



УДК 577.152.34'14.02

© 1994 Л. Д. Румш

ХИМИЯ ПРОТЕОЛИЗА

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: протеолиз, протеиназы.

Представлен обзор работ, проводимых под руководством профессора В. К. Антонова в возглавляемой им лаборатории химии протеолитических ферментов, по установлению механизмов гидролиза пептидных связей протеолитическими ферментами. Предложено объяснение эффективности и специфичности протеиназ, связанное с состоянием субстрата в продуктивном фермент-субстратном комплексе, и дана классификация протеиназ, основанная на механизме их действия.

Открывая своим докладом симпозиум, я хотел бы остановиться на вопросах специфичности и механизма действия протеиназ. Эта тема — одно из основных направлений исследований лаборатории «Химии протеолитических ферментов», которую в течение 25 лет возглавлял Владимир Константинович Антонов. Будучи химиком по образованию, он работал сначала несколько лет в области прикладной органической химии, а затем в Институте химии природных соединений под руководством академика Михаила Михайловича Шемякина, занимаясь изучением открытой ими реакции окси- и аминокислотного включения. Это были исследования биологически важных объектов методами органической химии. Именно тогда и зародилось понятие «биоорганическая химия». Возглавив затем вновь созданную лабораторию химии ферментов и вступив в область энзимологии, Владимир Константинович, прекрасно владевший мышлением химика-органика, приступил к конструктивным исследованиям в области химии протеолиза; при этом в исследования биологических макромолекул, каковыми являются протеиназы, он внес точные и четкие подходы физико-химической и органической химии.

Одним из основных направлений работ В. К. Антонова являлось изучение механизма гидролиза амидной связи протеолитическими ферментами.

Процесс расщепления пептидной связи протеиназами имеет много общего с химическим неферментативным катализом. В то же время существенным отличием биологических катализаторов является их специфичность и эффективность. Существование огромного числа протеолитических ферментов, катализирующих в конечном счете реакцию гидролиза пептидной связи, объясняется, вероятнее всего, необходимостью специфического (в том числе и ограниченно) протеолиза различных белков.

Первой стадией любой ферментативной реакции является связывание фермента с субстратом. Известно, что субстратная специфичность протеиназ изменяется в весьма широких пределах — от ферментов с абсолютной специфичностью (ренин) до протеиназ типа пепсина, расщепляющих широкий набор пептидных связей.

Наиболее информативным методом выяснения структуры фермент-субстратного комплекса является кристаллографический анализ [1]. 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-х годах. Он заключается в исследовании ферментативного гидролиза субстратов с ограниченной конформационной подвижностью [2]. С подобных работ и начинались исследования протеолитических ферментов в нашей лаборатории, организованной в конце 1967 г. Был синтезирован ряд конформационно закрепленных соединений [3—7]. Все они в той или иной степени являлись аналогами метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина — типичного синтетического субстрата химотрипсина. Анализ кинетических параметров гидролиза и сопоставление конформаций этих соединений позволили сделать заключение о конформации типичного субстрата в активном центре химотрипсина.

Другой подход, предложенный в лаборатории, заключается в изучении топографии активных центров сериновых протеиназ с помощью бифункциональных обратимых ингибиторов — алкил- и арилалкилборных кислот. Анализируя зависимость свободной энергии сорбции этих соединений от длины алкильной цепи, можно сделать вывод о протяженности сорбционного участка и расстоянии между ним и каталитическими группами активного центра фермента. В лаборатории было исследовано таким методом до 15 протеиназ [8—12].

Еще один способ, применимый к ферментам с выраженной вторичной специфичностью, основан на статистическом анализе данных по расщеплению ими пептидных связей в различных белках.

Методика анализа заключалась в том, что для каждой известной из литературы расщепляемой связи рассматривали структуру соответствующего пептидного фрагмента белка, содержащего до 10 аминокислотных остатков в сторону N- и C-конца от расщепляемой пепсином связи [13]. Для 500 таких пептидов были подсчитаны частоты встречаемости всех 20 аминокислот в 20 положениях и рассчитаны индексы их специфичности. На основании полученных данных все аминокислоты предложено разделить на три группы: предпочтительные, нежелательные и индифферентные по отношению к рассматриваемому участку связывания.

Исключительно интересной представляется зависимость значений средних индексов специфичности \bar{S}_j для локусов связывания на ферменте (рис. 1). На общем фоне равномерного распределения \bar{S}_j выделяются их значения для локусов в интервале $-3 \div +2$. Эта зависимость, видимо, отражает «жесткость» требований различных участков связывающей зоны фермента к структуре аминокислотных остатков субстрата и определяет оптимальный размер пептидного субстрата в 5—6 аминокислот. Наибольшее значение ($\bar{S}_j = 2,22$) приходится на положение -1 . Видимо, тип аминокислотного остатка в этом положении является определяющим при расщеплении субстратов пепсином.

