



УДК 577.338

Светлой памяти профессора В. К. Антонова,
моего учителя и друга, посвящаю

© 1994 С. Л. Александров

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

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

Разработана теория дестабилизации основного состояния, объясняющая высокую эффективность протеиназ. Эта теория предполагает участие валентных взаимодействий в образовании продуктивного комплекса и связывает эффективность и специфичность протеолиза со структурой этого комплекса. Доказана непродуктивность нековалентных комплексов, в которых реакционная амидная группа субстрата планарна. Сделано предположение, что ферментативный гидролиз сам по себе не подчиняется теории абсолютных скоростей реакций.

Высочайшая эффективность протеиназ — основная их загадка, с которой связаны все особенности ферментативного гидролиза.

Ранее мы предложили принципиально новую концепцию эффективности, основанную на представлении о дестабилизации основного состояния [1]. Объектами наших исследований были сериновые и аспартатные протеиназы, реализующие соответственно ковалентный и общий основной типы катализа, а целью — поиск общих свойств этих ферментов, которые, несмотря на различие механизмов, обеспечивают эффективность протеиназ (и других амидгидролаз) для специфических субстратов, близкую к диффузионно контролируруемому пределу [2] (ср. [3]).

Пока не вполне ясно, каким образом происходит дестабилизация основного состояния субстрата в фермент-субстратном комплексе и «запасается» энергия для практически спонтанного протекания последующих стадий протеолиза, но можно утверждать, что обратная гипотеза о стабилизации переходного состояния, хотя и согласуется со многими экспериментальными данными, не в состоянии объяснить эффективность протеиназ. Такая гипотеза требует, чтобы взаимодействия, возникшие в переходном состоянии, стабилизировались конформационными изменениями белка.

Это, однако, принципиально невозможно, так как образование переходного состояния — всего лишь флуктуация, при которой соударяющиеся атомы не могут обменяться энергией, поскольку время конформационных изменений на 5—7 порядков больше [4] времени жизни этой флуктуации, как бы ни была понижена свободная энергия активации элементарного акта за счет образования нековалентного комплекса.

Каковы же основные положения новой концепции эффективности?

Во-первых, это идея о дестабилизации основного состояния, под которой понимается стабилизация ферментом термодинамически невыгодной, но крайне реакционноспособной формы субстрата в продуктивном фермент-субстратном комплексе.

Во-вторых, предполагается, что в продуктивных комплексах реагирующие

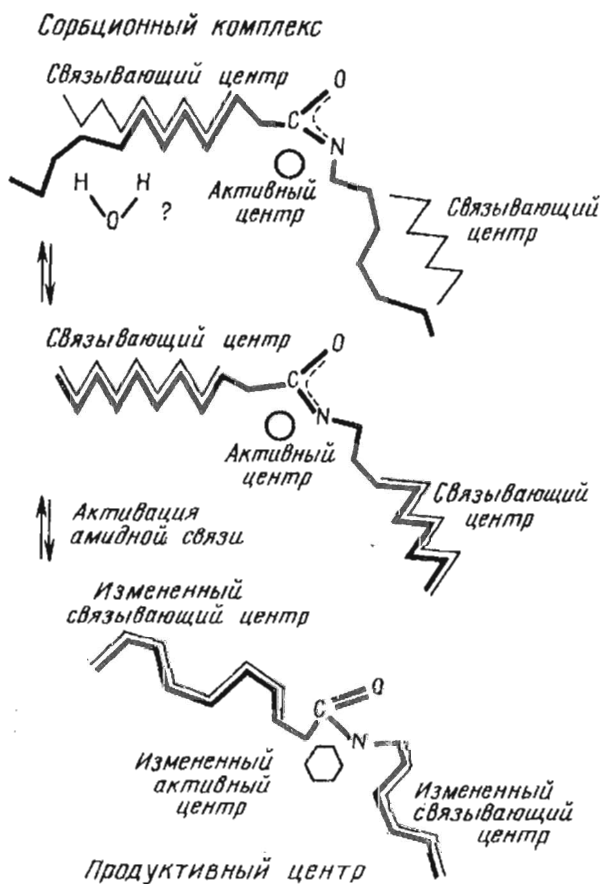


Рис. 1. Схема образования продуктивного фермент-субстратного комплекса

группы как субстрата, так и фермента находятся в состояниях, отличающихся от их состояния в растворе.

