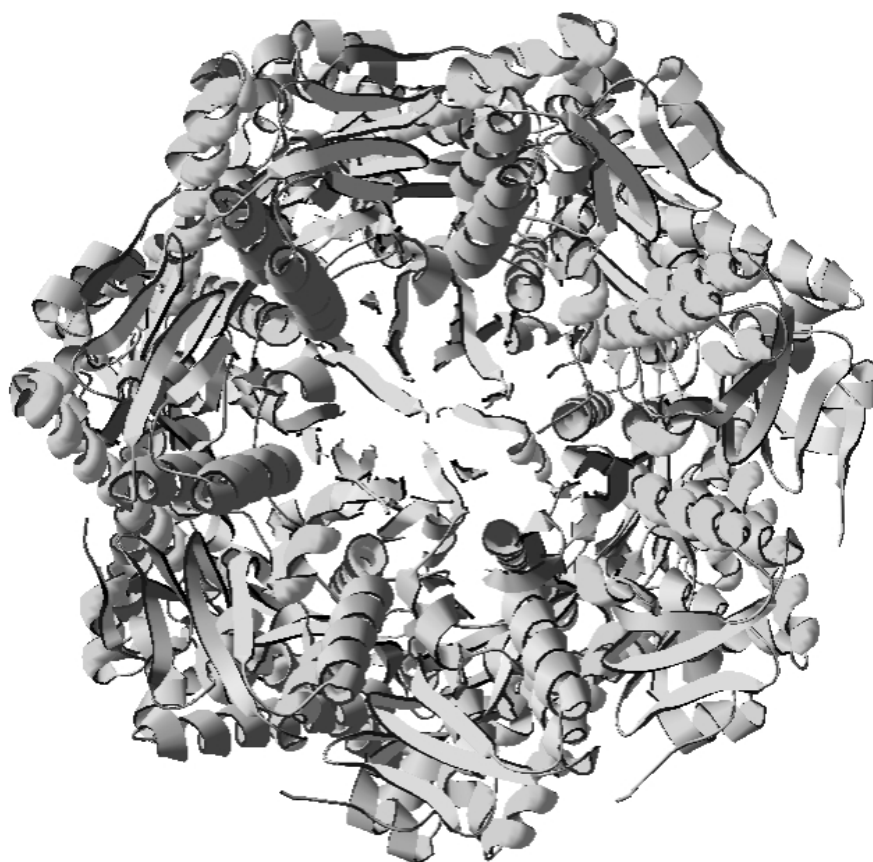
#### KLAN SK

Podobnie jak w przypadku klanu SJ, proteazy klanu SK są w większości enzymami zlokalizowanymi w komórkach bakteryjnych. Tworzą struktury pierścieniowe i odpowiedzialne są za proces wewnątrzkomórkowej degradacji białek. Klan SK jest wyjątkiem od reguły obowiązującej w bazie MEROPS, ponieważ jako jedyny zawiera w sobie rodziny, których mechanizm katalizy różni się od siebie. W rodzinie S14 katalityczna triada obejmuje Ser111, His136 i Asp185, podczas gdy w rodzinie S41 występuje zarówno katalityczna diada obejmująca resztę seryny 372 oraz lizyny 387 (LIAO i współaut. 2000), jak i katalityczna tetrada, do której należą Ser745, His746, Ser965 i Glu1023 (BRANDSTETTER i współaut. 2001). Z kolei w rodzinie S49 w centrum katalitycznym jest u wszystkich członków zakonserwowana tylko jedna reszta seryny. W przypadku proteazy A peptydów sygnałowych bakterii *E. coli* centrum aktywne stanowi katalityczna triada obejmująca Lys209,

Ser409 i Ser432 (KIM i współaut. 2008), a w przypadku tej samej proteazy, jednak pochodzącej z bakterii *Bacillus subtilis*, za katalizę odpowiada katalityczna diada (Ser147 i Lys199) (NAM i współaut. 2012). Inny enzym tej rodziny, proteaza gpC bakteriofaga  $\lambda$ , zawiera katalityczną triadę, w której skład wchodzi: Ser166, Ser188 i Lys218 (MEDINA i współaut. 2010).