Следует отметить, что полученные значения индексов специфичности носят относительный характер, и поэтому представлялось интересным их сравнение с кинетическими данными по гидролизу пепсином синтезированных в лаборатории новых пептидных субстратов (рис. 2). Для всех проанализированных пептидов наблюдается хорошая корреляция суммарных индексов специфичности и значений каталитических констант ($k_{кат}$), а также $k_{кат}/K_m$ в логарифмических координатах. Эта зависимость описывается следующими уравнениями [14]:

$$\ln k_{кат} = 13,75 \ln \left(\sum S_{ij} + \sum \bar{S}_j \right) - 31,34 \quad \text{и}$$

$$\ln (k_{кат}/K_m) = 16,13 \ln \left(\sum S_{ij} + \sum \bar{S}_j \right) - 36,77.$$

На одну прямую ложатся данные как по кинетическим параметрам

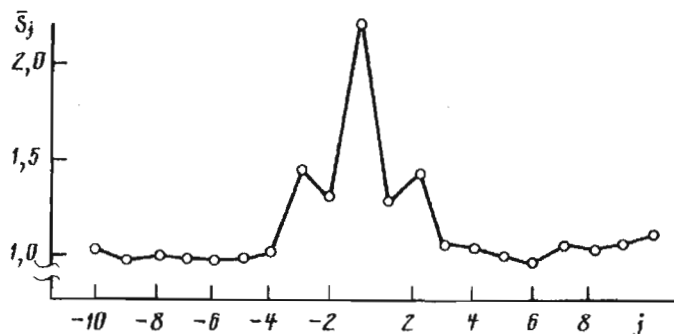


Рис. 1. Зависимость значений средних индексов специфичности аминокислотных остатков субстратов пепсина от их положения в связывающем участке [13]

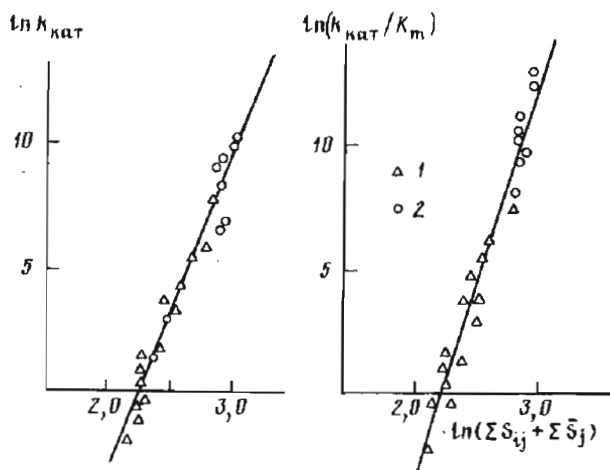


Рис. 2. Зависимость константы скорости $k_{\text{кат}}$ (а) и $k_{\text{кат}}/K_m$ (б) от суммарного индекса специфичности для субстратов пепсина. 1 — собственные данные [14]; 2 — данные, взятые из литературы

синтезированных нами субстратов (Δ), так и по константам соединений, полученными другими авторами (\circ).

Вероятно, зависимость $k_{\text{кат}}/K_m$ от суммарного индекса специфичности может определять степень специфичности любой протеиназы, для которой имеется такая характеристика, и будет выражаться тангенсом угла (α) наклона графика. Очевидно, что ферменты со специфичностью, близкой к абсолютной, будут характеризоваться графиком с $\text{tg}(\alpha) \rightarrow \infty$, а ферменты с широкой специфичностью, т. е. гидролизующие любые связи с одинаковыми скоростями, — графиком с $\text{tg} \alpha \rightarrow 0$.

Еще одним подходом при исследовании роли вторичных взаимодействий может служить изучение влияния пептидных эффекторов на скорость гидролиза синтетических субстратов.

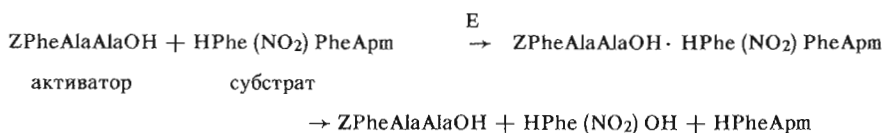
В нашей лаборатории (одновременно с зарубежными авторами) было показано, что гидролиз некоторых субстратов пенициллопепсином и пепсином свиньи ускоряется при добавлении в систему некоторых пептидов, не способных расщепляться этими ферментами [15—17]. Возникает вопрос: связана ли активирующая способность пептидов с вторичной специфичностью фермента? Для выяснения этого было исследовано действие ряда пептидных эффекторов на гидролиз ди- и трипептидных субстратов пепсина. В качестве эффекторов использовались

различные не гидролизующиеся пепсином пептиды, содержащие защитные группы.

Анализируя полученные данные, следует, во-первых, обратить внимание на то обстоятельство, что в качестве активаторов могут выступать только пептиды, имеющие по крайней мере одну незащищенную N- или C-концевую аминокислоту. При этом субстрат также должен содержать такого рода аминокислотный остаток (со свободным C- или N-концом). Обнаружить активаторы гидролиза полностью защищенного субстрата ZLeuPhe(NO₂)Apm (Apm — аминопропилморфолин) не удалось. Очевидно, что для образования тройного комплекса субстрат — активатор — фермент существенное значение имеет электростатическое взаимодействие зарядов субстрата и активатора. В таком случае схему активации гидролиза по сорбционному механизму можно представить достраиванием субстрата с N- или C-конца в области связывающего центра. Ускорение гидролиза субстрата обусловлено в этом случае тем, что активатор как бы дополняет субстрат и, возможно, индуцирует конформационные изменения фермента, способствующие катализу (схема 1).