Мы полагали, что строго доказать эти положения прямыми кинетическими экспериментами невозможно, и здесь требуется привлечь расчетные методы. Однако экспериментальные данные могут быть привлечены для обоснования и выбора этих методов.

Гидролиз амидной связи — многостадийный процесс, сопровождающийся ступенчатым понижением энергии этой связи за счет ее поляризации. Естественно предположить, что резонансная дестабилизация амидной группы играет доминирующую роль в образовании ее термодинамически невыгодной, но реакционноспособной формы (рис. 1).

На первой стадии ассоциации фермент и субстрат образуют первичный нековалентный комплекс, в котором оба компонента теряют почти все трансляционные степени свободы. Но в этом комплексе реализуются далеко не все потенциально возможные контакты между ферментом и субстратом — происходит лишь «заякоривание» субстрата и, возможно, вытеснение молекул воды, расположенных в активном и связывающем центрах фермента (см. [5]).

На последующих этапах реализуется максимально возможное число взаимодействий между субстратом и связывающим центром белка, и в ходе этого процесса создаются условия для образования реакционноспособной формы субстрата.

В продуктивном комплексе эта активная резонансно-дестабилизированная форма стабилизируется благодаря взаимодействию измененного реагирующего

Рис. 2. Корреляция скорости ($RT \ln k_{\text{cat}}/K_{\text{п(каж)}}$) и свободной энергии (ΔG) гидролиза субстратов типа $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-X}$, катализируемого α -химотрипсином [7]; X — уходящая группа субстратов

Рис. 3. Сечения потенциальной поверхности по двугранным углам ϕ_1 и ψ_1 для нековалентных комплексов фермента с AcPhe-XNH_2 , где X = -Gly- (а) и -Ala- (б)

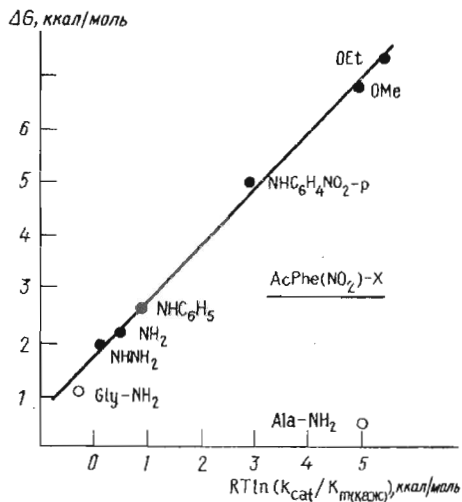


Рис. 2

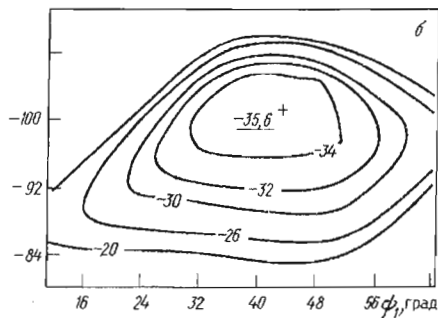
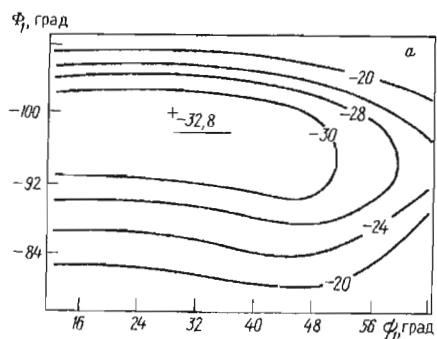