Białka należące do rodziny S14 są proteazami ATP-zależnymi, które składają się z dwóch typów podjednostek: o aktywności peptydazy i wiążących ATP. Natywna struktura ATP-zależnej *Clp* proteazy jest homotetradekamerem, złożonym z 2 pierścieni zawierających po 7 białkowych podjednostek (Ryc. 5). We wnętrzu każdego pierścienia zostaje utworzony cylinder, gdzie zlokalizowane są reszty 21 aminokwasów należących do centrum aktywnych wszystkich podjednostek białkowych. Substrat po związaniu jest rozkładany od końca i transportowany do wnętrza cylindra (LEE i współaut. 2001, REID i współaut. 2001, YU i HOURY 2007).

Rodzinę S41 charakteryzują białka rozpoznające C-terminalne tri-peptydy Xaa-Yaa-Zaa, gdzie Xaa oznacza Ala lub Leu, Yaa to Ala lub Tyr, natomiast Zaa to głównie Ala. Proteazy tej rodziny posiadają zróżnicowaną strukturę, od trójdomenowych monomerów po homoheksamery, z których każdy



Ryc. 5. Trzeciorzędowa struktura ATP-zależnej *Clp* proteazy bakterii *Staphylococcus aureus*. Obraz wygenerowano na podstawie struktury 3STA (ZHANG i współaut. 2011) znajdującej się w bazie <http://www.rcsb.org/> przy pomocy programu Swiss-PdbViewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

monomer jest pięciodomenowy. Głównym zadaniem tych enzymów jest degradacja nieprawidłowo zsintetyzowanych białek. Możliwe jest to ze względu na fakt, że peptydy syntetyzowane na bazie uszkodzonego mRNA są znakowane na C-końcu tripeptydem Leu-Ala-Ala (BEEBE i współaut. 2000).

#### KLAN SO

Klan SO zawiera niewielką liczbę białek i składa się tylko z jednej rodziny proteaz, a mianowicie S74, w której znane są tylko 4 enzymy. Centrum aktywne tych białek stanowi katalityczna diada, do której należą Ser911 i Lys916. Aktywacja tych fagowych enzymów następuje autokatalitycznie, a ich główną funkcją biologiczną jest hydroliza kapsydu fagowego, która umożliwia uwolnienie jego materiału genetycznego (MUEHLENHOFF i współaut. 2003).

#### KLAN SP

Klan SP, podobnie jak klan SO, jest złożony tylko z jednej rodziny proteaz, S59.

W skład tej rodziny wchodzi autolityczne nukleoporyny, których centrum aktywne stanowią His862 i Ser864. Aminokwasy te oddzielone są od siebie tylko 1 resztą fenyloalaniny. Podczas autolizy prekursor Nup145 jest cięty na 2 komponenty: Nup98 oraz Nup96 (FONTOURA i współaut. 2001, HODEL i współaut. 2002). Następnie, Nup98 i Nup96 są zaangażowane w tworzenie jądrowych kompleksów porowych, przez co biorą udział w jądrowo-cytoplazmatycznym transporcie cząsteczek mRNA (IWAMOTO i współaut. 2010).

#### KLAN SR

Do klanu proteaz SR należy również tylko jedna rodzina, S60, której przedstawicielem jest laktoferyna. Jest to glikoproteina obficie występująca w mleku i w większości płynów biologicznych, zawierająca w swojej cząsteczce żelazo. Laktoferyna jest odpowiedzialna za obronę organizmu ludzkiego przed bakteriami, grzybami, pierwotniakami oraz wirusami. Białko to

łączy wrodzoną i nabytą odporność u ssaków (GONZALEZ-CHAVEZ i współaut. 2009, GARCIA-MONTOYA i współaut. 2012). Większość aktywności przeciwbakteryjnej laktoferyny jest związana z jej zdolnością do sekwestracji żelaza i do wiązania lipidu A, będącego składnikiem lipopolisacharydu bakteryjnego (VALENTI i współaut. 2004). Laktoferyna inaktywuje również bakteryjną proteazę IgA, dzięki czemu chroni immunoglobuliny przed rozkładem (PLAUT i współaut. 2000) oraz powoduje rozkład białka EspB, które jest odpowiedzialne za patogenność bakterii *E. coli* (OCHOA i CLEARLY 2004). Struktura laktoferyny została po raz pierwszy opisana przez ANDERSONA i współaut. (1989). Białko to składa się z 4-krotnie powtarzających się duplikacji. Każde z powtórzeń zawiera strukturę beta-harmonijki umieszczoną pomiędzy dwoma  $\alpha$ -helisami. Enzym ten posiada 2 podjednostki peptydazowe, z których każda zawiera dwa powtórzenia strukturalne. Każda z tych podjednostek ma jeden atom żelaza ulokowany na granicy strukturalnych powtórzeń. Centrum aktywne znajduje się w N-końcowej części podjednostki peptydazowej i obejmuje Lys93 oraz Ser279.