Схема 1

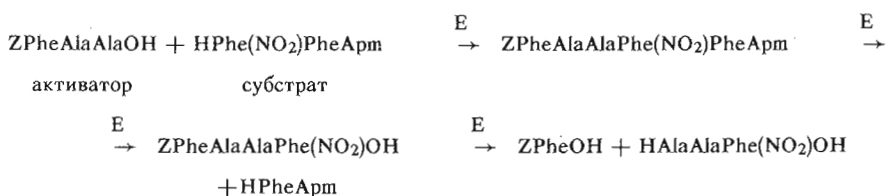
Активация гидролиза по сорбционному механизму



Нельзя было, однако, исключить, что механизм активации заключается в синтезе из субстрата и активатора нового пептида, который затем и гидролизуется. В случае подобного механизма (синтез-гидролиз) субстрат и активатор образуют ковалентную, амидную связь, и далее гидролизу подвергается вновь образованный пептид (схема 2).

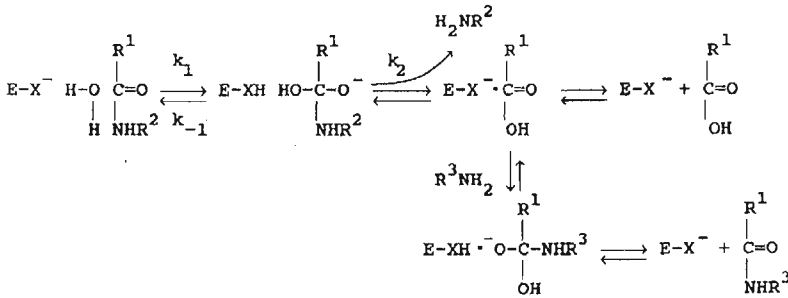
Схема 2

Активация гидролиза по механизму синтеза-гидролиза

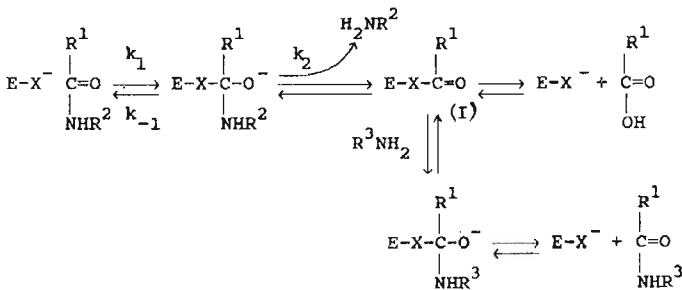


Учитывая молярные коэффициенты поглощения исходных и конечных продуктов, можно ожидать, что изменение поглощения системы как в присутствии, так и в отсутствие активатора будет одинаковым и составит $\Delta \epsilon = 550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в случае активации по сорбционному механизму. Если же в ходе реакции из активатора и субстрата синтезируется пентапептид, который далее гидролизуется по связи Phe(NO₂)-Phe, изменение молярного коэффициента поглощения в результате полного превращения субстрата должно составлять $1500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Полученная в опыте величина равнялась $1250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, что говорит в пользу активации по механизму синтеза-гидролиза. Дополнительным подтверждением такого механизма явилось выделение из реакционной смеси в качестве продуктов реакции Ala-Ala-Phe(NO₂)OH, который может образовываться лишь в случае активации по механизму синтеза-гидролиза (см. схему 2) [18, 19].

Полученные данные однозначно доказывают, что активация независимо от



Общий основной катализ [30]



Нуклеофильный катализ [30]

механизма процесса (сорбционный или синтез-гидролиз) обусловлена значительным влиянием вторичных фермент-субстратных взаимодействий.

Далее я хотел бы остановиться на подходах, которые были разработаны в лаборатории для выяснения механизма гидролиза пептидной связи, катализируемого протеолитическими ферментами.

При рассмотрении схемы катализируемого ферментами гидролиза пептидной связи в первую очередь возникает вопрос о характере каталитического действия нуклеофильных групп активного центра. Эти группы могут функционировать в качестве общего основного катализатора (схема 3), способствуя отщеплению протона от молекулы воды, атакующей субстрат, или в качестве ковалентного (ацилферментного, нуклеофильного) катализатора (схема 4), непосредственно атакуя карбонильный атом углерода гидролизуемой связи. В конечном счете вопрос сводится к тому, участвует ли молекула воды на первой стадии химического превращения субстрата и, таким образом, нуклеофильная группа активного центра служит общим основным катализатором (схема 3), или вода участвует на последующих стадиях распада промежуточного соединения, а нуклеофильная группа фермента образует ковалентную связь с фрагментом субстрата (схема 4).

Нуклеофильный катализ довольно легко доказать лишь в тех случаях, когда скорость образования промежуточного ацилфермента (I) существенно больше скорости его распада. Однако такое положение наблюдается лишь при катализируемом сериновыми или тиоловыми протеиназами гидролизе эфирных связей [20]. При гидролизе этими ферментами пептидных субстратов задача оказывается более сложной, поскольку в этом случае промежуточный ацилфер-

мент не накапливается. По этой причине долгое время существовали противоречивые мнения относительно справедливости ацилферментного механизма гидролиза пептидных субстратов химотрипсином.

Лишь в 1973 г. в лаборатории химии ферментов ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР В. К. Антоновым и Л. М. Гинодманом были получены доказательства тождественности механизмов катализируемого химотрипсином гидролиза эфирных и амидных субстратов на основе сравнения скоростей включения меченых продуктов гидролиза и тяжелого кислорода воды в субстрат в состоянии термодинамического равновесия системы [21—23].

Что же касается представителей класса кислых протеиназ, то для них на основании наличия реакции транспептидации априори считали, что гидролиз пептидной связи также осуществляется через ковалентное промежуточное соединение. Для других типов пептидгидролаз сведения о механизме катализа практически отсутствовали.

В нашей лаборатории был разработан ряд подходов, позволяющих различать ковалентный и общий основной механизмы гидролиза амидных связей.

