



УДК 577.156

ПРИРОДА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ТРИПСИНА.
РОЛЬ ЗАРЯДА И ГИДРОФОБНОСТИ БОКОВОЙ ЦЕПИ
В ОПРЕДЕЛЕНИИ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

Клесов А. А.

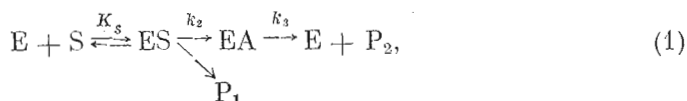
*Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

На основании собственных и литературных данных предложена гипотеза о механизме действия трипсина в реакциях со специфическими субстратами. Согласно гипотезе, при образовании фермент-субстратного комплекса катионная группа боковой цепи субстрата не взаимодействует с «анионным участком» (карбоксильной группой остатка Asp-189) и связывается с активным центром фермента только за счет гидрофобных взаимодействий. Образование ионной связи между амино- или гуанидиновой группой субстрата и остатком Asp-189 трипсина происходит в предпереходном состоянии реакции ацилирования. Электростатическое взаимодействие субстрата и фермента сохраняется в ацилферментном промежуточном соединении и разрушается только после переходного состояния реакции деацилирования. Данная гипотеза подтверждается результатами количественного анализа взаимосвязи структуры субстратов трипсина и их реакционной способностью, а также опубликованными результатами рентгеноструктурного анализа комплекса трипсина со специфическими ингибиторами. Показано, что свободная энергия электростатического взаимодействия специфического субстрата с активным центром фермента равна $4,2 \pm 0,8$ ккал/моль, что приводит к дополнительному ускорению реакции ацилирования в 100—1000 раз.

Трипсин (КФ 3.4.21.4) проявляет специфичность в реакциях гидролиза сложноэфирных, амидных и пептидных связей, образованных карбоксильной группой положительно заряженной аминокислоты (в первую очередь лизина и аргинина) [1—3]. Помимо этого трипсин катализирует гидролиз широкого круга «неспецифических» субстратов, производных аминокислот с незаряженными боковыми цепями и алифатических карбоновых кислот [3—6]. Так как в круг субстратов трипсина входят также специфические субстраты α -химотрипсина (производные аминокислот с гидрофобной боковой цепью), то иногда отмечают, что трипсин проявляет «химотриптическую» активность (см. [3]). Сопоставление результатов рентгеноструктурного анализа трипсина и α -химотрипсина позволило обнаружить структурную основу различий в субстратной специфичности данных ферментов. При значительном сходстве аминокислотной последовательности и пространственного строения трипсина и α -химотрипсина, а также структуры каталитических участков активных центров обоих ферментов [7—9] были обнаружены принципиальные различия в строении их участков связывания. Было показано, что в активных центрах обоих ферментов имеется «щель», или полость, роль которой заключается в связывании боковой цепи аминокислотных остатков субстратов, участвующих в образовании

расщепляемой связи. Однако если в случае α -химотрипсина эта полость является гидрофобной и образована в основном неполярными боковыми цепями соответствующих аминокислот, то в случае трипсина данная субстратсвязывающая полость содержит отрицательно заряженную карбоксильную группу. Эта группа принадлежит боковой цепи остатка Asp-189, находящегося на «дне» гидрофобной полости и заменяющего остаток Ser-189 в связывающем центре α -химотрипсина [7]. Именно это различие в строении участка связывания трипсина и α -химотрипсина и обуславливает различия в субстратной специфичности данных ферментов.

Известно [10], что реакции гидролиза, катализируемые трипсином и α -химотрипсином, протекают в три кинетически значимые стадии:



где ES — фермент-субстратный комплекс, EA — ацилферментное промежуточное соединение, P_1 и P_2 — основной и кислотный продукты гидролиза, K_s — истинная константа Михаэлиса, k_2 и k_3 — индивидуальные константы скоростей реакций ацилирования и деацилирования соответственно. Определяемые на опыте (в стационарных условиях реакции) эффективные кинетические параметры — каталитическая константа $k_{\text{кат}}$ и кажущаяся константа Михаэлиса $K_{\text{м(каж)}}$ — связаны со значениями индивидуальных констант схемы (1) соотношениями

