



УДК 577.152.34.02

МЕХАНИЗМЫ ПРОТЕОЛИЗА

Антонов В. К., Гинодман Л. М., Руми Л. Д.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

На основании главным образом собственных экспериментальных данных проанализированы механизмы катализируемого протеолитическими ферментами гидролиза амидных связей. Предложено объяснение эффективности и специфичности протеиназ, связывающее эти особенности ферментов с состоянием субстрата в продуктивном фермент-субстратном комплексе.

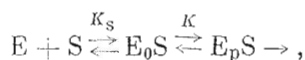
Введение

Ферментативный гидролиз амидных связей в пептидах и белках привлекает в последние годы все большее внимание в связи с той ролью, которую этот процесс играет в регуляторных механизмах жизнедеятельности клетки [1]. Протеолитические ферменты являются, кроме того, «пробным камнем», на котором проверяются многочисленные методические подходы и теоретические концепции ферментативного катализа. Принято считать, что ферменты этой группы относятся к числу сравнительно медленно действующих. Однако это не так: при использовании адекватных субстратов наблюдаемые ускорения по сравнению с модельными реакциями достигают 12(!) порядков. Гидролиз некоторых специфических субстратов протеолитических ферментов происходит с константами скорости второго порядка (k_{cat}/K_m) около $10^7-10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, т. е. близкими к константам диффузионно-контролируемых процессов [2].

Ниже будут рассмотрены отдельные этапы расщепления амидных связей протеолитическими ферментами и изложены наши представления о причинах эффективности и специфичности этого класса ферментов.

I. Образование фермент-субстратного комплекса

Фермент-субстратный комплекс — специфическое образование, в котором группировки субстрата и фермента фиксированы в определенных положениях и стабилизированы многочисленными взаимодействиями. Трудно себе представить, чтобы такое сложное, упорядоченное образование возникло одностадийно, в процессе соударения взаимодействующих молекул. Действительно, в последние годы появляется все больше данных о том, что комплексообразование белков с лигандами — многостадийный или, по крайней мере, двухстадийный процесс. Некоторые примеры этому приведены в табл. 1. Видно, что за быстрой стадией, характеризующейся константой скорости (k_1) порядка $10^8-10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, следует существенно более медленная стадия «изомеризации» первого («внешнего») фермент-субстратного комплекса (k_2). Константы скоростей диссоциации этих комплексов обычно существенно ниже констант скоростей их образования, однако есть случаи, когда $k_{-2} > k_2$ и равновесие в системе



где $K_s = k_{-1}/k_1$ и $K = k_2/k_{-2} = [E_pS]/[E_0S]$, сдвинуто в сторону «внешнего»

Использованы следующие нестандартные сокращения: Арт — 3-(морфолинпропил)амид; БПТИ — бычий панкреатический трипсиновый ингибитор; *p*-NA — *n*-итроанилид; Phe(NO₂) — остаток *n*-нитрофенилаланина.

Константы скорости образования и распада комплексов протеиназ с субстратами и ингибиторами

Фермент	Субстрат или ингибитор	k_1 , M ⁻¹ ·с ⁻¹	k_{-1}	k_2	k_{-2}	Литература
Химотрипсин	Ac-Phe-pNA	1,5·10 ⁷	4·10 ³	2,6·10 ⁻³ *	—	[3]
Папаин	Z-Lys-pNA	2,7·10 ⁶	0,27·10 ³	9,1·10 ⁻⁴ *	1·10 ⁻⁵	[4]
	Mns-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	—	—	4000	15	[5]
Пепсин	Пепстатин	7·10 ⁵	—	600	~0	[6]
Карбоксипептидаза А	H-Gly-Phe-OH	—	—	3250	100	[7]
	H-Phe-OH	—	—	1156	1746	[7]

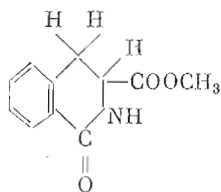
* В условиях криоэнзимологического эксперимента при $-55 \div -30^\circ \text{C}$ 60—65% Me₂SO.

комплекса ($K < 1$). Следует отметить, что только в этом случае экспериментально наблюдаемая в кинетическом опыте величина $K_{m(\text{нак})} = K_s$. В случае же, когда $K > 1$, $K_{m(\text{нак})} = K_s/K$.

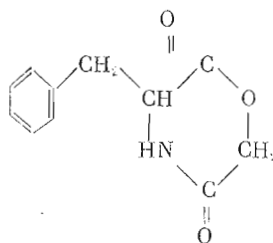
Весьма вероятно, что образование «внешнего» комплекса происходит за счет взаимодействия фермента с одной или минимальным числом групп субстрата и преимущественно за счет дальнедействующих, изотропных сил (электростатических, гидрофобных). Для многих протеолитических ферментов характерно наличие двух уровней специфичности: первичной, обусловленной структурой остатка, соседнего с расщепляемой связью, и вторичной, зависящей от строения удаленных от расщепляемой связи остатков. Можно полагать, что образование «внешнего» и «внутреннего» комплексов связано с реализацией соответственно первичной и вторичной специфичности фермента. Более подробно этот вопрос будет обсуждаться ниже (раздел VII).

II. Структура продуктивного комплекса

Наиболее информативным методом выяснения структуры фермент-субстратных комплексов является кристаллографический анализ. Однако и этот метод имеет свои ограничения. Поэтому важно располагать альтернативными способами определения структуры субстрата в комплексе с ферментом. Один из таких способов был предложен еще в 60—70-х годах [8—10]. Он заключается в исследовании гидролиза ферментом субстратов с ограниченной конформационной подвижностью, например гидролиза химотрипсином соединений (I) и (II)



(I)



(II)

Поскольку фермент специфичен к экваториальной *D*-форме (I) и к *L*-форме (II), можно сделать заключение о конформации типичного субстрата химотрипсина — эфира *N*-ацетил-*L*-фенилаланина в активном центре (рис. 1).

Другой подход заключается в изучении топографии активных центров сериновых гидролаз с помощью бифункциональных обратимых ингибиторов — алкил- и арилалкилборных кислот [11—17]. Анализируя изменение свободной энергии сорбции алкилборных кислот в зависимости от длины алкильной цепи, можно сделать вывод о протяженности сорбционного участка и его расстоянии от каталитических групп в активном центре фермента (рис. 2).