#### KLAN SS

Do klanu SS należą enzymy powodujące hydrolizę wiązania amidowego pomiędzy L-aminokwasem i D-aminokwasem, które najczęściej występuje w bakteryjnych peptydoglikanach. Proteazy klanu SS są zgrupowane także tylko w jedną rodzinę, S66. Białka tej rodziny zbudowane są z N-końcowej beta-harmonijki i C-końcowej beta-beczulki. Na granicy tych dwóch domen zlokalizowane jest centrum aktywne obejmujące Ser115, Glu217 i His285. Substratami dla proteaz rodziny S66 są produkty degradacji ściany komórkowej bakterii. Powodują one przekształcanie tetrapeptydów mureiny do tripeptydów, które mogą być z powrotem przekształcane do budujących ścianę komórkową peptydoglikanów, co umożliwia tzw. „recykling” peptydoglikanów (KORZA i BOCHTLER 2005).

#### KLAN ST

Klan ST jest obecnie ostatnim wyodrębnionym klanem proteaz serynowych według bazy MEROPS. Podobnie jak klany SO, SP, SR i SS, posiada przypisaną tylko jedną rodzinę, S54. Należą tutaj endopeptydazy



Ryc. 6. Trzeciorzędowa struktura proteazy romboidowej GlpG bakterii *Escherichia coli*. Obraz wygenerowano na podstawie struktury 3UBB (XUE i współaut. 2012) znajdującej się w bazie <http://www.rcsb.org/> przy pomocy programu Swiss-PdbViewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

związane z dwuwarstwą lipidową, które powodują hydrolizę domen transbłonowych substratu. Struktura enzymów z tej rodziny na przykładzie białka GlpG została scharakteryzowana przez WANGA i współaut. (2006). Proteazy te, określane jako romboidowe, mają sześć domen transbłonowych z N- i C-końcami zakotwiczonymi w cytoplazmie komórki (Ryc. 6). Jedna z domen transbłonowych jest krótsza od pozostałych i tworzy tuż pod powierzchnią błony tzw. wewnętrzną wnękę wodną, w której zachodzi proces proteolizy wiązania peptydowego. Centrum aktywne tych białek stanowi Ser217 znajdująca się w czwartej domenie transbłonowej oraz His28, która zlokalizowana jest w domenie szóstej. Pomiędzy pierwszą i drugą domeną transbłonową tworzy się osadzona w błonie komórkowej pętla, której zadaniem jest kontrolowanie dostępu substratu do centrum aktywnego enzymu. Rodzina ta jest jedyną ze wszystkich rodzin proteaz serynowych, w której centrum aktywne znajduje się w domenach transbłonowych. Większość funkcji proteaz romboidowych jest jeszcze nie do końca poznana, ale postuluje się ich ważną rolę w przekazywaniu sygnałów wzrostowych, funkcjonowaniu mitochondriów oraz w translokacji białek przez błony bakteryjne (FREEMAN 2008, LEMBERG 2013).

## PROTEAZY SERYNOWE I ICH KLASYFIKACJA WEDŁUG SYSTEMU MEROPS

## Streszczenie

Enzymy proteolityczne inaczej nazywane także proteazami, proteinazami lub peptydazami są to enzymy należące do klasy hydrolaz, które posiadają zdolność do hydrolitycznego rozkładu wiązania peptydowego, czyli proteolizy. Enzymy te zostały zidentyfikowane zarówno w organizmach prokariotycznych jak i eukariotycznych. Wykazano, że typowy genom ludzki zawiera około 2% genów, które odpowiedzialne są za kodowanie enzymów proteolitycznych.