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{1 + k_2/k_3}, \quad (2)$$

$$K_{\text{м(каж)}} = \frac{K_s}{1 + k_2/k_3}, \quad (3)$$

входящими в простое уравнение Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]_0}{K_{\text{м(каж)}} + [S]_0}.$$

Обычно полагают, что роль отрицательного заряда в сорбционном участке заключается в обеспечении электростатического взаимодействия с положительно заряженной боковой цепью специфического субстрата при образовании фермент-субстратного комплекса (см. [11—13]). Роль электростатического взаимодействия субстрата и фермента на дальнейших стадиях протекания ферментативной реакции в литературе не детализируется. Однако это предположение не согласуется с имеющимися в литературе данными об эффективности катализа трипсином (в частности, с величинами кинетических и равновесных параметров соответствующих ферментативных реакций, см. ниже) и не может объяснить каталитическую специфичность трипсина по отношению к производным заряженных аминокислот.

На основании анализа кинетических параметров реакций, катализируемых трипсином, а также рентгеноструктурных данных о способах взаимодействия трипсина с заряженными ингибиторами нами предлагается гипотеза относительно механизма действия трипсина и роли электростатического взаимодействия субстрата с активным центром трипсина в эффективности ферментативного катализа. Эта гипотеза состоит из трех положений.

1. При образовании фермент-субстратного комплекса заряженная группа боковой цепи специфического субстрата трипсина *не взаимодействует* с «анионным участком» (карбоксильной группой остатка Asp-189) активного центра фермента и субстрат связывается с сорбционной «полостью» только за счет гидрофобных взаимодействий.

2. При образовании переходного состояния реакции ацилирования активный центр трипсина претерпевает конформационное изменение, при-

водящее к образованию ионной связи между положительно заряженной амино- или гуанидиновой группой боковой цепи специфического субстрата и отрицательно заряженной карбоксильной группой остатка аспарагиновой кислоты-189 трипсина.

3. Образовавшаяся в переходном состоянии ацилирования ионная связь сохраняется в ацилферментном промежуточном соединении и разрушается только после прохождения переходного состояния реакции деацилирования.

Рассмотрим кинетические следствия предложенного механизма ферментативной реакции и сопоставим их с результатами изучения кинетики реакций гидролиза специфических и неспецифических субстратов, катализируемых трипсином. Анализ субстратной специфичности фермента в этом случае удобно проводить в рамках теории переходного состояния [14—16], используя энергетические диаграммы типа «свободная энергия — координата реакции» (рис. 1,2). Принципы построения подобных энергетических диаграмм детально изложены в работах [17, 18]. Максимумы диаграмм соответствуют переходным состояниям отдельных стадий ферментативной реакции (ацилирования и деацилирования в данном случае), а минимумы — метастабильным промежуточным соединениям (фермент-субстратный комплекс, ацилфермент и комплекс фермент—продукт).

Энергетическая диаграмма для реакции трипсина со специфическим субстратом, этиловым эфиром *N*-бензоил-*L*-аргинина (рис. 1, сплошная линия), построенная на основании экспериментальных данных (см. [3]), качественно согласуется со всеми положениями гипотетического механизма реакции трипсина со специфическими заряженными субстратами, приведенного выше. На этом же графике приведена для сравнения диаграмма изменения свободной энергии ферментативной реакции с неспецифическим субстратом, метиловым эфиром *N*-бензоил-*L*-аминомасляной кислоты (пунктирная линия) [19]. Из сопоставления этих двух диаграмм можно заключить, что основными кинетическими следствиями предложенного механизма реакции трипсина со специфическими субстратами будут следующие:

а) значение истинной константы Михаэлиса (K_s) ферментативной реакции практически не изменяется при переходе от нейтральных субстратов трипсина к их заряженным аналогам, характеризующимся теми же значениями гидрофобности боковой цепи. Более того, учитывая сходство в механизме действия трипсина и α -химотрипсина и строении их активных центров (см. выше), можно ожидать, что истинные константы Михаэлиса для реакций гидролиза нейтральных субстратов, катализируемых этими двумя ферментами, будут близкими по величине *;