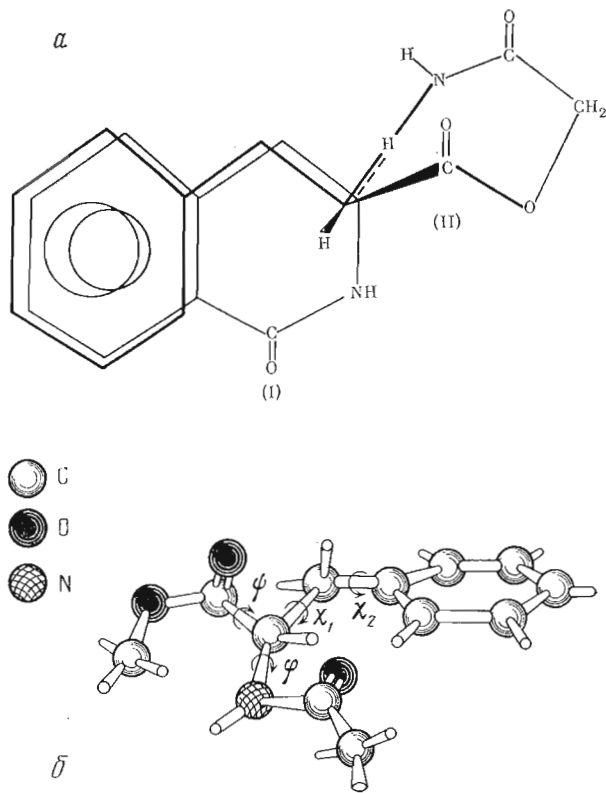


Рис. 1. *a* – совмещение субстратов (I) и (II) с ограниченной конформационной подвижностью. Реакционная конформация N-ацетил-L-фенилаланина показана жирной линией. *б* – пространственная модель конформации эфира N-ацетил-L-фенилаланина в активном центре химотрипсина [10]

Еще один способ, применимый к ферментам с выраженной вторичной специфичностью, основан на статистическом анализе расщепления различных пептидных связей в белках [18]. Такой анализ позволяет вычислить «индексы специфичности» (S_{ij}) для каждой аминокислоты в любом положении субстрата, а также «средние индексы специфичности» (\bar{S}_j) для каждого положения, характеризующие жесткость требований соответствующего участка активного центра фермента к структуре боковой цепи субстрата. Статистический анализ специфичности пепсина позволил установить протяженность активного центра этого фермента и структурные ограничения в отдельных его участках.

Индексы специфичности коррелируют с каталитическими константами (k_{cat} и k_{cat}/K_m) гидролиза пепсином пептидных субстратов [19]. Эмпирические зависимости этих констант от суммарных индексов специфичности

$$\ln k_{cat} = 13,67 \pm 0,67 \ln (\Sigma S_{ij} + \Sigma \bar{S}_j) - (31,34 \pm 1,75)$$

$$\ln (k_{cat}/K_m) = 16,13 \pm 1,08 \ln (\Sigma S_{ij} + \Sigma \bar{S}_j) - (36,77 \pm 2,82)$$

дают возможность рассчитать величины k_{cat} и k_{cat}/K_m для любой последовательности аминокислот (рис. 3).

Существенную информацию о расположении лиганда в активном центре фермента может дать изучение действия достаточно простых факторов на гидролиз подходящим образом подобранных субстратов. Так, оказалось [20], что этанол является конкурентным ингибитором гидролиза пепсином субстрата Z-Phe(NO₂)-Ala-Arm и неконкурентным ингибитором гидролиза другого субстрата – Z-Ala-Phe(NO₂)-Arm, откуда следует, что молекула спирта связывается в том же локусе, что и ароматическое кольцо первого субстрата. Этот вывод полностью подтвер-

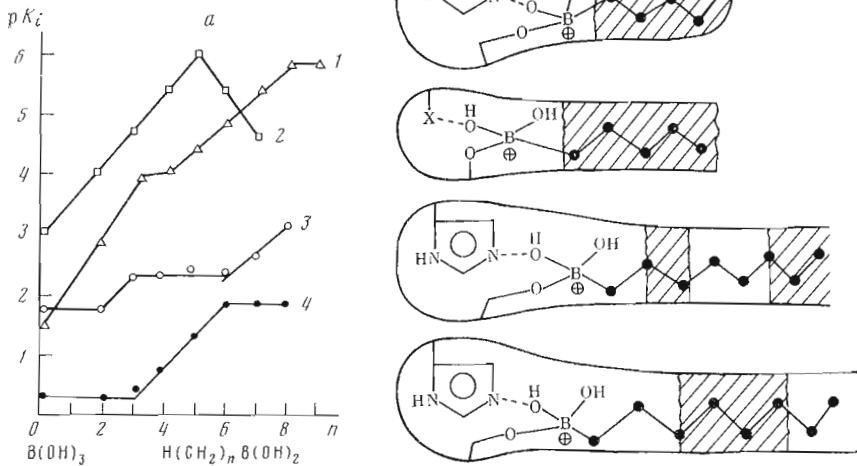


Рис. 2. Примеры зависимости эффективности ингибирования панкреатической липазы (1), пенициллинамидазы (2), субтилизина BPN' (3) и α -химотрипсина (4) от длины алкильной цепи алкилборных кислот (а) и соответствующие этим данным схематические изображения топографии активных центров этих ферментов (б)

дился при исследовании кристаллической структуры комплекса пепсина с субстратоподобным ингибитором [21]. Таким образом, кинетический субстратный и ингибиторный анализы позволяют получить ценные сведения о структуре активных центров протеиназ и их комплексов. Эти сведения дополняют результаты кристаллографических исследований ферментов.

До сих пор речь шла об атомах и группах субстрата, непосредственно не участвующих в химическом превращении. Что касается расщепляемой амидной группы субстрата, то есть основания полагать, что в продуктивном фермент-субстратном комплексе эта группа имеет частично неплоское строение (рис. 4). Это видно из табл. 2, где собраны немногочисленные кристаллографические данные по этому вопросу. Нарушение плоской структуры амидной группы происходит за счет ее «пирамидализации», что может иметь важное значение для эффективности катализа (см. раздел VII).

III. Нуклеофильная атака

В активные центры протеолитических ферментов входят нуклеофильные группы и связанные молекулы воды, участвующие в химическом превращении амидной группы субстрата. Нуклеофильные группы могут

Таблица 2

Внеплоскостная деформация амидной связи лиганда в комплексах с некоторыми протеиназами

Комплекс	Связь	ΔC	Литература
Химотрипсин – БПТИ	Lys ¹⁵ -Ala ¹⁶	0,38	*
Трипсин – БПТИ	То же	0,28	[22]
Эластаза – CF ₃ CO-Lys-Ala-NHC ₆ H ₄ CF ₃	CF ₃ CO-NH-	0,42	[23]
Термолизин – C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂ CO-Phe-OH	-CO-NH-	0,06	[24]
Карбоксипептидаза А – H-Gly-Tyr-OH	-CO-NH-	0,012	[25]

* Координаты любезно предоставлены проф. Д. Блоу (Англия).