Эти подходы основаны на исследовании ферментативной реакции гидролиза и транспептидации в тяжелоокислородной воде с последующим определением содержания тяжелого кислорода в исходных субстратах или продуктах реакции [24—30].

Рассмотрим эти подходы.

1. Исследование включения тяжелого кислорода (^{18}O) из воды в негидролизованый субстрат [24—27]

Как видно из схем 3 и 4, включение тяжелого кислорода в карбонильную группу гидролизуемого субстрата может происходить лишь в случае общего основного катализа и при условии, что скорость распада промежуточного тетраэдрического аддукта в направлении субстрата выше, чем скорость его распада в направлении продуктов реакции ($k_{-1} \gg k_2$). Таким образом, обнаружение включения ^{18}O в субстрат свидетельствует в пользу общего основного механизма катализа; в то же время отсутствие такого включения еще не дает оснований для ответа на вопрос о типе каталитического механизма.

Обмен кислорода в ходе химотрипсинового гидролиза не был обнаружен. Однако показано, что в случае реакций, катализируемых пепсином, лейцинаминопептидазой и термолизином, наблюдается включение ^{18}O в непрогидролизованый субстрат (табл. 1), что является доказательством общего основного катализа.

2. Исследование включения тяжелого кислорода (^{18}O) воды в продукты катализируемой ферментом транспептидации по типу ацильного переноса [24—27]

Многие протеиназы катализируют реакции транспептидации по типу ацильного переноса. Если перенос ацильной группы происходит из ацилфермента, т. е. без участия воды, то, проводя реакцию в H_2^{18}O , мы не обнаружим тяжелого кислорода в амидной группе продукта транспептидации. Очевидно, что, если реакция идет с участием воды на первой стадии процесса (схема 3), должно наблюдаться включение ^{18}O в продукт транспептидации. Таким образом, наличие включения ^{18}O четко говорит о протекании реакции по общему основному механизму.

Результаты опытов по включению тяжелого кислорода в продукты транспептидации, катализируемой различными протеиназами, показывают (табл. 2), что сериновые и тиловые протеиназы, к которым относятся химотрипсин, папаин, карбоксипептидаза Y, функционируют по ковалентному типу катализа с образованием промежуточного ацилфермента. Остальные приведенные в таблице ферменты, относящиеся к аспартильным и металлзависимым эндо- и экзопептидазам, функционируют по типу общего основного катализа.

Исследование включения ^{18}O из тяжелоокислородной воды в непрогидролизванный субстрат [30]

Фермент	Субстрат	Включение ^{18}O , %
Химотрипсин	HLeuLeuNH ₂	0
Пепсин	HLeuTyrNH ₂	9 ± 1,5
Лейцинаминопептидаза	HLeuNH ₂	48 ± 3
Термолизин	HLeuLeuNH ₂	52 ± 5

Таблица 2

Исследование включения ^{18}O в амидную группу продуктов транспептидации* [30]

Фермент	Исследуемая реакция	Содержание ^{18}O , %
Химотрипсин	$2\text{HLeuLeuNH}_2 \rightleftharpoons \underline{\text{HLeuLeuLeuOH}} + \text{HLeuNH}_2 + \text{NH}_3$	0
Папаин	$\text{ZGlyNH}_2 + \text{HLeuGlyOH} \rightleftharpoons \underline{\text{ZGlyLeuGlyOH}} + \text{NH}_3$	0
	$\text{ZGlyOMe} + \text{HLeuGlyOH} \rightleftharpoons \underline{\text{ZGlyLeuGlyOH}} + \text{MeOH}$	0
Карбоксипептидаза Y	$\text{ZPheAlaOH} + \text{HLeuNH}_2 \rightleftharpoons \underline{\text{ZPheLeuNH}_2} + \text{HAlaOH}$	0
	$\text{ZPheOMe} + \text{HLeuNH}_2 \rightleftharpoons \underline{\text{ZPheLeuNH}_2} + \text{MeOH}$	0
Пепсин	$2\text{HLeuTyrNH}_2 \rightleftharpoons \underline{\text{HLeuLeuOH}} + 2\text{HTyrNH}_2$	56 ± 10
Лейцинаминопептидаза	$2\text{LeuNH}_2 \rightleftharpoons \underline{\text{HLeuLeuNH}_2} + \text{NH}_3$	48 ± 3
Термолизин	$2\text{HLeuLeuNH}_2 \rightleftharpoons \underline{\text{HLeuLeuOH}} + 2\text{HLeuNH}_2$	47 ± 5

* Содержание ^{18}O определяли во фрагментах продуктов, подчеркнутых на схемах изучаемых реакций. Измерение масс-спектрометрическое.

3. Исследование скорости обмена кислорода в карбоксильной группе ацильного продукта гидролиза на ^{18}O из воды в отсутствие и в присутствии второго, аминного продукта реакции [24—28]

Известно, что многие протеолитические ферменты катализируют обмен кислорода карбоксильной группы ацильного продукта гидролиза пептида (P_1) на ^{18}O из воды. Если в систему ввести второй (аминный) продукт гидролиза (P_2), то наряду с реакцией обмена будет происходить обратимая реакция синтеза-гидролиза пептида, также приводящая к включению ^{18}O в карбоксильную группу ацильного продукта. Если последняя реакция проходит через стадию ковалентного ацилфермента, она не может ускорить процесс обмена кислорода, так как вода не участвует в образовании ацилфермента. Если же реакция синтеза-гидролиза идет по общему основному механизму, введение аминного продукта может увеличить скорость обмена кислорода карбоксильной группы ацильного продукта гидролиза (схема 5).