б) образование ионной связи между субстратом и ферментом в переходном состоянии реакции приводит к уменьшению свободной энергии активации реакции ацилирования (ΔG_2^\ddagger), а также бимолекулярной реакции ацилирования (ΔG^\ddagger , см. рис. 1) на величину энергии электростатического взаимодействия образовавшейся ионной пары ($\Delta G_{эл}$). Иначе говоря, при гидролизе специфических субстратов под действием трипсина должно наблюдаться существенное увеличение константы скорости ацилирования (k_2) и бимолекулярной константы скорости ферментативной реакции (k_2/K_s) по сравнению с реакциями ферментативного гидролиза неспецифических субстратов;

* Естественно, что здесь необходимо учитывать и некоторые различия в топографии участков связывания трипсина и α -химотрипсина. Так, для специфических субстратов α -химотрипсина, имеющих объемные неполярные боковые цепи, следует принимать во внимание возможность неблагоприятных взаимодействий их с «анионным» участком трипсина. Поэтому, строго говоря, вышеприведенное правило может быть приложимо только к производным низших алифатических α -аминокислот (глицина, аланина, валина, аминокислоты).

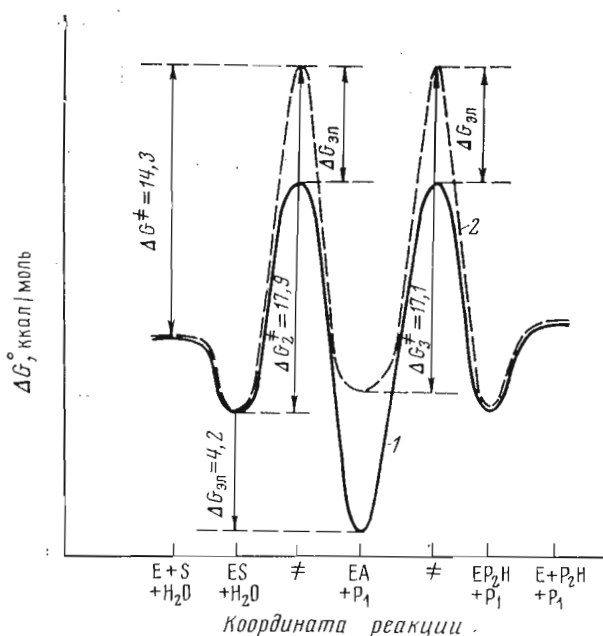


Рис. 1. Изменение стандартной свободной энергии по координате реакции при трипсиновом гидролизе: 1 — этилового эфира N-бензоил-L-аргинина (построено по данным [3]); 2 — метилового эфира N-бензоил-L-аминомасляной кислоты. Стандартные состояния соответствуют 1 М концентрациям, активность воды принята равной 1. Расчеты проведены для неионизованных форм продуктов

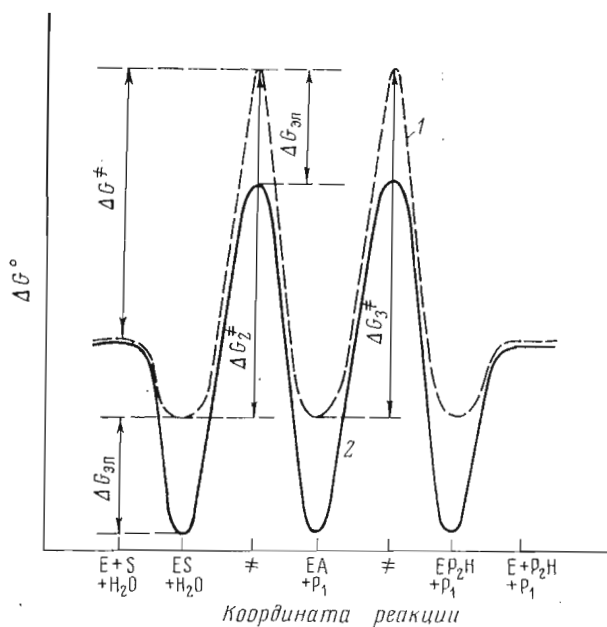


Рис. 2. Изменения стандартной свободной энергии по координате реакции для трипсинового гидролиза гипотетических субстратов: 1 — незаряженный, 2 — заряженный аналог субстрата. Электростатическое взаимодействие второго субстрата с ферментом осуществляется при образовании фермент-субстратного комплекса и остается неизменным в ходе дальнейшего ферментативного превращения. Условия построения диаграмм — в подписи к рис. 1

в) значение константы скорости деацилирования трипсина не зависит от энергии электростатического взаимодействия субстрата и фермента (при условии постоянства $\Delta G_{эл}$ в ходе реакции) и определяется только величиной гидрофобности боковой цепи субстрата (см. [20]).