Proteazy serynowe stanowią prawie jedną trzecią wszystkich enzymów hydrolizujących wiązanie peptydowe. Nazwa tych proteaz pochodzi od obecności nukleofilowego aminokwasu seryny, znajdują-

cej się w miejscu aktywnym enzymu, która atakuje grupę karbonylową wiązania peptydowego tworząc produkt pośredni reakcji tzw. acylo-enzym. Ze względu na to, że reakcje katalizowane przez proteazy są bardzo złożone, Rawlings i Barrett zaproponowali bardzo precyzyjny system opisujący klasyfikację enzymów proteolitycznych - MEROPS. Według tego systemu proteazy są podzielone na kłany, w których następnie wyróżnione są rodziny. Najnowsza baza MEROPS podzieliła proteazy serynowe na 15 klanów, w których znajdują się łącznie 53 rodzin. Celem tej pracy jest krótka charakterystyka proteaz serynowych oraz ich podział na poszczególne kłany.

## SERINE PROTEASES AND THEIR CLASSIFICATION ACCORDING TO MEROPS SYSTEM

## Summary

Proteolytic enzymes, known also as the proteases, proteinases or peptidases, belong to the class of hydrolases involved in hydrolytic degradation of peptide bonds. These enzymes have been identified in both prokaryotic and eukaryotic cells. Typical human genome contains about 2% of the genes that are responsible for encoding of proteolytic enzymes. Serine proteases represent almost one-third of all proteolytic enzymes. The name of these proteases is derived from the presence of the nucleophilic amino acid: serine located in the active site of the enzyme, which attacks the carbonyl group of the pep-

ptide bond forming thereby an intermediate called acyl-enzyme. Due to the fact that the reactions catalyzed by proteases are very complex Rawlings and Barrett proposed a high precision classification system for proteolytic enzymes called MEROPS. Under this system, proteases are divided into clans and families. The recent MEROPS database divided serine proteases into 15 clans containing a together 53 families. The aim of this paper is all short description of serine proteases and their division into different clans.

## LITERATURA

- ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHAFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D. J., 1997. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
- ANDERSON B. F., BAKER H. M., NORRIS G. E., RICE D. W., BAKER E. N., 1989. *Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution*. J Mol. Biol 209, 711-734.
- ARAND M., CRONIN A., ADAMSKA M., OESCH F., 2005. *Epoxide hydrolases: structure, function, mechanism, and assay*. Methods Enzymol. 400, 569-588.
- BARENS T. R., YOSHIDA H., DIJKSTRA B. W., 2004. *Three-dimensional structures of enzymes useful for beta-lactam antibiotic production*. Curr. Opin. Biotechnol. 15, 356-363.
- BARRETT A. J., 1999. *Peptidases: a view of classification and nomenclature*. [W:] *Proteases: New Perspectives*. Turk V. (red.). Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland, 1-12.
- BARRETT A. J., TOLLE D. P., RAWLINGS N. D., 2003. *Managing peptidases in the genomic era*. Biol. Chem. 384, 873-882.
- BEEBE K. D., SHIN J., PENG J., CHAUDHURY C., KHERA J., PEI D., 2000. *Substrate recognition through a PDZ domain in tail-specific protease*. Biochemistry 39, 3149-3155.
- BESCHE H., ZWICKL P., 2004. *The Thermoplasma acidophilum Lon protease has a Ser-Lys dyad active site*. Eur. J. Biochem. 271, 4361-4365.
- BIRKTOFT J. J., BLOW D. M., HENDERSON R., STEITZ T. A., 1970. *I. Serine proteinases. The structure of alpha-chymotrypsin*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 257, 67-76.
- BOTOS I., MELNIKOV E. E., CHERRY S., TROPEA J. E., KHALATOVA A. G., RASULOVA F., DAUTER Z., MAURIZI M. R., ROTANOVA T. V., WLODAWER A., GUSTCHINA A., 2004. *The catalytic domain of Escherichia coli Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site*. J. Biol. Chem. 279, 8140-8148.
- BRANDSTETTER H., KIM J. S., GROLL M., HUBER R., 2001. *Crystal structure of the tricorn protease reveals a protein disassembly line*. Nature 414, 466-470.
- BRYAN P. N., 2000. *Protein engineering of subtilisin*. Biochim. Biophys. Acta 1543, 203-222.
- CARLOS J. L., PAETZEL M., BRUBAKER G., KARLA A., ASHWELL C. M., LIVELY M. O., CAO G., BULLINGER P.,