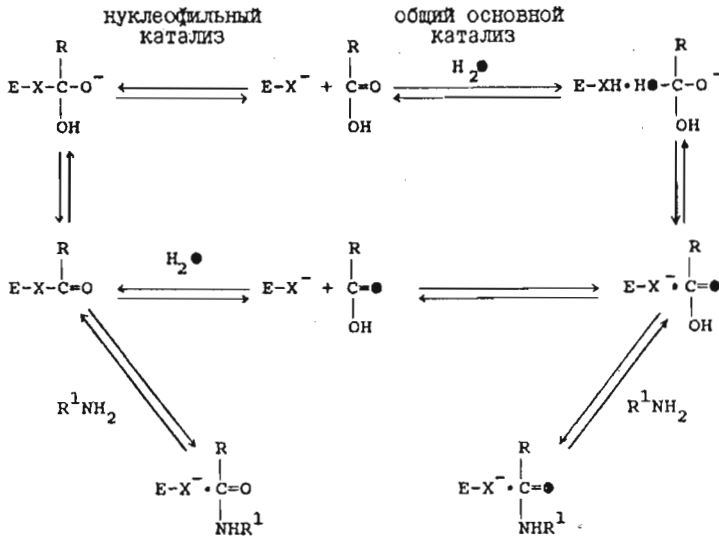


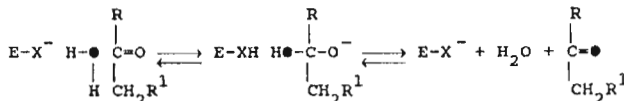
Схема включения тяжелого кислорода в карбоксильную группу ацильного продукта гидролиза [30]

Данные о скоростях обмена кислорода в ацильных продуктах гидролиза в отсутствие и в присутствии аминных продуктов (табл. 3) вновь подтверждают ковалентный механизм гидролиза, катализируемого сериновой протеиназой — химотрипсином и общий основной катализ аспартильными и металлзависимыми протеиназами. Отсутствие ускорения обмена в лейцине при добавлении аммиака указывает на то, что в этом случае скорость обмена кислорода за счет синтеза лейцинамида и его последующего гидролиза меньше скорости собственного обмена кислорода. Действительно, расчет скорости обмена кислорода за счет синтеза гидролиза для этого случая дал значение $8,3 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{мин}^{-1}$, что почти на три порядка ниже скорости собственного обмена кислорода в лейцине.

4. Исследование обмена кислорода в кетогруппе кетоаналогов субстратов — ингибиторов протеолитических ферментов [29, 30]

Очевидно, что, если инкубировать с ферментом не пептидный субстрат, а его кетбаналог, т. е. пептид, у которого атом азота замещен на атом углерода (схема

Схема 6



Включение тяжелого кислорода в кетоаналоги субстратов [30]

б), участие молекулы воды на первой химической стадии ферментативного гидролиза может приводить к обмену кислорода в кетогруппе аналогов.

Был синтезирован ряд подобных соединений, определено значение K_i и исследован обмен ^{18}O в кетогруппе этих ингибиторов в присутствии и в отсутствие ферментов. Полученные данные (табл. 4) полностью подтверждают выводы, сделанные на основе использования приведенных выше подходов для установления механизма катализа протеолитическими ферментами.

Таблица 3

Влияние аминного продукта гидролиза на скорость обмена кислорода в ацильном продукте гидролиза [30]

Фермент	Ацильный и аминный продукты	Скорость обмена, $M \cdot \text{мин}^{-1}$	Отношение скоростей обмена
Химотрипсин	AcPheOH	$1,8 \cdot 10^{-5}$	0,44
	AcPheOH + HAlaNH ₂	$0,8 \cdot 10^{-5}$	
	AcPheOH + HGlyNH ₂	$1,0 \cdot 10^{-5}$	
Пепсин	AcPheOH	$2,5 \cdot 10^{-5}$	2,2
	AcPheOH + PheAlaAlaOMe	$5,6 \cdot 10^{-5}$	
Лейцин-аминопептидаза	HLeuOH	$1,6 \cdot 10^{-3}$	0,9
	HLeuOH + NH ₄ Cl	$1,5 \cdot 10^{-3}$	
	HLeuOH + HLeuNH(CH ₂) ₂ OH	$3,5 \cdot 10^{-3}$	
Карбокси-пептидаза А	AcPheOH	$7,9 \cdot 10^{-6}$	2,3
	AcPheOH + HPheOH	$1,8 \cdot 10^{-5}$	

* Отношение скоростей обмена в присутствии и отсутствие аминного продукта.

Таблица 4

Обмен кислорода в кетоаналогах субстратов в среде H₂¹⁸O [30]

Фермент	Кетоаналог	K _i , mM	Обмен кислорода, %	
			с ферментом	без фермента
Химотрипсин	$C_6H_5CONHCHCOCH_2CH_2COOCH_3$	0,15	10	10
Карбокси-пептидаза А	$C_6H_5CONHCHCOCH_2CH_2COOH$	1,0	70	10
	$H_2NCHCOCH_2CH_2COOH$			
Лейцин-аминопептидаза	$H_2NCHCOCH_2CH_2COOH$	0,05	65	20

Таблица 5

Пептидгидролазы с установленным типом катализа

Фермент	Группа	Тип катализа	Использованные подходы*				
			1	2	3	4	5
Химотрипсин	Сернивая	Нуклеофильный	+	+	+	+	
Карбоксипептидаза Y	»	»		+			
Папаин	Тиоловая	»		+			
Пепсин	Карбоксильная	Общий основной	+	+	+		+
Карбоксипептидаза А	Металлоза-висимая	»			+	+	
Лейцинаминопептидаза	»	»	+	+	+	+	
Термолизин	»	»	+	+			

* См. текст.