Рис. 3

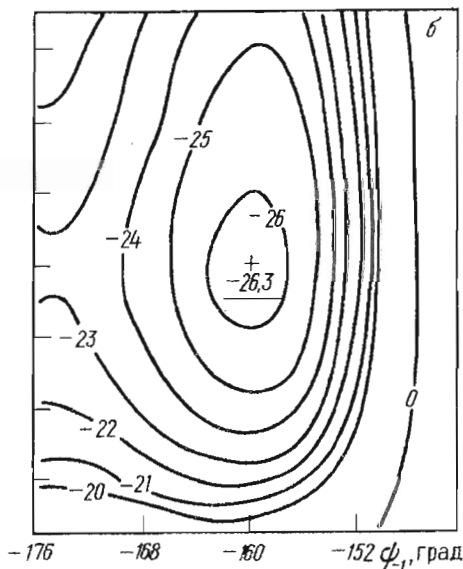
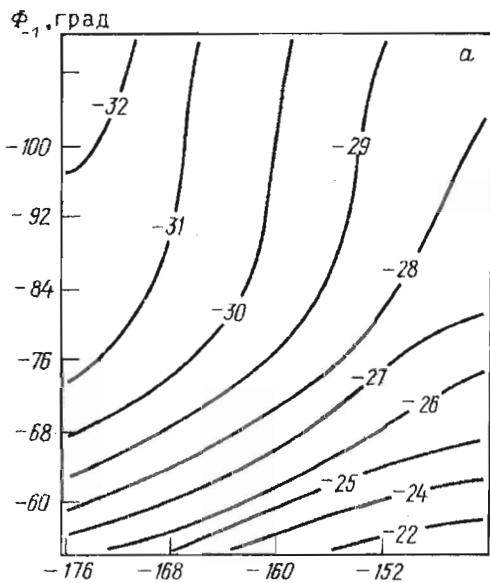
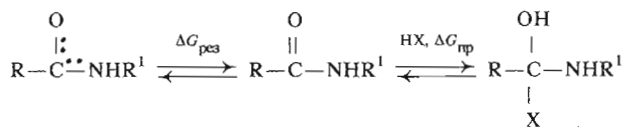


Рис. 4. Сечения потенциальной поверхности по двугранным углам ϕ_{-1} и ψ_{-1} для нековалентных комплексов фермента с AcPhe-XNH_2 , где X = -Ala- (а) и -Val- (б)

Свободные энергии присоединения нуклеофилов ($\Delta G_{\text{пр}}$) и резонансной стабилизации амидов ($\Delta G_{\text{рез}}$) [7]



Амид	Нуклеофил	$\Delta G_{\text{рез}}$, ккал/моль	$\Delta G_{\text{пр}}$, ккал/моль
НОС—NHCH ₃	CH ₃ OH	22,0	—4,6
CH ₃ CON(CH ₃) ₂	CH ₃ OH	18,7	1,96
	C ₆ H ₅ OH	18,7	2,44
	C ₂ H ₅ SH	18,7	—2,45
НОС—NHC ₆ H ₅	NH(CH ₃) ₂	17,7	—10,6

Таблица 2

Кинетические параметры исследуемых субстратов [9]

Субстрат *	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_m , мМ	$k_{\text{кат}}/K_m$, с ⁻¹ М ⁻¹
AcPhe-GlyNH ₂	0,14	14,6	9,6
AcPhe-AlaNH ₂	2,8	25	112
AcPhe-ValNH ₂	0,46	12,4	37,6

* Расщепляемая амидная связь между аминокислотными остатками.

фрагмента субстрата с соответственно измененными группами активного и связывающего центров фермента. Это осуществляется путем конформационных перестроек, вероятно сопровождающихся перераспределением электронной плотности.

Итак, в продуктивном комплексе фермент комплементарен субстрату с дестабилизированной амидной связью, т. е. его термодинамически невыгодной, реакционноспособной форме.

Ряд экспериментальных данных косвенно подтверждает существование такой активной формы в продуктивном комплексе.