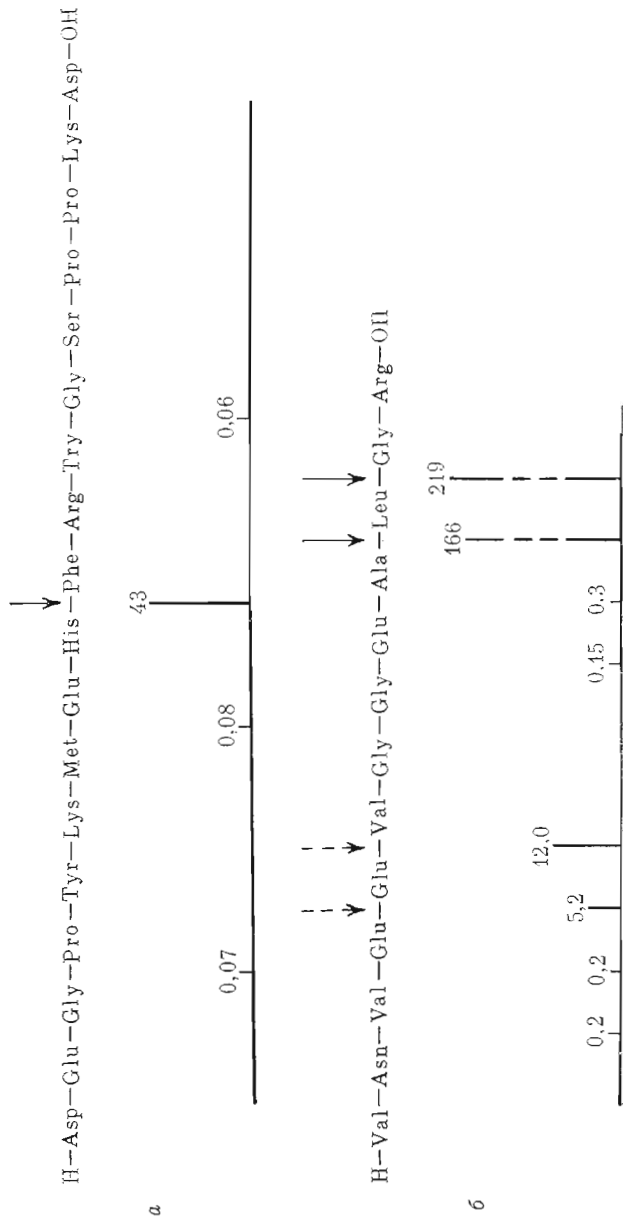


Рис. 3. Результаты расчетов констант скоростей гидролиза пепсином β -меланоцитстимулирующего гормона из гипофиза свиньи (a) и трипсинового фрагмента (18-30) β -цепи гемоглобина кролика (б), выполненных на основе статистического анализа (А. А. Зинченко). Цифрами даны величины k_{cat} в мин^{-1} . Стрелками показаны места расщепления, найденные экспериментально

выступать в роли каталитических групп, непосредственно атакующих карбонильный углерод субстрата, или в роли общего основания, способствуя отщеплению протона от молекулы воды.

Нами было разработано несколько методов, позволяющих различить эти два типа механизма. Эти методы основаны на изучении включения тяжелого кислорода из $H_2^{18}O$ в субстрат или продукт транспептидации, а также на сравнении скорости собственного обмена кислорода в карбоксильной группе ацильного продукта гидролиза с обменом в присутствии второго, аминного продукта (схема 1) [26–30]. Легко видеть, что включение тяжелого кислорода в субстрат будет происходить только в случае общего основного катализа при условии, что скорость распада промежуточного тетраэдрического соединения в сторону исходного субстрата выше, чем скорость его распада в направлении продуктов гидролиза.

Включение кислородной метки в продукты ацильного переноса (транспептидации) также будет происходить лишь в случае общего основного катализа, поскольку при ковалентном типе катализа вода участвует лишь на стадии расщепления ацилфермента.

Наконец, при общем основном катализе может наблюдаться ускорение собственного обмена кислорода в карбоксильной группе ацильного продукта гидролиза, если ввести в систему аминный продукт, причем в этом случае скорость синтеза и гидролиза амидной связи должна быть сопоставима со скоростью наблюдаемого обмена кислорода.

Используя эти подходы, мы показали, что в случае представителей сериновых и тиоловых протеиназ гидролиз амидов идет по механизму ковалентного типа, тогда как в случае карбоксильных и металлзависимых протеиназ — по общему основному механизму без образования ковалентного промежуточного соединения типа ацилфермент (табл. 3 и 4). Необходимо отметить, что если в катализе участвует карбоксильная группа, то не исключена возможность ее функционирования по типу ковалентного катализа с последующим расщеплением ангидридной связи по карбонильной группе, принадлежащей ферменту (схема 2). Чтобы исключить

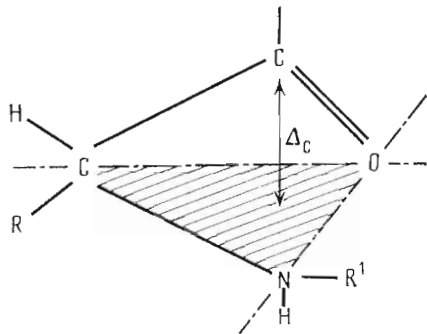
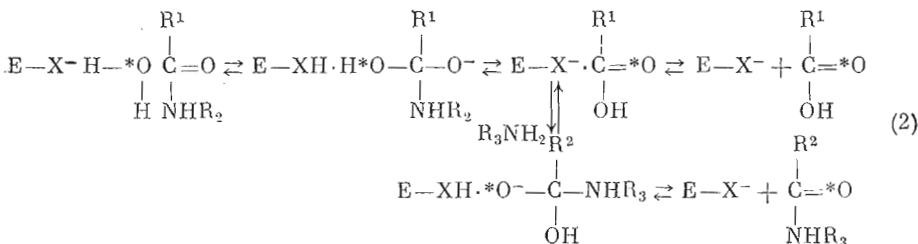
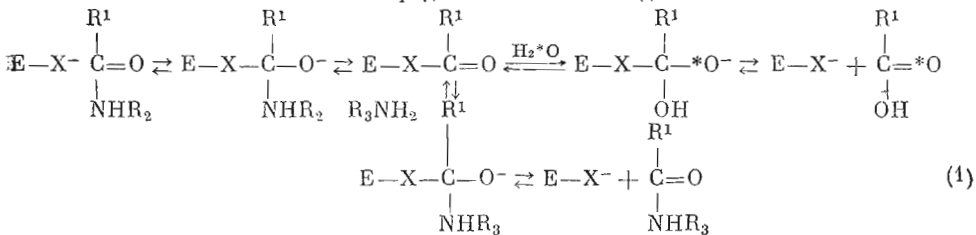


Рис. 4. Пирамидализация амидной группы

Схема 1

Ковалентный (1) и общий основной (2) механизмы гидролиза и транспептидации
Атом кислорода ^{18}O отмечен звездочкой



Включение ^{18}O из тяжелоокислородной воды в субстрат и продукты транспептидации