В качестве альтернативы на рис. 2 приведена энергетическая диаграмма для гипотетической реакции трипсина, в которой ионная связь между субстратом и ферментом возникает уже при образовании фермент-субстратного комплекса (сплошная линия). В этом случае переход от неспецифических (незаряженных) к специфическим субстратам трипсина привели бы лишь к улучшению связывания субстрата с ферментом (уменьшению значений K_s) при неизменных значениях констант скоростей ацилирования (k_2) и деацилирования (k_3).

Чтобы определить, какой из двух путей изменения свободной энергии (рис. 1 или 2) имеет место при катализе трипсином, рассмотрим значения кинетических и равновесных параметров реакций трипсинового гидролиза специфических и неспецифических субстратов. К сожалению, в литературе крайне мало работ по определению индивидуальных констант реакций гидролиза, катализируемых трипсином (см. [3, 21, 22]). Однако, основываясь на сходстве в механизмах реакций гидролиза нейтральных субстратов, катализируемых трипсином и α -химотрипсином [19, 21], можно попытаться использовать для оценки значений индивидуальных констант трипсинового гидролиза корреляционные уравнения (4) — (7), полученные нами ранее [19, 23] при изучении реакций, катализируемых α -химотрипсином:

$$-\log K_s = (1,3 \pm 0,2) \pi^{(R_1)} + (1,0 \pm 0,1) \pi^{(R_2)} - (1,15 \pm 0,05), \quad (4)$$

$$\log k_2 = -(0,7 \pm 0,1) \pi^{(R_1)} + (1,2 \pm 0,1) \pi^{(R_2)} + (0,1 \pm 0,05), \quad (5)$$

$$\log k_3 = (1,1 \pm 0,05) \pi^{(R_2)} - (0,85 \pm 0,05), \quad (6)$$

$$\log k_2/K_s = (0,6 \pm 0,1) \pi^{(R_1)} + (2,2 \pm 0,1) \pi^{(R_2)} - (1,1 \pm 0,1). \quad (7)$$

Здесь $\pi^{(R_i)}$ — значения констант гидрофобности Ганша [24, 25] для заместителя R_i в метиловых эфирах N-замещенных L-аминокислот * $R_1CONHCH$ (R_2) $COOCH_3$. Проверка этих корреляционных уравнений для ряда нейтральных субстратов трипсина показала достаточно хорошую сходимость теоретически рассчитанных и экспериментально найденных значений индивидуальных констант ферментативной реакции (см. ниже).

В табл. 1 приведены экспериментальные значения истинных констант Михаэлиса для катализируемых трипсином реакций гидролиза нейтральных и заряженных субстратов. Экспериментальные значения достаточно близки к вычисленным теоретически (на основании величин констант гидрофобности боковых цепей субстратов, без учета электростатического взаимодействия) или найденным в реакциях химотрипсинового гидролиза. Таким образом, на основании данных табл. 1 можно сделать вывод, что электростатическое взаимодействие между «анионным участком» трипсина и его специфическими субстратами действительно *не реализуется* в фермент-субстратном комплексе ** и что эффективность фермент-суб-

* Для расчета реакционной способности этиловых эфиров замещенных аминокислот значение константы скорости ацилирования (k_2) следует уменьшить в 2 раза по сравнению с метиловыми эфирами соответствующих аминокислот [19].

** Измеряемые значения констант Михаэлиса K_m (каж) для гидролиза сложных эфиров N-ацилированных производных лизина и аргинина под действием трипсина крайне малы ($\sim 0,001$ — $0,01$ мМ) [3]. Однако это обусловлено не эффективным фермент-субстратным связыванием, а чрезвычайно высокими значениями отношений k_2/k_3 , достигающими сотен и тысяч [22, 30] (см. выражение 3). Экспериментальные определения истинных значений констант Михаэлиса с использованием методов быстрой кинетики показали [22, 30], что в случае специфических субстратов трипсина K_m обычно лежат в диапазоне 1—10 мМ, аналогично значениям истинных констант Михаэлиса для реакций α -химотрипсина со специфическими субстратами [31].