Во-первых, свободная энергия гидролиза амидов, являющаяся мерой их резонансной стабилизации, коррелирует со скоростью расщепления α -химотрипсином лишь в случае полуспецифических субстратов, а не специфических дипептидных субстратов, имеющих такие уходящие группы, как глицин и аланин [6]. Это указывает на различное связывание полуспецифических и специфических субстратов в комплексах (рис. 2).

Во-вторых, сопоставление скоростей гидролиза амидов (с учетом индукционных эффектов их отщепляемых групп) и скоростей образования полуацеталей кетонов показывает, что резонансная стабилизация вносит основной вклад в свободную энергию превращения амида в тетраэдрическое промежуточное соединение [7]. Присоединение же нуклеофила к резонансно-дестабилизированным амидам происходит практически без затраты энергии (табл. 1).

В этом отношении показательно, что по своей эффективности β -лактамазы сравнимы с протеиназами, хотя сами по себе β -лактамы гидролизуются примерно

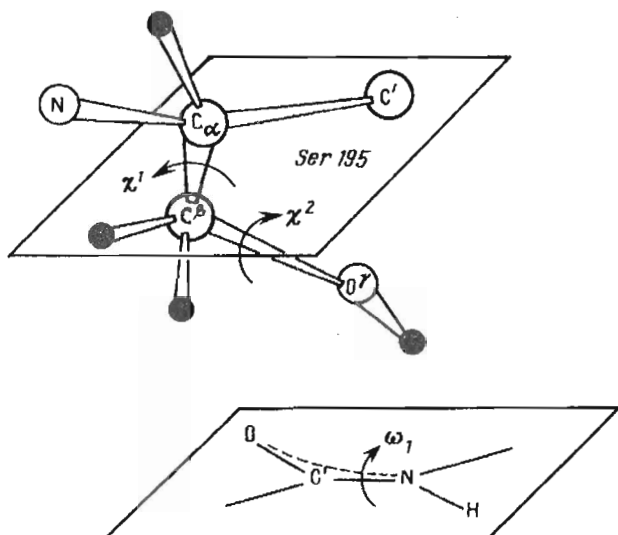


Рис. 5. Расположение плоскости реакционной амидной связи относительно нуклеофильного остатка Ser195 в нековалентных комплексах сериновых протеиназ

на 3 порядка быстрее обычных амидов вследствие стерической резонансной дестабилизации амидной группы.

Впервые методом молекулярной механики в потенциальном поле атомов белка (см. [8]) мы сравнили структуры нековалентных комплексов α -химотрипсина с тремя специфическими дипептидными субстратами, различающимися уходящей группой (табл. 2). В этих сорбционных комплексах субстраты имеют планарную амидную группу. Хотя конформации этих субстратов и каталитически важных групп фермента в комплексах были практически одинаковы, центральный остаток (рис. 3) и уходящие группы (рис. 4) в них значительно различались своей подвижностью.

Анализ модельных систем как для сериновых [10], так и для аспартатных [11] протеиназ, проведенный с использованием лишь оптимизационных методов квантовой химии, выявил условия оптимальности и инвариантности, при которых возможно функционирование этих систем.

Конформационные же изменения активного остатка Ser195, обеспечивающие нуклеофильную атаку и образование тетраэдрического промежуточного соединения для дипептидных субстратов, в нековалентных сорбционных комплексах стерически запрещены. Конформация этого остатка может изменяться только за счет вращения вокруг угла χ^1 , при котором C'- и O-атомы не сближаются (рис. 5). Это означает, что нуклеофильная атака в сериновых протеиназах требует конформационных изменений субстрата, для чего необходимо понижение торсионного барьера реакционной амидной связи. Таким образом, модельная реакция гидролиза может рассматриваться как конгруэнтная ферментативной только в том случае, если образованию тетраэдрического интермедиата в ней так же, как и в фермент-субстратном комплексе, предшествует резонансная дестабилизация амидной группы.