Фермент	Исследуемая реакция	Включение, %	
		в суб- страт	в продукт транспеп- тидации
Химотрипсин	$\text{Ac-Phe-Gly-NH}_2 \rightleftharpoons \text{Ac-Phe-OH} + \text{H-Gly-NH}_2^*$	~0	—
Папаин	$2\text{H-Leu-Leu-NH}_2 \rightarrow \text{H-(Leu)}_3\text{-OH} + \text{H-Leu-NH}_2 + \text{NH}_3$	0	0
γ -Глутамилтрансфе- раза	$\text{Z-Gly-NH}_2 + \text{Leu-Gly} \rightarrow \text{Z-Gly-Leu-Gly-OH} + \text{NH}_3$	0	0
Пепсин	$\text{Glu (pNA)} + \text{H-Gly-Gly-OH} \rightarrow \text{Glu (-Gly-Gly-OH)}$	—	0
Лейцинамниопепти- даза	$2\text{H-Leu-Tyr-NH}_2 \rightarrow \text{H-Leu-Leu-OH} + 2\text{H-Tyr-NH}_2$	13	56
Термолизин	$2\text{H-Leu-NH}_2 \rightarrow \text{H-Leu-Leu-NH}_2 + \text{NH}_3$	48	46
	$2\text{H-Leu-Leu-NH}_2 \rightarrow \text{H-Leu-Leu-OH} + 2\text{H-Leu-NH}_2$	52	47

* В условиях термодинамического равновесия.

Таблица 4

Скорость обмена кислорода в карбоксильной группе ацильного продукта реакции

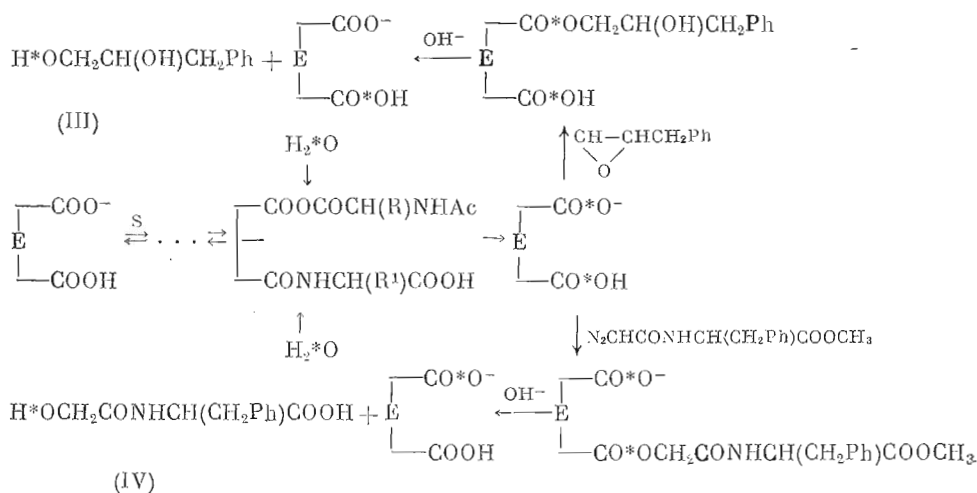
Фермент	Субстрат (ацильный продукт гидролиза) и добавки	V_{max} обмена, М·мин $^{-1}$	$V_{\text{max}}^{(2)} / V_{\text{max}}^{(1)}$
Химотрипсин	(1) Ac-Phe-OH	$3 \cdot 10^{-5}$	0,5
	(2) Ac-Phe-OH + H-Ala-NH ₂	$1,5 \cdot 10^{-5}$	
Пепсин	(1) Ac-Phe-OH	$2,5 \cdot 10^{-5}$	2,24
	(2) Ac-Phe-OH + H-Phe-Ala-Ala-OMe	$5,6 \cdot 10^{-5}$	
Лейцинамнио- пептидаза	(1) H-Leu-OH	$1,6 \cdot 10^{-3}$	2,19
	(2) H-Leu-OH + H-Leu-NH(CH ₂) ₂ OH	$3,5 \cdot 10^{-3}$	
Карбоксипепти- даза А	(1) Ac-Phe-OH	$3,3 \cdot 10^{-6}$	3,5
	(2) Ac-Phe-OH + H-Phe-OH	$11,6 \cdot 10^{-6}$	

эту возможность, было исследовано [30] включение метки ^{18}O не только в субстрат и продукт транспептидации, но и в фермент. После проведения гидролиза в тяжелоокислородной воде пепсин ингибировали специфическими ингибиторами, затем разрушали в мягких условиях образовавшиеся сложноефирные группы и исследовали полученные производные ингибиторов (III) и (IV) на содержание ^{18}O . Были получены отрицательные результаты.

Таким образом, в случае сериновых и тиоловых протеиназ нуклеофилом, непосредственно атакующим карбонильный углерод субстрата, явля-

Схема 2

Схема опытов по обмену кислорода в карбоксильной группе пепсина (см. текст)



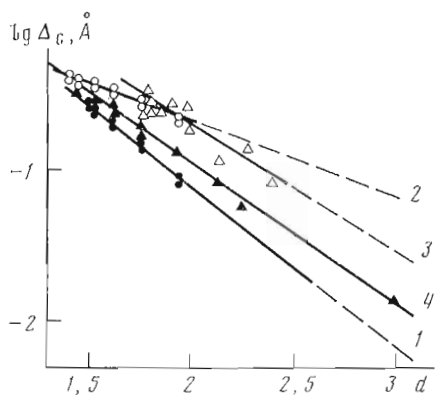


Рис. 5

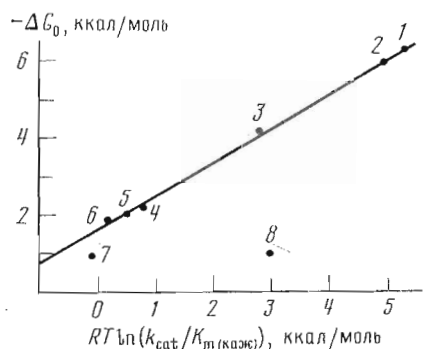


Рис. 7

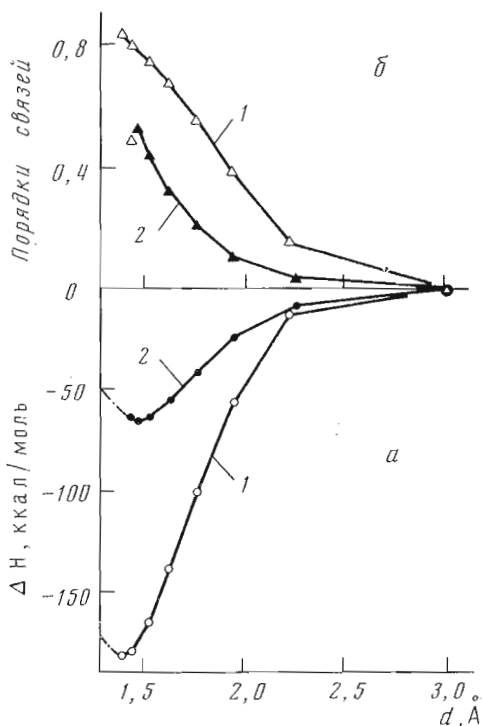


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость логарифма степени пирамидализации амидной группы в метилацетамиде от расстояния (d) между карбонильным атомом углерода и нуклеофилом. 1 – CH_3OH , 2 – CH_3O^- , 3 – CH_3S^- , 4 – $\text{H}_2\text{O} - \text{HCOO}^-$. Рассчитано методом CNDO/2 (программа GEOMO)