- DALBEY R. E., 2000. *The role of the membrane-spanning domain of type I signal peptidases in substrate cleavage site selection.* J. Biol. Chem. 275, 38813-38822.
- CHANG G. W., STACEY M., KWAKKENBOS M. J., HAMANN J., GORDON S., LIN H. H., 2003. *Proteolytic cleavage of the EMR2 receptor requires both the extracellular stalk and the GPS motif.* FEBS Lett. 547, 145-150.
- CHEN P., TSUGE H., ALMASSY R. J., GRIBSKOV C. L., KATO S., VANDERPOOL D. L., MARGOSIAK S. A., PINKO C., MATTHEWS D. A., KAN C. C., 1996. *Structure of the human cytomegalovirus protease catalytic domain reveals a novel serine protease fold and catalytic triad.* Cell 86, 835-843.
- DALBEY R. E., LIVELY M. O., BRON S., VAN DIJL J. M., 1997. *The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases.* Protein Sci. 6, 1129-1138.
- DEACON C. F., WAMBERG S., BIE P., HUGHES T. E., HOLST J. J., 2002. *Preservation of active incretin hormones by inhibition of dipeptidyl peptidase IV suppresses meal-induced incretin secretion in dogs.* J. Endocrinol. 172, 355-362.
- DI CERA E., 2009. *Serine proteases.* IUBMB. Life 61, 510-515.
- EDDY S. R., 2008. *A probabilistic model of local sequence alignment that simplifies statistical significance estimation.* PLoS. Comput. Biol. 4, e1000069.
- FEHLHAMMER H., BODE W., HUBER R., 1977. *Crystal structure of bovine trypsinogen at 1-8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, refined crystal structure and comparison with bovine trypsin.* J. Mol. Biol. 111, 415-438.
- FONTOURA B. M., DALES S., BLOBEL G., ZHONG H., 2001. *The nucleoporin Nup98 associates with the intranuclear filamentous protein network of TPR.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3208-3213.
- FREEMAN M., 2008. *Rhomboid proteases and their biological functions.* Annu. Rev. Genet. 42, 191-210.
- GARCIA-MONTOYA I. A., CENDON T. S., AREVALO-GALLEGOS S., RASCON-CRUZ Q., 2012. *Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview.* Biochim. Biophys. Acta 1820, 226-236.
- GOFFIN C., GHUYSEN J. M., 1998. *Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1079-1093.
- GONZALEZ-CHAVEZ S. A., AREVALO-GALLEGOS S., RASCON-CRUZ Q., 2009. *Lactoferrin: structure, function and applications.* Int. J. Antimicrob. Agents 33, 301-308.
- GRAY J. X., HAINO M., ROTH M. J., MAGUIRE J. E., JENSEN P. N., YARME A., STETLER-STEVENSON M. A., SIEBENLIST U., KELLY K., 1996. *CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation.* J. Immunol. 157, 5438-5447.
- GROSS G. J., NITHIPATIKOM K., 2009. *Soluble epoxide hydrolase: a new target for cardioprotection.* Curr. Opin. Investig. Drugs 10, 253-258.
- GUEx N., PEITSCH M. C., 1997. *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.* Electrophoresis 18, 2714-2723.
- HAKANSSON K., WANG A. H., MILLER C. G., 2000. *The structure of aspartyl dipeptidase reveals a unique fold with a Ser-His-Glu catalytic triad.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14097-14102.
- HEDSTROM L., 2002. *Serine protease mechanism and specificity.* Chem. Rev. 102, 4501-4524.
- HEWITT L., KASCHE V., LUMMER K., LEWIS R. J., MURSHDOV G. N., VERMA C. S., DODSON G. G., WILSON K. S., 2000. *Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from Escherichia coli reveals the linker peptide blocking the active-site cleft.* J. Mol. Biol. 302, 887-898.