Теоретические и экспериментальные значения истинных констант
 Михаэлиса в реакциях гидролиза сложнэфирных и амидных
 субстратов, катализируемых трипсином

Субстрат ^{1*}	Заряд боковой цепи субстрата	K_s , мМ	
		расчет ^{2*}	эксперимент
Ac-Gly-OEt	0	565 ^{3*}	830 [26]
Ac-But-OMe ^{4*}	0	417 ^{3*}	430 [19]
Ac-Val-OEt	0	398 ^{3*}	210 [27]
Ac-Tyr-OEt	0	17 ^{3*}	47 [3]
Ac-Hept-OMe ^{5*}	0	10	49 (6% CH ₃ CN) [5]
Bz-Ala-OMe	0	11 ^{3*}	36 [19]
Bz-But-OMe ^{4*}	0	1,8	2,3 [19]
Bz-Hept-OMe ^{5*}	0	0,08	0,10 [5]
Bz-Arg-OEt	+	2,4	2,2 [3]
Bz-Arg-NH ₂	+	2,4	2,5 [28]
Tos-Arg-OEt	+	2,4	1,3 [22]
Tos-Arg-NH ₂	+	2,4	7,4 [28]
Bz-Lys-NH ₂	+	2,4	4,6 [28]
Tos-Orn-OMe ^{6*}	+	7,6	16 [3]

^{1*} Производные L-аминокислот (за исключением глицина).

^{2*} Рассчитано с использованием корреляционного уравнения (4), при расчете константы гидрофобности боковых цепей аргинина, лизина и орнитина учитывалось наличие сольватационной оболочки катиона радиусом $\sim 3\text{ \AA}$ [29].

^{3*} Экспериментальное значение в реакции с α -химотрипсином [19, 31].

^{4*} Производное α -аминомасляной кислоты.

^{5*} Производное α -аминогептановой кислоты.

^{6*} Производное орнитина.

стратного связывания на стадии образования комплекса Михаэлиса определяется, в частности, гидрофобными взаимодействиями боковой цепи субстрата с сорбционным участком трипсина (как для специфических, так и для неспецифических субстратов).

Рассмотрим далее численные значения констант скоростей ацилирования трипсина специфическими и неспецифическими субстратами. Как видно из табл. 2 и 3, значения констант k_2 и k_2/K_s для реакций трипсина с нейтральными субстратами (а также с производным орнитина, боковая цепь которого короче по сравнению с лизином и аргинином) близки к соответствующим константам в реакциях α -химотрипсина и описываются корреляционными уравнениями (5) и (7). Таким образом, по отношению к незаряженным субстратам, производным низших алифатических аминокислот, трипсин фактически обладает специфичностью химотрипсина, важную роль в которой играют гидрофобные взаимодействия между субстратом и ферментом в переходном состоянии (см. [17]). Однако при переходе к производным лизина и аргинина наблюдается чрезвычайно резкое возрастание значений констант скоростей ацилирования, превышающих в 100—1000 раз теоретические значения, рассчитанные в предположении только гидрофобных взаимодействий между боковой группой субстрата и сорбционным участком трипсина.

Из рис. 1 видно, что при сопоставлении экспериментальных и теоретически рассчитанных значений констант k_2 и (или) k_2/K_s можно вычислить стандартную свободную энергию электростатического взаимодействия ($\Delta G_{эл}$) субстрата и фермента в переходном состоянии реакции ацилирования (табл. 2, 3). Расчеты показывают, что эта величина составляет $\sim 4,2 \pm 0,8$ ккал/моль для различных специфических субстратов трипсина. Наконец, сопоставление констант скоростей гидролиза специфических субстратов трипсина и их оптических антиподов, соответствующих производных заряженных D-аминокислот (табл. 4), также приводит к выводу, что пониженная реакционная способность последних в значитель-

Сопоставление теоретических и экспериментальных значений констант скоростей ацилирования трипсина заряженными и нейтральными субстратами