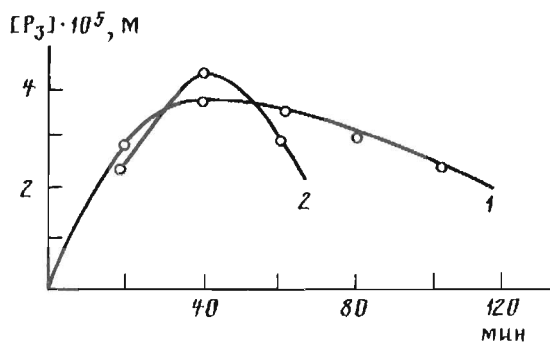


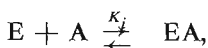
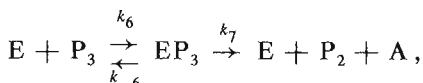
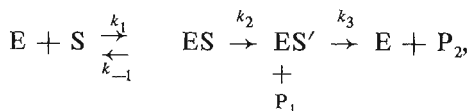
Рис. 3. Кинетические кривые образования продукта транспептидации (P_3 , схема 8) для субстратов AsPheTyrOH (1) и AsPhePheArg (2) и акцептора $\text{ZPhe}(\text{NO}_2)\text{OH}$ в присутствии пепсина [31]

регистрации начальных скоростей образования продуктов реакции. В лаборатории был разработан способ непрерывной регистрации реакции транспептидации, основанный на использовании в качестве акцептора хромофорсодержащих соединений [31, 32] (рис. 3).

Что касается пепсина, то следует отметить, что нами впервые была показана возможность транспептидации при использовании в качестве доноров субстратов с закрытой карбоксильной группой.

Определение кинетических параметров реакции транспептидации проводили исходя из схемы 8.

Схема 8



$$K_r = \frac{k_{-4} + k_5}{k_4}, \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \quad K_{r(\text{эфф})} = K_r \frac{k_3}{k_2},$$

где ES' — «аминофермент», P_1 и P_2 — соответственно ацильный и аминный продукты гидролиза субстрата, P_3 — продукт транспептидации.

Анализ этой схемы дает возможность сделать следующие важные выводы [31, 32]:

1) субстраты, имеющие одну и ту же транспортируемую в ходе транспептидации группировку, должны характеризоваться одинаковыми константами k_5 , K_r , k_3 ;

2) значения $K_{r(\text{эфф})} = K_r \frac{k_3}{k_2}$ для таких субстратов будут обратно пропорциональны величинам $k_{\text{кат}}$ ($=k_2$) этих субстратов;

3) отношение скорости гидролиза к скорости транспептидации для каждой

Константы скорости транспептидации и отношение скоростей гидролиза и транспептидации [31, 32]

Субстрат	$k_5 \cdot 10^2, \text{ мин}^{-1}$	$K_{\pi(\text{эфф})}, \text{ мМ}$	$\frac{k_{\text{кат}}(\text{а})}{k_{\text{кат}}(\text{б})}$	$\frac{K_{\pi(\text{эфф})}(\text{б})}{K_{\pi(\text{эфф})}(\text{а})}$	$\frac{V_r}{V_r}$
AcPheTyrOH (а)	3,10	0,156	2,56	2,72	22,0
AcTyrTyrOH (б)	2,93	0,424			22,2
AcPhePheApm (а)	4,65	1,697	9,32	9,65	351
NGlyGlyPhePheApm (б)	4,89	0,176			380

пары субстратов должно быть равно и линейно зависеть от обратной величины концентрации акцептора [А].

$$\frac{V_r}{V_r} = \frac{k_5 K_{\pi}}{k_5} \cdot \frac{1}{[A]_0}$$

Были определены величины констант транспептидации для двух пар субстратов (доноров) с использованием в качестве акцептора ZPhe(NO₂)OH:

I

II

а) AcPheTyrOH а) AcPhePheApm

б) AcTyrTyrOH б) NGlyGlyPhePheApm.

Субстраты второй пары имеют особое значение, так как позволили впервые обнаружить реакцию транспептидации в случае субстратов с защищенной С-концевой карбоксильной группой. Полученные результаты (табл. 6) показывают, что два из трех предположений, сделанных нами выше, хорошо подтверждаются, а именно: совпадают величины k_5 для каждой из пар субстратов и выполняется обратно пропорциональная зависимость величин $K_{\pi(\text{эфф})}$ и $k_{\text{кат}}$ этих же пар субстратов.

Рис. 4 и табл. 6 демонстрируют выполнение третьего условия: линейную зависимость отношения скорости гидролиза и транспептидации от обратной величины концентрации акцептора и совпадение этих зависимостей для каждой пары субстратов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что гидролиз субстратов, содержащих одинаковую С-концевую группу, происходит с образованием общего для них промежуточного соединения с пепсином как в случае субстратов со свободной карбоксильной группой, так и в случае амидов пептидов. Однако здесь очень важно отметить, что из полученных нами данных следует лишь доказательство образования при пепсиновом катализе промежуточного комплекса фермента с переносимым фрагментом субстрата, и в то же время ничего нельзя сказать о природе этого промежуточного продукта. Однако, как свидетельствуют данные по исследованию гидролиза в тяжелокислородной воде, пепсин не образует ковалентное промежуточное соединение и, следовательно, соединение фермента с переносимым фрагментом субстрата имеет нековалентную природу. Как же можно объяснить в этом случае реакцию транспептидации?