Рис. 6. а – изменение потенциальной энергии при атаке карбонильного углерода N-метилацетамида метоксидионом (1) и метанолом (2); d – расстояние между карбонильным атомом углерода N-метилацетамида и спиртовым атомом кислорода; б – соответствующее изменение порядков C–N-связи (в ед. Вибера). Рассчитано методом CNDO/2 (программа GEOMO)

Рис. 7. Корреляция стандартной свободной энергии гидролиза субстратов типа Ac-Phe(NO_2)-X и констант скорости второго порядка их гидролиза химотрипсином X=OEt (1), OMe (2), $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ -n (3), NHC_6H_5 (4), NH_2 (5), NHNH_2 (6), Gly- NH_2 (7), Ala- NH_2 (8)

ется соответственно спиртовой гидроксил (остатка Ser¹⁹⁵ в последовательности химотрипсина) и тиоловая группа (Cys²⁵ в последовательности папаина), а в случае карбоксильных и металлзависимых протеиназ – связанная с ферментом молекула воды. Эти группы, а также молекула воды являются весьма слабыми нуклеофилами, поэтому возникает вопрос: за счет чего обеспечиваются высокие скорости катализа? Существовавшее до недавнего времени представление об ионизации серинового гидроксила в активном центре сериновых протеиназ за счет «системы переноса заряда» является, судя по последним данным, ошибочным (см., например, [31]). Что касается тиоловых протеиназ, то, хотя SH-группа в активном центре этих ферментов ионизирована, в модельных реакциях тиолиз амидов (например, трифторэтантиолом [32]) идет примерно на 6 порядков медленнее, чем их щелочной гидролиз.

Необходимо подчеркнуть, что в эффективность гидролиза амидов очень малый вклад вносит собственно нуклеофильная атака и очень большой – резонансная дестабилизация амидной группы [33]. Отсюда следует, что, если бы фермент «умел» нарушить сопряжение в амидной группе, дальнейший процесс присоединения нуклеофила происходил бы с очень низ-

кими энергиями активации. Выше мы отмечали, что для некоторых комплексов фермент-субстратоподобный ингибитор наблюдается заметная пирамидализация потенциально расщепляемой связи. Если это общее явление для субстратов протеолитических ферментов, то нуклеофильность атакующей группы не имеет значения. Вопрос сводится к тому, как фермент дестабилизирует амидную группу субстрата.

Исследования циклических аминокетонов показали [34], что, чем ближе расстояние между аминогруппой и карбонильным углеродом, тем сильнее этот углеродный атом выходит из плоскости, образованной атомами O, C₍₁₎ и C₍₂₎, т. е. пирамидализация атакующей группы индуцируется самим нуклеофилом. Аналогичная ситуация может иметь место при нуклеофильной атаке на амидную группу. На рис. 5 представлены результаты квантово-химического расчета пирамидализации амидной группы при сближении различных нуклеофилов с карбонильным углеродом. Видно, что на относительно больших расстояниях пирамидализация четко зависит от pK_a нуклеофила. Для метанола и системы вода — формиат-ион при расстояниях, примерно равных сумме ван-дер-ваальсовых радиусов, степень пирамидализации все же весьма низкая ($\Delta_c = 0,007 - 0,016$). Нельзя, однако, исключить, что в продуктивном фермент-субстратном комплексе, особенно в случае специфических субстратов, расстояние между нуклеофилом и карбонильным углеродом оказывается меньше суммы ван-дер-ваальсовых радиусов (ср. [35]), как это наблюдается в случае комплексов сериновых протеиназ с белковыми ингибиторами (табл. 2). Если в основном состоянии амидная связь заметно пирамидализована, то дальнейшая нуклеофильная атака будет происходить с минимальной энергией активации (рис. 6) и система будет достигать равновесия, когда расстояние между спиртовой группой и карбонильным углеродом достигнет величины $\sim 1,5 \text{ \AA}$, т. е. величины, несколько большей, чем длина O—C-ковалентной связи. Дальнейшее продвижение по координате реакции возможно только, если имеется акцептор протона.

Эффективность ферментативного гидролиза связана со степенью резонансной дестабилизации расщепляемой группы, что демонстрируется существованием линейной корреляции величин стандартной свободной энергии различных производных ацетилфенилаланина и констант скорости второго порядка их химотрипсинового гидролиза (рис. 7) [36]. Эти данные показывают также, что причина существенно большей скорости гидролиза сложных эфиров химотрипсином по сравнению со скоростью гидролиза амидов заключается в особенностях структуры расщепляемой группы, а не в особенностях активного центра фермента.

IV. Тетраэдрическое промежуточное соединение

Нуклеофильная атака карбонильного углерода субстрата завершается образованием тетраэдрического промежуточного соединения. При неферментативном гидролизе эти промежуточные соединения были идентифицированы главным образом на основании опытов по включению-¹⁸O из тяжелоокислородной воды в субстрат [37]. В случае гидролиза, катализируемого пепсином, лейциламинопептидазой и термолизинном (табл. 3), наблюдается существенный обмен карбонильного кислорода на изотоп ¹⁸O, тогда как при катализе химотрипсином и папаином обмен не происходит. Отсутствие включения ¹⁸O в субстрат еще не свидетельствует о том, что тетраэдрическое промежуточное соединение не образуется. Это может быть связано с преимущественным распадом тетраэдра в направлении продуктов гидролиза. Оказалось, что при ферментативном гидролизе включение ¹⁸O в субстрат также не может служить доказательством образования тетраэдрического промежуточного соединения. Было показано, что включение ¹⁸O в лейцинамид при гидролизе этого субстрата лейциламинопептидазой обусловлено транспептидацией на образующийся в ходе гидролиза аммиак [38]. Эти результаты, конечно, не опровергают существования тетраэдра. Таким образом, четкие экспериментальные данные-

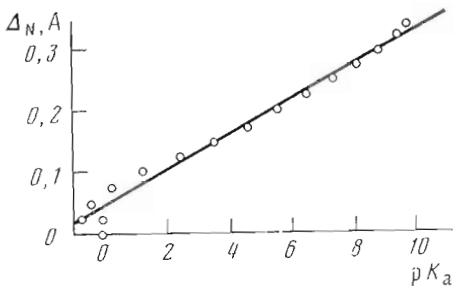


Рис. 8

Рис. 8. Зависимость pK_a уходящей группы от степени пирамидализации амидной группировки. Рассчитано методом CNDO/2