- HODEL A. E., HODEL M. R., GRIFFIS E. R., HENNIG K. A., RATNER G. A., XU S., POWERS M. A., 2002. *The three-dimensional structure of the autoproteolytic, nuclear pore-targeting domain of the human nucleoporin Nup98.* Mol. Cell 10, 347-358.
- HOLMQUIST M., 2000. *Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms.* Curr. Protein Pept. Sci. 1, 209-235.
- HOTELIER T., RENAULT L., COUSIN X., NEGRE V., MARCHOT P., CHATONNET A., 2004. *ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins.* Nucleic Acids Res. 32, D145-D147.
- IMIG J. D., 2012. *Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology.* Physiol Rev. 92, 101-130.
- INDIANI C., O'DONNELL M., 2013. *A Proposal: Source of single strand DNA that elicits the SOS response.* Front. Biosci. 18, 312-323.
- IWAMOTO M., ASAKAWA H., HIRAOKA Y., HARAGUCHI T., 2010. *Nucleoporin Nup98: a gatekeeper in the eukaryotic kingdoms.* Genes Cells 15, 661-669.
- JOHNSON T. A., QIU J., PLAUT A. G., HOLYOAK T., 2009. *Active-site gating regulates substrate selectivity in a chymotrypsin-like serine protease the structure of haemophilus influenzae immunoglobulin A1 protease.* J. Mol. Biol. 389, 559-574.
- KELLY J. A., KUZIN A. P., CHARLIER P., FONZE E., 1998. *X-ray studies of enzymes that interact with penicillins.* Cell Mol. Life Sci. 54, 353-358.
- KIEFFER T. J., HABENER J. F., 1999. *The glucagon-like peptides.* Endocr. Rev. 20, 876-913.
- KIEFFER T. J., MCINTOSH C. H., PEDERSON R. A., 1995. *Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV.* Endocrinology 136, 3585-3596.
- KIM J. K., YANG I. S., RHEE S., DAUTER Z., LEE Y. S., PARK S. S., KIM K. H., 2003. *Crystal structures of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase: insight into autoproteolytic activation.* Biochemistry 42, 4084-4093.
- KIM A. C., OLIVER D. C., PAETZEL M., 2008. *Crystal structure of a bacterial signal Peptide peptidase.* J. Mol. Biol. 376, 352-366.
- KOP E. N., KWAKKENBOS M. J., TESKE G. J., KRAAN M. C., SMEETS T. J., STACEY M., LIN H. H., TAK P. P., HAMANN J., 2005. *Identification of the epidermal growth factor-TM7 receptor EMR2 and its ligand dermatan sulfate in rheumatoid synovial tissue.* Arthritis Rheum. 52, 442-450.
- KORZA H. J., BOCHTLER M., 2005. *Pseudomonas aeruginosa LD-carboxypeptidase, a serine peptidase with a Ser-His-Glu triad and a nucleophilic elbow.* J. Biol. Chem. 280, 40802-40812.
- KRAUT J., 1977. *Serine proteases: structure and mechanism of catalysis.* Annu. Rev. Biochem. 46, 331-358.
- KREM M. M., DI CERA E., 2001. *Molecular markers of serine protease evolution.* EMBO J. 20, 3036-3045.
- KWAKKENBOS M. J., KOP E. N., STACEY M., MATMATI M., GORDON S., LIN H. H., HAMANN J., 2004. *The EGF-TM7 family: a postgenomic view.* Immunogenetics 55, 655-666.
- LARSEN R. A., KNOX T. M., MILLER C. G., 2001. *Aspartic peptide hydrolases in Salmonella enterica serovar typhimurium.* J. Bacteriol. 183, 3089-3097.
- LASSY R. A., MILLER C. G., 2000. *Peptidase E, a peptidase specific for N-terminal aspartic dipeptides, is a serine hydrolase.* J. Bacteriol. 182, 2536-2543.