Возможны три пути нарушения резонансной стабилизации амида. Два из них связаны с его деформацией — либо за счет вращения вокруг C—N-связи, либо за счет «пирамидализации» [12]. Оба процесса требуют затраты энергии около 20 ккал/моль. Хотя «пирамидализация» на первый взгляд более выгодна, так как облегчает сближение карбонильного C-атома и нуклеофила и образование тетраэдрического промежуточного соединения, нуклеофильная атака, по крайней мере

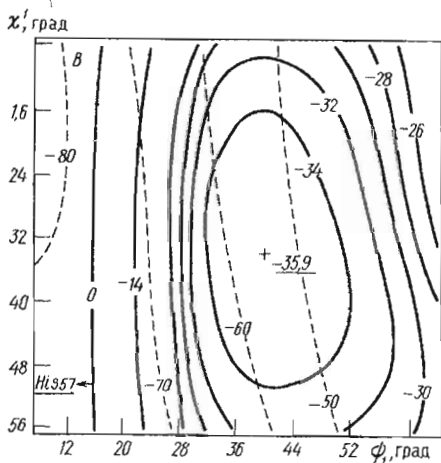
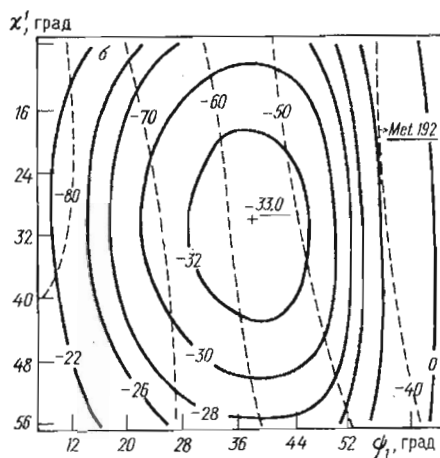
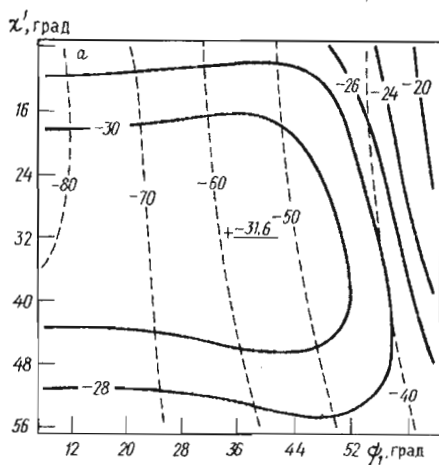


Рис. 6. Сечения потенциальной поверхности по двугранным углам χ_1^1 остатка Ser195 и ψ_1 (—) и изолинии угла между направлением, связывающим карбонильный С-атом субстрата и нуклеофильный O^- -атом остатка Ser195, и плоскостью реакционной амидной группы (---) для нековалентных комплексов AcPhe-XNH₂ с ферментом, где X = -Gly- (а), -Ala- (б) и -Val- (в) (ср. рис. 1 в [8]); стрелка указывает на остаток в активном центре, контролирующей подвижность субстратов при образовании продуктивного комплекса

в сериновых протеиназах, невозможна без полной резонансной дестабилизации амидной связи.

Третий путь, при котором происходит полная дестабилизация амида, эффективно происходит только в продуктивном комплексе за счет электрофильной активации реакционной амидной группы. Традиционно считается, что в сериновых протеиназах она обеспечивается взаимодействием карбонильного О-атома субстрата с «оксианионной полостью» фермента лишь за счет водородных связей с NH-группами остатков Gly193 и Ser195 [13]. В аспаргатных протеиназах, однако, как показывают расчеты, такая активация возможна только при протонировании карбонильного кислорода субстрата [11], т.е. за счет электронных взаимодействий. Более того, свободная энергия связывания, вычисленная из констант Михаэлиса ($K_m \approx 1$ мМ), намного меньше суммы всех нековалентных, электростатических и других взаимодействий белка и субстрата (см., например, [14]).