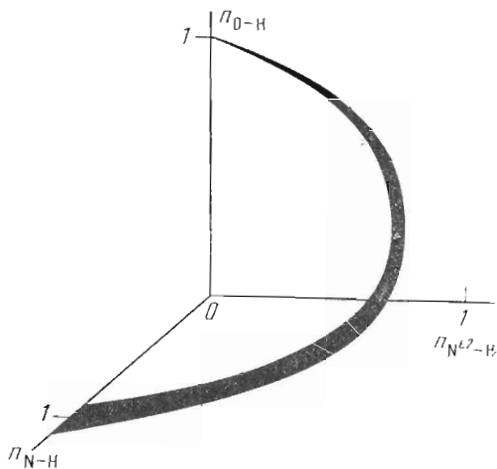


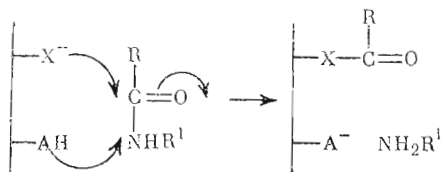
Рис. 9

Рис. 9. Возможный механизм переноса протона при гидролизе амидов. На осях — порядки связей участвующих в реакции группировок O—H Ser¹⁹⁵, N—H His⁵⁷ (N^{δ2}) и HN—H субстрата

как в пользу, так и против тетраэдрического промежуточного соединения при ферментативном гидролизе амидов отсутствуют.

Альтернативным механизмом, не включающим образование промежуточного соединения, является механизм типа S_N2 (схема 3). Этот механизм может реализоваться лишь в том случае, если pK_a уходящей группы достаточно велико. Увеличивающаяся в ходе нуклеофильной атаки пирамидализация амидной группы повышает значение pK_a амидного азота.

Схема 3



Гидролиз амидов по механизму S_N2

Квантово-химические расчеты (рис. 8) показывают, что pK_a уходящей группы может достигать значений ~ 7 , когда величина Δ_N составляет 0,2 Å, т. е. меньше, чем половину от пирамидализации в полностью сформированном тетраэдре. При этих значениях pK_a уходящей группы протон нуклеофила может непосредственно переноситься на эту группу. Таким образом, реакция будет, по крайней мере частично, идти по S_N2 -механизму (рис. 9). Все это справедливо для обычных алифатических амидов или пептидов, но в случае, например, анилидов и тем более эфиров pK_a уходящих групп остается все еще очень низким и реакция, по-видимому, происходит с образованием тетраэдрического промежуточного соединения.

V. Ацилфермент

Распад тетраэдрических промежуточных соединений или реакции типа S_N2 в случае сериновых и тироловых протеиназ приводят к образованию ацилферментов. В условиях насыщения субстратом стационарная концентрация ацилфермента при гидролизе специфических эфирных субстратов практически равна концентрации фермента. При гидролизе амидных субстратов ацилфермент не накапливается в системе. Стационарная

концентрация N-ацетил-L-фенилаланилхимотрипсина, образующегося при гидролизе N-ацетил-L-фенилаланилглицинамида, при pH 5,5 составляет 0,15% от концентрации фермента [26].

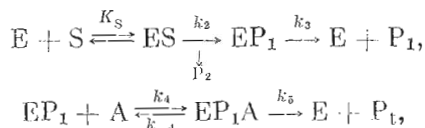
Ацилферменты нельзя считать «активированными» эфирами. Так, изменение стандартной свободной энергии гидролиза N-ацетил-L-фенилаланилхимотрипсина при pH 7,3 составляет $-3,4$ ккал/моль, тогда как аналогичное изменение при гидролизе метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина около -6 ккал/моль [26, 36].

Гидролиз ацилферментов ставит те же проблемы, что и гидролиз амидов. Нуклеофилом в этих случаях является молекула воды и движущей силой дезацилирования может быть или эффективный общий основной катализ, или же дестабилизация эфирной группы.

Рентгеноструктурные данные (с разрешением $2,5 \text{ \AA}$ [39]) показывают, что сложноэфирная связь в индолилакрилоилхимотрипсине значительно искажена ($\Delta_s 0,3 \text{ \AA}$ и $\omega -122^\circ$). Устойчивость этого ацилфермента обусловлена неправильным расположением молекулы воды относительно гидролизуемой связи. Возможно, что в специфических ацилферментах сохраняется резонансная дестабилизация сложноэфирной группы, но молекула воды занимает правильную ориентацию (соответствующую положению уходящей группы в фермент-субстратном комплексе), что обеспечивает быстрое дезацилирование.

VI. Комплексы фермент — продукт и проблема транспептидации

Выше было показано, что при гидролизе, катализируемом карбоксильными и металлзависимыми протеиназами, ацилферменты не образуются. Между тем многие из этих протеиназ эффективно катализируют реакции транспептидации по типу ацильного и аминопереноса [40, 41]. Отсюда следует, что эти реакции идут из нековалентных комплексов фермент — продукт, причем эти комплексы должны быть достаточно устойчивыми, чтобы обеспечить возможность связывания акцептора транспептидации и образование новой химической связи между донором и акцептором. Экспериментально определяемые константы скорости диссоциации комплексов фермент — продукт (ингибитор) лежат в области $1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$. Если принять эти значения, можно оценить, каковы будут при этом скорости транспептидации. В 1974 г. мы разработали метод определения начальных скоростей транспептидации [42]. Для кинетической схемы этого процесса:



где S — субстрат, P_t — продукт транспептидации; P_1 и P_2 — соответственно первый (переносимый) и второй продукты гидролиза, A — акцептор транспептидации. Отношение скоростей гидролиза (v_h) и транспептидации (v_t) дается уравнением

$$\frac{v_h}{v_t} = \frac{k_3 k_{-4}}{k_4 k_5} \cdot \frac{1}{[A]_0}. \quad (1)$$

Величины v_h/v_t и k_3 для некоторых реакций транспептидации, катализируемых пепсином, приведены в табл. 5.

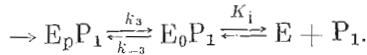
Полагая, что $k_3 \approx k_{-4}$ и $k_4 \approx 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, и подставляя в уравнение (1) значения k_5 , $[A]_0$ и приведенные выше константы скорости диссоциации комплекса EP_1 ($k_3 \approx k_{-4}$) $= 1 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$, получим для системы Ac-Phe-Tyr-OH + Z-Phe(NO₂)-OH величину $v_h/v_t \sim 3 \cdot 10^7$. Экспериментальное значение v_h/v_t для этой системы примерно на 6 (!) порядков ниже. Отсюда следует, что скорости диссоциации обычных комплексов фермент — продукт слишком велики, чтобы обеспечить наблюдаемые скорости транспептидации.