- LEE C., SCHWARTZ M. P., PRAKASH S., IWAKURA M., MATOUSCHEK A., 2001. *ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal*. Mol. Cell 7, 627–637.
- LEEMANS J. C., DE VELDE A. A., FLORQUIN S., BENNINK R. J., DE B. K., VAN LIER R. A., VAN DER POLL T., HAMANN J., 2004. *The epidermal growth factor-seven transmembrane (EGF-TM7) receptor CD97 is required for neutrophil migration and host defense*. J. Immunol. 172, 1125–1131.
- LEMBERG M. K., 2013. *Sampling the membrane: function of rhomboid-family proteins*. Trends Cell Biol. 23, 210–217.
- LIAO D. I., REMINGTON S. J., 1990. *Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase*. J. Biol. Chem. 265, 6528–6531.
- LIAO D. I., QIAN J., CHISHOLM D. A., JORDAN D. B., DINER B. A., 2000. *Crystal structures of the photosystem II D1 C-terminal processing protease*. Nat. Struct. Biol. 7, 749–753.
- LIN H. H., CHANG G. W., DAVIES J. Q., STACEY M., HARRIS J., GORDON S., 2004. *Autocatalytic cleavage of the EMR2 receptor occurs at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site motif*. J. Biol. Chem. 279, 31823–31832.
- LITTLE J. W., 1993. *LexA cleavage and other self-processing reactions*. J. Bacteriol. 175, 4943–4950.
- LUO Y., PFUETZNER R. A., MOSIMANN S., PAETZEL M., FREY E. A., CHERNEY M., KIM B., LITTLE J. W., STRYNADKA N. C., 2001. *Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage*. Cell 106, 585–594.
- MAES M. B., SCHARPE S., DE M. I., 2007. *Dipeptidyl peptidase II (DPP2), a review*. Clin. Chim. Acta 380, 31–49.
- MASSOULIE J., PEZZEMENTI L., BON S., KREJCI E., VALLETTE F. M., 1993. *Molecular and cellular biology of cholinesterases*. Prog. Neurobiol. 41, 31–91.
- MATRAI J., VERHEYDEN G., KRUGER P., ENGELBORGH S. Y., 2004. *Simulation of the activation of alpha-chymotrypsin: analysis of the pathway and role of the propeptide*. Protein Sci. 13, 3139–3150.
- MATTHEWS B. W., SIGLER P. B., HENDERSON R., BLOW D. M., 1967. *Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin*. Nature 214, 652–656.
- MEDINA E., WIECZOREK D., MEDINA E. M., YANG Q., FEISS M., CATALANO C. E., 2010. *Assembly and maturation of the bacteriophage lambda procapsid: gpC is the viral protease*. J. Mol. Biol. 401, 813–830.
- MISTRY D., STOCKLEY R. A., 2006. *IgA1 protease*. Int J Biochem. Cell Biol. 38, 1244–1248.
- MUHLHOF M., STUMMEYER K., GROVE M., SAUERBORN M., GERARDY-SCHAHN R., 2003. *Proteolytic processing and oligomerization of bacteriophage-derived endosialidases*. J. Biol. Chem. 278, 12634–12644.
- NAM S. E., KIM A. C., PAETZEL M., 2012. *Crystal structure of Bacillus subtilis signal peptide peptidase A*. J. Mol. Biol. 419, 347–358.
- OCHOA T. J., CLEARLY T. G., 2004. *Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems*. Biometals 17, 257–260.
- OLLIS D. L., CHEAH E., CYGLER M., DIJKSTRA B., FROLOW F., FRANKEN S. M., HAREL M., REMINGTON S. J., SILMAN I., SCHRAG J., 1992. *The alpha/beta hydrolase fold*. Protein Eng. 5, 197–211.
- PAETZEL M., CHERNAIA M., STRYNADKA N., TSCHANTZ W., CAO G., DALBEY R. E., JAMES M. N., 1995. *Crystallization of a soluble, catalytically active form of Escherichia coli leader peptidase*. Proteins 23, 122–125.
- PAETZEL M., DALBEY R. E., STRYNADKA N. C., 2000. *The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target*. Pharmacol. Ther. 87, 27–49.
- PAETZEL M., DALBEY R. E., STRYNADKA N. C., 2002. *Crystal structure of a bacterial signal peptidase apoenzyme: implications for signal peptide binding and the Ser-Lys dyad mechanism*. J. Biol. Chem. 277, 9512–9519.
- PAGE M. J., DI CERA E., 2008. *Serine peptidases: classification, structure and function*. Cell Mol. Life Sci. 65, 1220–1236.
- PEARSON W. R., LIPMAN D. J., 1988. *Improved tools for biological sequence comparison*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444–2448.
- PLAUT A. G., QIU J., ST GEME J. W., 2000. *Human lactoferrin proteolytic activity: analysis of the cleaved region in the IgA protease of Haemophilus influenzae*. Vaccine 19 (Suppl 1), S148–S152.
- PUNTE X. S., SANCHEZ L. M., OVERALL C. M., LOPEZ-OTIN C., 2003. *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. Nat. Rev. Genet. 4, 544–558.
- PUNTE X. S., SANCHEZ L. M., GUTIERREZ-FERNANDEZ A., VELASCO G., LOPEZ-OTIN C., 2005. *A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems*. Biochem. Soc Trans. 33, 331–334.
- RAWLINGS N. D., BARRETT A. J., 1993. *Evolutionary families of peptidases*. Biochem. J. 290, 205–218.
- RAWLINGS N. D., BARRETT A. J., BATEMAN A., 2012. *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Res. 40, D343–D350.
- REID B. G., FENTON W. A., HORWICH A. L., WEBER-BAN E. U., 2001. *ClpA mediates directional translocation of substrate proteins into the ClpP protease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3768–3772.
- REUVEN N. B., ARAD G., MAOR-SHOSHANI A., LIVNEH Z., 1999. *The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication*. J. Biol. Chem. 274, 31763–31766.
- RHAZI N., CHARLIER P., DEHARENG D., ENGER D., VERMEIRE M., FRERE J. M., NGUYEN-DISTECHE M., FONZE E., 2003. *Catalytic mechanism of the Streptomyces K15 DD-transpeptidase/penicillin-binding protein probed by site-directed mutagenesis and structural analysis*. Biochemistry 42, 2895–2906.
- RICHTER R., HEJAZI M., KRAFT R., ZIEGLER K., LOCKAU W., 1999. *Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): molecular cloning of the gene of Synechocystis sp. PCC 6803, expression in Escherichia coli, and biochemical characterization of the purified enzyme*. Eur. J. Biochem. 263, 163–169.
- ROTANOVA T. V., BOTOS I., MELNIKOV E. E., RASULOVA F., GUSTCHINA A., MAURIZI M. R., WLODAWER A., 2006. *Slicing a protease: structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains*. Protein Sci. 15, 1815–1828.
- SAUVAGE E., HERMAN R., PETRELLA S., DUEZ C., BOUILLENNE F., FRERE J. M., CHARLIER P., 2005. *Crystal structure of the Actinomyces R39 DD-peptidase reveals new domains in penicillin-binding proteins*. J. Biol. Chem. 280, 31249–31256.
- SHARIAT-MADAR Z., MAHDI F., SCHMAIER A. H., 2004. *Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein*. Blood 103, 4554–4561.
- SHARIAT-MADAR Z., RAHIMI E., MAHDI F., SCHMAIER A. H., 2005. *Overexpression of prolylcarboxypeptidase enhances plasma prekallikrein activation on Chinese hamster ovary cells*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 289, H2697–H2703.