Субстрат ^{1*}	Заряд боковой цепи субстрата	k_2 , с ⁻¹		$\Delta\Delta G_2^{\ddagger}$, ккал/моль ^{5*}
		расчет ^{2*}	эксперимент	
Bz-Arg-OEt	+	5	$2 \cdot 10^4$ [3]	4,9
Bz-Lys-OMe	+	10	$5,9 \cdot 10^3$ ^{3*}	3,8
Tos-Arg-OMe	+	10	$8 \cdot 10^3$ ^{3*}	4,0
			$4,8 \cdot 10^4$ [3]	5,0
Ac-Gly-OEt	0	0,051 ^{4*}	0,032 [3]	—
Bz-Ala-OMe	0	0,34 ^{4*}	0,25 [32]	—
Ac-But-OMe	0	8,8	7,6 [19]	—
Bz-But-OMe	0	0,41 ^{4*}	0,45 [19]	—
Tos-Orn-OMe	+	2,5	5,4 [3]	—

^{1*} Производные L-аминокислот (за исключением глицина).

^{2*} Рассчитано с использованием корреляционного уравнения (5), без учета электростатического взаимодействия между ферментом и субстратом.

^{3*} Рассчитано из экспериментальных значений $k_{кат}$ и $K_{ин}$ (как) [3] и данных табл. 1.

^{4*} Экспериментальное значение в реакции с α -химотрипсином [31].

^{5*} Разница между рассчитанным и экспериментальным значениями стандартной свободной энергии активации ацилирования.

Таблица 3

Сопоставление теоретических и экспериментальных значений бимолекулярных констант скоростей гидролиза заряженных и нейтральных субстратов под действием трипсина

Субстрат	Заряд боковой цепи субстрата	k_2/K_s , М ⁻¹ ·с ⁻¹		$\Delta\Delta G^{\ddagger}$, ккал/моль ^{**}
		расчет [*]	эксперимент	
Bz-Arg-OEt	+	$2,1 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^6$ [35]	4,6
Bz-Lys-OMe	+	$4,2 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^6$ [35]	3,4
Tos-Arg-OMe	+	$4,2 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^6$ [35]	4,6
Tos-Lys-OMe	+	$4,2 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^6$ [3]	3,7
Ac-Lys-OMe	+	$4,5 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^5$ [3]	3,9
Ac-Gly-OEt	0	0,09 ^{***}	0,04 [3]	—
Ac-Ala-OEt	0	0,89 ^{***}	0,78 [27]	—
Ac-But-OMe	0	21,1 ^{***}	16 [19]	—
Bz-But-OMe	0	$2,3 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$ [19]	—
Tos-Orn-OMe	+	$3,4 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^2$ [3]	—

^{*} Рассчитано с использованием корреляционных уравнений (4) и (5); при расчете значений истинных констант Михаэлиса для производных аргинина, лизина и орнитина учитывалось наличие сольватационной оболочки катиона радиусом $\sim 3 \text{ \AA}$ [29].

^{**} Разница между рассчитанными и экспериментальными значениями стандартной свободной энергии активации реакции.

^{***} Экспериментальное значение в реакции с α -химотрипсином [19, 31].

ной степени обусловлена нарушением электростатического взаимодействия субстрата с «анионным участком» активного центра трипсина в переходном состоянии ацилирования.

Итак, рассмотрение численных значений индивидуальных констант скоростей реакций трипсина позволяет предположить, что в фермент-субстратном комплексе противоположно заряженные группы субстрата и фермента разделены, в то время как в переходном состоянии ацилирования они образуют ионную связь (рис. 1). Это в свою очередь вызывает понижение стандартной свободной энергии переходного состояния на 4—5 ккал/моль за счет электростатического взаимодействия боковой цепи субстрата с остатком Asp-189 активного центра трипсина.

Таблица 4

Сопоставление реакционной способности специфических субстратов трипсина с их оптическими антиподами и незаряженными структурными аналогами

Субстраты трипсина *	$\Delta\Delta G^\ddagger$, ккал/моль **
Ac-L-Lys-OMe и Ac-D-Lys-OMe	5,1
Bz-L-Arg-OEt и Bz-D-Arg-OEt	6,7
Tos-L-Arg-OMe и Tos-D-Arg-OMe	4,4
Ac-Lys-OMe и Ac-Hept-OMe	5,9
Bz-Lys-OMe и Bz-Hept-OMe	3,5
Lys-OMe и Tyr-OMe	3,7
Tos-Lys-OMe и Tos-Orn-OMe	5,2

* Производные L-аминокислот, где не указано.