Если реакции переноса идут из нековалентного комплекса фермент-продукт, то этот комплекс должен существовать достаточное время, чтобы обеспечить связывание акцептора транспептидации и образование химической связи между переносимым фрагментом и акцептором.

Проведенный нами расчет скорости распада комплекса фермент-продукт дает

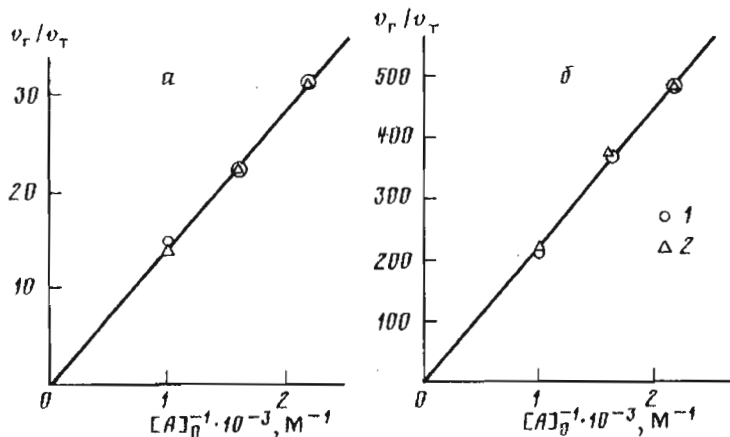
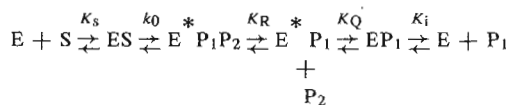


Рис. 4. Зависимость отношения скоростей катализируемого пепсином гидролиза субстратов AcPheTyrOH (1) и AcTyrTyrOH (2) (а) и AcPhePheArg (1) и NGlyGlyPhePheArg (2) (б) к скоростям транспептидации в присутствии акцептора ZPhe(NO₂)OH от его концентрации [31, 32]

величину около 10 с⁻¹. Однако реально наблюдаемые константы скорости этого процесса составляют 1 · 10⁴ — 1 · 10⁵ с⁻¹ [33].

Это противоречие можно разрешить, если предположить, что диссоциация комплекса фермент—продукты реакции происходит ступенчато

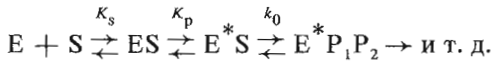


(звездочка указывает на особое (конформационное) состояние фермента) и что транспептидация происходит в комплексе E^{*}P₁, способном связывать акцептор [33]. Образование этого комплекса легко идет из субстрата в ходе его гидролиза. Если же в системе субстрата нет, образование комплекса E^{*}P₁ ограничивается низкой скоростью превращения EP₁ в E^{*}P₁. В таком случае продукт и акцептор могут реагировать, образуя новый пептид в количестве, определяемом константой равновесия всего процесса. В этом и заключается принципиальное отличие реакции транспептидации от катализируемой ферментами реакции синтеза пептидов.

Приведенные выше данные показывают, что субстратная специфичность пептидгидролаз определяется взаимодействием остатков, как непосредственно образующих расщепляемую связь, так и удаленных от нее, причем для разных ферментов вклад вторичных взаимодействий может быть разным. В случае пепсина вторичные взаимодействия влияют главным образом не на связывание (K_m), а на собственно катализ (k_{кат.}). Таким образом, значительная часть суммарной энергии взаимодействия фермента с субстратом расходуется на понижение активационного барьера химической стадии.

Каков же механизм использования энергии связывания субстрата для понижения активационного барьера? Мы полагаем, что возможное объяснение заключается в следующем. Первичная и вторичная специфичности фермента проявляются на разных стадиях образования продуктивного фермент-субстратного комплекса. На первой стадии реализуется первичная специфичность, т. е. субстрат как бы заякоривается ферментом (комплекс ES), на второй стадии реализуется вторичная специфичность и происходит точная «подгонка» фермента

и субстрата (комплекс E*S). При этом продуктивный фермент-субстратный комплекс приобретает особое состояние:



В чем же особенность строения комплекса E*S? Наши данные показали, что для аспартатных и металлозависимых протеиназ нуклеофильным агентом, атакующим субстрат, является молекула воды, т. е. очень слабый нуклеофил. Чтобы обеспечить наблюдаемое ускорение в случае ферментативного катализа, необходимо предположить, что в продуктивном фермент-субстратном комплексе или сильно повышается нуклеофильность связанной воды, или дестабилизируется расщепляемая связь, главным образом за счет выхода карбонильного атома углерода из плоскости C^α-, N- и O-атомов («пирамидализация») [27, 33, 34].

В заключение я хотел бы сказать, что, несмотря на, казалось бы, значительные успехи в области исследования механизма действия протеиназ, мы еще бесконечно далеки от полного понимания процессов протеолиза. Необходимо более детальное исследование структурных основ специфичности, которая в некоторых случаях абсолютна (например, ренин плазмы крови, который атакует лишь один белок — ангиотензиноген и расщепляет в нем единственную связь). Одним из подходов при решении этой проблемы может стать анализ рентгеноструктурных данных в сочетании с теоретическим расчетом электронно-конформационных состояний. С анализом такого типа можно проводить целенаправленные точечные мутации методами геной инженерии.