- SMITHA RAO C. V., ANNE J., 2011. *Bacterial type I signal peptidases as antibiotic targets*. Future. Microbiol. 6, 1279-1296.
- SONAWANE V. C., 2006. *Enzymatic modifications of cephalosporins by cephalosporin acylase and other enzymes*. Crit. Rev. Biotechnol. 26, 95-120.
- VALENTI P., BERLUTTI F., CONTE M. P., LONGHI C., SEGANTI L., 2004. *Lactoferrin functions: current status and perspectives*. J. Clin. Gastroenterol. 38, S127-S129.
- WANG Y., ZHANG Y., HA Y., 2006. *Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease*. Nature 444, 179-180.
- WANG Y. X., ULU A., ZHANG L. N., HAMMOCK B., 2010. *Soluble epoxide hydrolase in atherosclerosis*. Curr. Atheroscler. Rep. 12, 174-183.
- WEBB E. C., 1993. *Enzyme nomenclature: a personal retrospective*. FASEB J. 7, 1192-1194.
- WLODAWER A., LI M., GUSTCHINA A., OYAMA H., DUNN B. M., ODA K., 2003. *Structural and enzymatic properties of the sedolisin family of serine-carboxyl peptidases*. Acta Biochim. Pol. 50, 81-102.
- WRIGHT C. S., ALDEN R. A., KRAUT J., 1969. *Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angstrom resolution*. Nature 221, 235-242.
- XUE Y., CHOWDHURY S., LIU X., AKIYAMA Y., ELLMAN J., HA Y., 2012. *Conformational change in rhomboid protease GlpG induced by inhibitor binding to its S' subsites*. Biochemistry 51, 3723-3731.
- YIN J., DENG Z., ZHAO G., HUANG X., 2011. *The N-terminal nucleophile serine of cephalosporin acylase executes the second autoproteolytic cleavage and acylpeptide hydrolysis*. J. Biol. Chem. 286, 24476-24486.
- YU A. Y., HOURY W. A., 2007. *ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases*. FEBS Lett. 581, 3749-3757.
- ZHANG J., YE F., LAN L., JIANG H., LUO C., YANG C. G., 2011. *Structural switching of Staphylococcus aureus Clp protease: a key to understanding protease dynamics*. J. Biol. Chem. 286, 37590-37601.