Совершенно очевидно, что в образовании продуктивного комплекса принимают участие ковалентные взаимодействия. Вряд ли водородные связи (энергия каждой ≤ 5 ккал/моль) могут обеспечить «сток» даже π -электронов с амидной группы для ее электрофильной дестабилизации: в случае аспаргатных протеиназ увеличить отрицательный заряд на нуклеофильном О-атоме воды (соединенной Н-связью с остатком Asp32) до $\geq -0,5$ а. е. [11] или обеспечить низкомолекуляр-

ным ингибиторам типа пепстатина константу связывания с протеиназами около 1 нМ [15].

Согласно нашим расчетам, в невалентных комплексах специфических субстратов с α -химотрипсином подвижность этих субстратов по углам, определяющим нуклеофильную атаку, контролируется остатками белка, которые никогда не рассматривались как каталитически значимые (рис. 6). Крайне вероятно, что такие индивидуальные остатки имеются для каждого специфического субстрата. Именно они обеспечивают комплементарность субстрата и фермента, измененных как конформационно, так и электронно, и определяют специфичность субстратов на уровне продуктивного комплекса. Найти такие группы под силу лишь электронно-конформационному анализу, который может рассчитать структуру продуктивного комплекса.

Так, например, остаток Met192, крайне подвижный в нативном белке [16], определяет подвижность и, вероятно, структуру продуктивного комплекса субстрата AcPhe-AlaNH₂, имеющего наибольшую скорость гидролиза среди рассматриваемых субстратов [8, 9] (табл. 1). До сих пор этому Met192 приписывалась лишь роль защиты S₁-локуса α -химотрипсина от растворителя [17], хотя модификация этого остатка по-разному влияет на гидролиз амидов аминокислот и пептидов [18], что указывает на различие его функций в продуктивных комплексах с этими субстратами. Мы обнаружили, что конформации боковой цепи Met192 по углу χ^2 в нековалентных комплексах субстратов и в комплексе β -трипсина с бычьим панкреатическим трипсиновым ингибитором различаются примерно на 75° [19].

Таким образом, согласно нашей концепции, специфичность протеиназ отражает жесткую комплементарность между конформационно и электронно измененной, термодинамически невыгодной реакционноспособной формой субстрата и фермента в продуктивном комплексе. Флуктуации субстрата в продуктивном комплексе практически исключены, и потому гидролиз субстрата определяется вероятностью образования продуктивного комплекса. Последняя близка к единице за счет промежуточных нековалентных комплексов (см., например, [20]), «подготавливающих» образование продуктивного комплекса благодаря вторичным взаимодействиям между ферментом и субстратом (рис. 1). Если продуктивный комплекс не образуется, то реализуется либо непродуктивное связывание, либо «синккаталитическое» ингибирование.

В случае же протеиназ с абсолютной специфичностью вроде энтеропептидазы [21] и ренина [22] традиционное деление ферментов по уровню специфичности теряет смысл. Здесь высокая эффективность катализа обеспечивается идеальной комплементарностью, которая приводит к крайне высокой вероятности образования продуктивного комплекса и к полной резонансной дестабилизации амидной связи.

Из сказанного выше следует, что катализируемый протеиназами гидролиз сам по себе может не подчиняться теории абсолютных скоростей реакций. По традиции пытаются коррелировать эффективность и специфичность на уровне нековалентных комплексов, где нет оптимальной комплементарности между ферментом и субстратом. С нашей же точки зрения, эффективность протеиназ — это способность ферментов связываться с субстратами с образованием реакционноспособных продуктивных комплексов, скорость распада которых определяет наблюдаемую в эксперименте специфичность к различным субстратам.

Это означает, в частности, что протеолиз в принципе может не иметь конгруэнтных моделей.

Сегодня благодаря рентгеноструктурным данным вполне реален анализ структуры продуктивного комплекса, которая определяет всю энергетику протеолиза.