Это противоречие можно снять, предположив, что на пути превращения

Каталитические параметры транспептидации, катализируемой пепсином
 Акцептор (А) — Z-Phe(NO₂)-OH, [A]₀ = 0,667 мМ, рН 4,6

Субстрат	v_H/v_L (эксперим.)	$k_3 \cdot 10^4, c^{-1}$	$(v_H/v_L) \cdot 10^{-7}$ (расчетн.)
Ac-Phe-Tyr-OH	22,0	5,1	2,9
Ac-Tyr-Tyr-OH	22,2	4,9	3,0
Ac-Phe-Phe-Apm	351	7,75	1,9
Gly-Gly-Phe-Phe-Apm	380	8,1	1,84

субстрата в продукты происходит не только ступенчатое образование продуктивного фермент-субстратного комплекса (Введение), но и ступенчатая диссоциация комплексов фермента с продуктом



В этом случае кажущаяся константа диссоциации комплекса $E_p P_1$ будет

$$K_i' = \frac{K_i K_Q}{1 + K_Q},$$

где

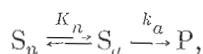
$$K_Q = \frac{k_3}{k_{-3}} = \frac{[E_0 P_1]}{[E_p P_1]}.$$

Если равновесие в системе сдвинуто в сторону комплекса $E_0 P_1$, то $K_i' = K_i$, т. е. наблюдаемая константа диссоциации характеризует лишь диссоциацию комплекса $E_0 P_1$ и этот комплекс может распадаться до E и P_1 с константами скорости $\sim 1 \cdot 10^5 c^{-1}$. Превращение же $E_p P_1$ в $E_0 P_1$ может быть достаточно медленным, а обратный процесс еще медленнее (так как $K_Q > 1$). Транспептидация, очевидно, происходит в комплексе $E_p P_1$ с акцептором, и этот комплекс образуется, если в системе есть субстрат.

VII. Эффективность и специфичность протеолиза

Эффективность ферментативной реакции определяется из сравнения констант ее скорости с константами скорости модельной (конгруэнтной) реакции. При этом важен выбор как сравниваемых констант, так и составный вещества в модельной и ферментативной реакция. Выше мы показали, что эффективный гидролиз пептидной связи протеиназами может быть обусловлен способностью последних дестабилизировать расщепляемую связь путем ее пирамидализации. Если эти представления верны, то это означает, что в основном состоянии ферментативной реакции реагирующая группа субстрата имеет иную структуру, чем амидная группа в модельной реакции. В этом случае сравнивать активационные барьеры химического превращения субстрата на ферменте и в растворе было бы неправильно, поскольку основные состояния в этих двух случаях различны. Для правильного сравнения нужно выбрать ту форму субстрата в модельной реакции, которая существует на ферменте. Ясно, что такая форма субстрата будет присутствовать в растворе в очень низкой концентрации, но ее реакционная способность будет велика. По отношению к этой форме субстрата роль фермента будет заключаться в ее стабилизации, а активационные барьеры превращения этой формы в продукты реакции на ферменте и в растворе могут и не различаться. Таким образом, мы приходим к мысли, что фермент не понижает активационный барьер элементарного акта химического превращения субстрата, а стабилизирует его реакционноспособную форму [43].

Эти представления можно формализовать следующим образом. Превращение субстрата в растворе будет описываться схемой (рис. 10):



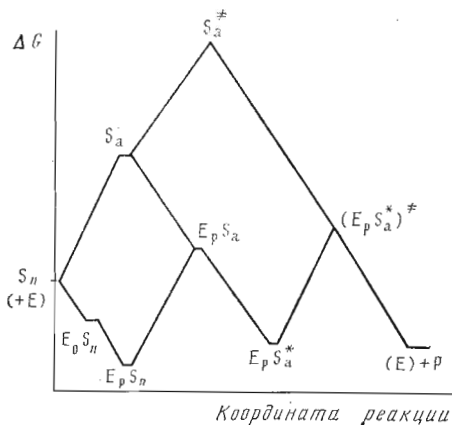


Рис. 10

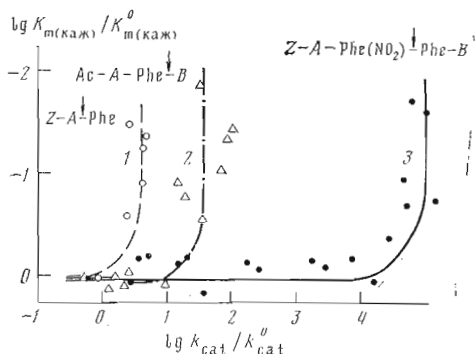
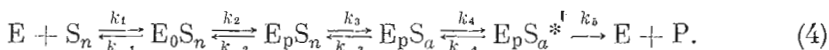


Рис. 11

Рис. 10. Изменение свободной энергии по координате реакции в соответствии со схемой (4). Обозначения см. в тексте

Рис. 11. Зависимость относительных величин K_m от k_{cat} в логарифмических координатах для субстратов карбоксипептидазы (1), химотрипсина (2) и пепсина (3). Кинетические параметры для субстратов взяты из работ [20, 44-46]. А и В — пептидные фрагменты

где S_n и S_a — «неактивная» и «активная» форма субстрата и $K_n = [S_a] / [S_n] \ll 1$; тогда $v_n = k_a K_n [S]_0$ или $v_n = k_n |S|_0$, где $k_n = k_a K_n$. В соответствии с предлагаемой моделью ферментативная реакция происходит по схеме 4



Стадия k_1 может быть диффузионно-контролируемой стадией «заякоривания» субстрата ферментом (см. Введение). Далее субстрат реализует возможные вторичные взаимодействия (k_2). Трансформация неактивной ($E_p S_n$) в активную ($E_p S_a$) форму субстрата и стабилизация этой последней ферментом ($E_p S_a^*$) для наглядности расчленена на две стадии (k_3 и k_4) так, что $k_3/k_{-3} = K_n$ — константе равновесия двух форм субстрата в растворе. Предполагается, что элементарные акты химического превращения субстрата в растворе и на ферменте происходят с одинаковой константой скорости, т. е. $k_5 = k_a$.

Скорость ферментативной реакции при условии быстрого установления равновесий будет

$$v_j = \frac{k_5 K_p K_n K_Q [E]_0 [S]_0}{K_s + [1 + K_p (1 + K_n K_Q)] [S]_0},$$

где

$$K_s = k_{-1}/k_1, K_p = k_2/k_{-2} \text{ и } K_Q = k_4/k_{-4}.$$

Экспериментально наблюдаемые кинетические параметры ферментативной реакции будут:

$$k_{cat} = \frac{k_5 K_p K_n K_Q}{1 + K_p (1 + K_n K_Q)},$$

$$K_m(\text{каж}) = \frac{K_s}{1 + K_p (1 + K_n K_Q)}.$$

и

$$\frac{k_{cat}}{K_m(\text{каж})} = \frac{k_5 K_p K_n K_Q}{K_s}.$$

Учитывая, что $k_n = k_a K_n$ и $k_5 = k_a$, можно определить эффективность фермента в терминах k_{cat}/k_n или $k_{cat}/K_m(\text{каж})k_n$ как

$$\frac{k_{cat}}{k_n} = \frac{K_p K_Q}{1 + K_p (1 + K_n K_Q)} \text{ и } \frac{k_{cat}}{K_m(\text{каж})k_n} = \frac{K_p K_Q}{K_s}.$$

Очевидно, что в зависимости от значений K_p и $K_n K_Q$ эффективность фермента может быть выражена величинами $k_{cat}/k_n = K_Q$ (при $K_p \gg 1$ и $K_n K_Q \ll 1$) и $k_{cat}/k_n = 1/K_n$ (при $K_p \gg 1$ и $K_n K_Q \gg 1$). Таким образом, эффективность будет определяться или энергией стабилизации активной формы субстрата, или различием в энергии активной и неактивной форм субстрата в растворе.