Кроме того, до настоящего времени изучались преимущественно протеиназы относительно небольшой молекулярной массы и функционирующие в кишечнике и лизосомах. В настоящее время значительное внимание привлекает новая группа протеиназ с молекулярной массой от 100 тыс. до 1 млн., которые функционируют внутри клетки и осуществляют расщепление пептидной связи, сопряженное с гидролизом АТФ. Вероятно, такое сопряжение играет важную роль в повышении специфичности фермента, необходимой для тонкой регуляции метаболических процессов. Эта проблема исследуется в настоящее время в нашей лаборатории.

Свой доклад я закончу цитатой из книги Владимира Константиновича Антонова «Химия протеолиза»: «Мы должны стремиться к построению общей теории ферментативного гидролиза производных карбоновых кислот. Такая теория должна: с единых позиций объяснять каталитическую эффективность амидгидролаз; исходя из знания структуры субстрата и фермента предсказывать величину каталитического ускорения реакции; объяснять различные проявления специфичности ферментов как в ряду субстратов, так и у разных амидгидролаз; объяснять регуляторные особенности ферментов» [33].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blow D. M. // *Enzymes*. 1971. V. III. P. 185—212.
2. Hein G. E., Mc Griff R. B., Niemann C. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1960. V. 82. № 7. P. 1830—1831.
3. Антонов В. К., Румш Л. Д. // Докл. АН СССР. 1969. Т. 185. № 4. С. 821—823.
4. Abdullaev N. D., Bystrov V. F., Rumsh L. D., Antonov V. K. // *Tetrahedron Lett.* 1969. V. 60. P. 5287—5290.
5. Rumsh L. D., Volkova L. I., Antonov V. K. // *FEBS Lett.* 1970. V. 9. № 2. P. 64—66.
6. Antonov V. K., Rumsh L. D. // *FEBS Lett.* 1970. V. 9. № 2. P. 67—70.
7. Антонов В. К., Румш Л. Д. // *Химия природ. соедин.* 1972. № 5. С. 581—596.
8. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. // *FEBS Lett.* 1970. V. 7. № 1. P. 23—25.
9. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjieva A., Blagoev B. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1976. V. 8. № 3. P. 225—231.
10. Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинопдман Л. М., Антонов В. К. // *Биоорган. химия*. 1978. Т. 4. № 5. С. 694—698.

11. Ротанова Т. В., Иомтова В. М., Благоев Б., Антонов В. К.//Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1659—1665.
12. Попов А. А., Ротанова Т. В., Румш Л. Д.//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1650—1655.
13. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К.//Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 6. С. 803—810.
14. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К.//Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 12. С. 1663—1670.
15. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К.//Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 8. С. 1122—1128.
16. Wang T. T., Dorrington K. J., Hofman T.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 57. P. 865—869.
17. Wang T. T., Hofman T.//Biochem. J. 1976. V. 153. P. 701—712.
18. Antonov V. K., Rumsh L. D., Zinchenko A. A.//Frontiers of Bioorganic Chemistry and Mol. Biology. Oxford and New York: Pergamon Press, 1980. P. 29—34.
19. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Гинодман Л. М., Антонов В. К.//Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 8. С. 1195—1200.
20. Gutfreund H., Sturtevant J. M.//Biochem. J. 1956. V. 63. P. 656—661.
21. Лякишева А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К.//Молекулярн. биология. 1973. Т. 7. С. 810—816.
22. Гурова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К.//Молекулярн. биология. 1977. Т. 11. С. 1155—1159.
23. Антонов В. К., Гинодман Л. М., Гурова А. Г.//Молекулярн. биология. 1977. Т. 11. С. 1160—1166.
24. Antonov V. K., Ginodman L. M., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Gurova A. G., Rumsh L. D.//FEBS Lett. 1978. V. 88. № 1. P. 87—90.
25. Антонов В. К., Гинодман Л. М., Румш Л. Д., Капитанников Ю. В., Баршевская Т. Н., Явашев Л. П., Гурова А. Г., Волкова Л. И.//Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 3. С. 436—445.
26. Antonov V. K., Ginodman L. M., Rumsh L. D., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Yavashev L. P., Gurova A. G., Volkova L. I.//Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 195—200.
27. Антонов В. К., Гинодман Л. М., Румш Л. Д.//Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 8. С. 1044—1058.
28. Гинодман Л. М., Капитанников Ю. В., Румш Л. Д., Антонов В. К.//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1641—1649.
29. Rumsh L. D., Ostroutova N. I., Tikhonova V. Yu.//Chemical Physics of Enzyme Catalysis. Abstracts. Tallinn, 1987. P. 121.
30. Antonov V. K., Rumsh L. D.//Biochemie (Life Sci. Adv.). 1988. V. 7. P. 425—432.
31. Antonov V. K., Rumsh L. D., Tikhodeeva A. G.//FEBS Lett. 1974. V. 46. № 1. P. 29—33.
32. Тиходеева А. Г., Румш Л. Д., Антонов В. К.//Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 7. С. 993—994.
33. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991.
34. Антонов В. К.//Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 6. С. 805—839.

Поступила в редакцию
28.VI.1993

L. D. Rumsh

CHEMISTRY OF PROTEOLYSIS

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Experimental data obtained in this laboratory led to the determination of the mechanism of hydrolysis of peptide bonds by proteolytic enzymes. Efficiency and specificity of proteinases are explained in terms of the substrate state in the productive enzyme-substrate complex. An advanced classification of proteinases based on their mechanism of action is suggested.