В нашей лаборатории разрабатывается эстафетная электронно-конформационная программа, объединяющая как молекулярно-механическую, так и квантово-химическую оптимизации. Это позволит рассмотреть комплексообразование и гидролиз в рамках единой модели, как синхронный процесс. Молекулярно-механическая часть этой программы позволит минимизировать структуры неко-

валентных комплексов и находить неблагоприятные контакты между атомами тех групп, в окружении которых возможно перераспределение электронной плотности, необходимое для продуктивного связывания. После передачи энергетических и геометрических параметров второй, квантово-химической части программы станет возможным оптимизировать только те химические группировки, которые ответственны за специфичность образования продуктивного комплекса.

Мы надеемся связать процесс комплексообразования, особенности структуры продуктивного комплекса и наблюдаемые в эксперименте эффективность и специфичность протеолиза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antonov V. K., Alexandrov S. L.//Peptides and Proteases: Recent Advances/Eds Schowen R. L., Barth A. N. Y.: Pergamon Press, 1987. P. 265—272.
2. Chou K.-C., Li T.-T., Zhuo G.-Q.//Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 657. P. 304—308.
3. Fisher J., Belasco J. G., Khosla S., Knowles J. R.//Biochemistry. 1980. V. 19. P. 2895—2901.
4. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991. С. 368.
5. Marquart M., Walter J., Deisenhofer J., Bode W., Huber R.//Acta crystallogr. 1983. V. B39. P. 480—490.
6. Козлов Л. В., Дьяченко Е. Д., Антонов В. К.//Биоорганич. химия. 1977. Т. 3. С. 105—110.
7. Fastrez J.//J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. P. 7004—7013.
8. Александров С. Л.//Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. № 1. С. 5—13.
9. Bizzozero S. A., Baumann W. K., Dutler H.//Eur. J. Biochem. 1982. V. 122. P. 251—258.
10. Александров С. Л., Антонов В. К.//Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. С. 147—158.
11. Александров С. Л., Антонов В. К.//Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. С. 464—475.
12. Антонов В. К., Александров С. Л.//Физико-химические проблемы ферментативного катализа/Ред. Торчинский Ю. М. М.: Наука, 1984. С. 232—241.
13. Henderson R.//J. Mol. Biol. 1970. V. 54. P. 341—354.
14. Schultz R. M., Konovessi-Panayotatos A., Peters J. R.//Biochemistry. 1977. V. 16. P. 2194—2202.
15. Umezawa H. Enzyme Inhibitors of Microbiological Origin. Tokyo: Univ. Tokyo Press, 1972.
16. Максумов И. С., Липкинд Г. М., Попов Е. М.//Биоорганич. химия. 1976. Т. 6. С. 737—745.
17. Birktoft J. J., Blow D. M.//J. Mol. Biol. 1972. V. 68. P. 187—240.
18. Treadway W. J., Jr., Schultz R. M.//Biochemistry. 1976. V. 15. P. 4171—4174.
19. Huber R., Kukla D., Bode W., Schwager P., Bartels K., Deisenhofer J., Steigemann W.//J. Mol. Biol. 1974. V. 89. P. 73—101.
20. Попов Е. М.//Молекулярн. биология. 1977. Т. 11. С. 5—41.
21. Anderson L. E., Walsh K. A., Neurath H.//Biochemistry. 1977. V. 16. P. 3354—3360.
22. Inagami T., Murakami K.//J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 2978—2983.

Поступила в редакцию
15.VI.1993

S. L. Alexandrov

EFFICIENCY OF PROTEOLYTIC ENZYMES

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

A theory of the ground state's destabilization is developed explaining the high efficiency of proteases. The theory suggests a participation of the valence interactions in the formation of a productive complex and connects the efficiency and the specificity of proteolysis with the structure of such a complex. Proved is nonproductivity of nonvalence complexes in which the reactive amide group of the substrate is planar. It is suggested that the theory of the absolute rates of reactions does not cover the process of the enzymatic hydrolysis.