Из выражений для k_{cat} и $K_{m(наж)}$ видно, что при K_p и $K_n K_Q < 1$ $K_{m(наж)} = K_s$, а $k_{cat} = k_3 K_p K_n K_Q$. Такое соотношение констант объясняет часто наблюдающийся случай, когда в серии однотипных субстратов (т. е. субстратов с одинаковым первичным участком связывания) изменяется только величина k_{cat} , а $K_{m(наж)}$ остается практически постоянным. С другой стороны, если все эти величины превышают единицу, то для серии таких субстратов будет меняться $K_{m(наж)}$, а k_{cat} оставаться постоянной. Экспериментальные данные для серий субстратов некоторых протеиназ, приведенные на рис. 11, подтверждают этот вывод.

Таким образом, предлагаемая модель ферментативного гидролиза, катализируемого протеолитическими ферментами, удовлетворительно объясняет как эффективность, так и наблюдаемые типы специфичности ферментов, относя определяющие эти свойства факторы к основному состоянию субстрата в продуктивном фермент-субстратном комплексе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Proteases and Biological Control/Eds Reich E., Rifkin D. A., Shaw E. Cold Spring Harbor Lab., 1975, 925 p.
2. Антонов В. К. В кн.: Химия протеолиза. М.: Наука, 1983, с. 154.
3. Fink A. L. Biochemistry, 1976, v. 15, p. 1580–1586.
4. Angelides K. J., Fink A. L. Biochemistry, 1979, v. 18, p. 2355–2363.
5. Mattis J. A., Fruton J. S. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 6754–6761.
6. Kitagishi K., Nakatani H., Hiromi K. J. Biochem., 1980, v. 87, p. 573–579.
7. Harrison L. M., Vallee B. L. Biochemistry, 1978, v. 17, p. 4359–4363.
8. Hein G. E., Niemann C. J. Amer. Chem. Soc., 1962, v. 84, p. 4487–4494.
9. Rumsh L. D., Volkova L. I., Antonov V. K. FEBS Lett., 1970, v. 9, p. 64–66.
10. Антонов В. К. Докл. АН СССР, 1972, т. 205, с. 839–842.
11. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. Докл. АН СССР, 1968, т. 183, с. 1435–1438.
12. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, с. 558–569.
13. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. FEBS Lett., 1970, v. 7, p. 23–25.
14. Antonov V. K., Ivanina T. V., Ivanova A. G., Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. FEBS Lett., 1972, v. 20, p. 37–40.
15. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjieva A., Blagoev B. Int. J. Peptide and Protein Res., 1976, v. 8, p. 225–231.
16. Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1976, т. 2, с. 837–845.
17. Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1978, т. 4, с. 694–697.
18. Зилченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1976, т. 2, с. 803–810.
19. Зилченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 1663–1670.
20. Antonov V. K. Adv. Exptl Biol. Med., 1977, v. 95, p. 179–198.
21. Гуцуца А. Е., Андреева Н. С., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1983, т. 9, с. 1620–1624.
22. Huber R., Kukla D., Bode W. et al. J. Mol. Biol., 1974, v. 89, p. 73–101.
23. Hughes D., Sieker L. C., Bieth J., Dimicoli J. L. J. Mol. Biol., 1982, v. 162, p. 645–658.
24. Kester W. R., Matthews B. W. Biochemistry, 1977, v. 16, p. 2506–2516.
25. Quijcho F. A., Lipscomb W. N. Adv. Protein Chem., 1974, v. 25, p. 1–78.
26. Лякишева А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Молекулярн. биология, 1973, т. 7, с. 810–816.
27. Antonov V. K., Ginodman L. M., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Gurova A. G., Rumsh L. D. FEBS Lett., 1978, v. 88, p. 87–90.
28. Антонов В. К., Явашев Л. П., Волкова Л. И., Садовская В. Л., Гинодман Л. М. Биоорган. химия, 1979, т. 5, с. 1427–1429.
29. Antonov V. K., Ginodman L. M., Rumsh L. D., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Yavashev L. P., Gurova A. G., Volkova L. I. Europ. J. Biochem., 1981, v. 117, p. 195–200.
30. Антонов В. К., Гинодман Л. М., Румш Л. Д., Капитанников Ю. В., Баршев-

- ская Т. Н., Явашев Л. П., Гурова А. Г., Волкова Л. И. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 436-446.
31. Kossiakoff A. A., Spencer S. A. *Biochemistry*, 1981, v. 20, p. 6462-6474.
 32. Fersht A. R. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1971, v. 93, p. 3504-3515.
 33. Fastrez J. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1977, v. 99, p. 7004-7013.
 34. Bürgi H. B., Dunitz J. D., Shefter E. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1973, v. 95, p. 5065-5067.
 35. Mao B., Pear M. R., McCammon J. A., Northrup S. H. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 151, p. 199-202.
 36. Козлов Л. В., Дьяченко Е. Д., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 105-110.
 37. Bender M. L., Ginger R. D., Unik J. P. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, v. 80, p. 1044-1048.
 38. Капитанников Ю. В., Явашев Л. П., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1983, т. 9, с. 228-231.
 39. Henderson R. *J. Mol. Biol.*, 1970, v. 54, p. 341-354.
 40. Fruton J. S., Fujii S., Knappenberger M. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1961, v. 47, p. 759-761.
 41. Takahashi M., Wang T. T., Hoffmann T. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 57, p. 39-46.
 42. Antonov V. K., Rumsh L. D., Tichodееva A. R. *FEBS Lett.*, 1974, v. 46, p. 29-33.
 43. Карнейский М. Я., Яковлев Г. И., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 645-654.
 44. Клесов А. А., Вэлли Б. Л. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 135-146.
 45. Bauer C.-A., Thompson R. C., Blout E. R. *Biochemistry*, 1976, v. 15, p. 1291-1295 and 1296-1299.
 46. Medzihradsky K., Voynick I. M., Medzihradsky-Schweiger H., Fruton J. S. *Biochemistry*, 1970, v. 9, p. 1154-1162.

Поступила в редакцию
29.IV.1984

PROTEOLYTIC MECHANISMS

ANTONOV V. K., GINODMAN L. M., RUMSH L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Mechanisms of the amide bond hydrolysis catalyzed by proteolytic enzymes have been analyzed using mainly our own experimental data. The rationale for the efficiency and specificity of proteinases has been proposed that relates these features to the state of the substrate in the productive enzyme-substrate complex.