** Вычислено на основании значений k_2/K_S для пар субстратов с использованием данных работ [3, 5, 36].

Таблица 5

Сопоставление теоретических и экспериментальных значений констант скоростей деацилирования ацилтрипсинов, производных нейтральных и заряженных субстратов

Ацильная группа	Заряд боковой цепи ацильного остатка	k_2, c^{-1}	
		расчет *	эксперимент
Ac-Leu	0	0,256 **	0,192 [21]
Bz-But	0	1,52 **	1,7 [19]
Ac-Trp	0	30,5 **	31 [21]
Z-Tyr	0	59,6 **	64 [21]
Tos-Orn	+	6,3	5,4 [3]
Ac-Lys	+	22,4	82 [3]
Bz-Lys	+	22,4	22,3 [35]
Tos-Arg	+	22,4	87 [35]
Bz-Arg	+	22,4	23,3 [35]

* Рассчитано с использованием корреляционного уравнения (6).

** Экспериментальное значение в реакции с α -химотрипсином [19, 21].

Можно полагать, что в некоторых случаях возможен механизм ферментативной реакции, приведенный на рис. 2. Известно, что ряд специфических низкомолекулярных ингибиторов трипсина, например бензамидин, *n*-аминобензамидин и фенилгуанидин, характеризуется очень низкими значениями констант диссоциации фермент-ингибиторного комплекса (достигающих 10^{-5} М и ниже) [33] по сравнению с незаряженными ароматическими и алифатическими ингибиторами. Действительно, как показывают данные рентгеноструктурного анализа комплекса трипсина с бензамидином [9, 34], положительно заряженная амидиновая группа ингибитора образует ионную связь с отрицательно заряженной карбоксильной группой остатка Asp-189 фермента при связывании. Таким образом, комплекс трипсина с низкомолекулярным специфическим ингибитором представляет собой в этом смысле аналог переходного состояния реакции ацилирования фермента специфическим субстратом. Более того, производные бензамидина и фенилгуанидина, содержащие сложноэфирную группу в пара-положении, являются необычными субстратами трипсина, гидролиз которых протекает, по-видимому, по механизму, показанному на рис. 2 (сплошная линия). Ферментативный гидролиз этих субстратов

характеризуется весьма низкими значениями как константы Михаэлиса ($\sim 0,01$ мМ), так и каталитической константы (менее $0,05$ с $^{-1}$) [11], как и следует из соответствующей энергетической диаграммы на рис. 2 (ср. с рис. 1). По-видимому, сложные эфиры *n*-амидинофенилуксусной и *n*-гуанидинофенилуксусной кислот, сочетая в себе элементы как неспецифических (производные карбоновых кислот), так и специфических субстратов (заряженные производные, содержащие амидиновую и гуанидиновую группы), образуют ионную связь с карбоксильной группой остатка Asp-189 трипсина уже при связывании с ферментом. В этом случае свободная энергия электростатического взаимодействия реализуется сразу при образовании комплекса Михаэлиса, увеличивая эффективность связывания субстрата с ферментом, но не приводя к дополнительному ускорению каталитических стадий ферментативной реакции.

Таким образом, рентгеноструктурное исследование комплекса трипсина со специфическим ингибитором, бензамидином, позволяет выявить характер электростатического взаимодействия специфического субстрата с ферментом в переходном состоянии ферментативной реакции. По данным кристаллографического анализа [9,34], атом азота N1 бензамидина жестко фиксирован на расстоянии $2,90$ Å от атома кислорода O 81 карбоксильной группы аспарагиновой кислоты-189 активного центра трипсина, в то время как атом азота N2 и атом кислорода O 82 этих групп разделяет расстояние $3,12$ Å*. Однако при рентгеноструктурном исследовании комплекса трипсина с панкреатическим ингибитором, который можно рассматривать как аналог специфического субстрата в фермент-субстратном комплексе, было найдено, что положительно заряженная аммониевая группа остатка Lys-15 ингибитора *не взаимодействует* непосредственно с карбоксильной группой Asp-189 и отделена от молекулы воды [9]. Таким образом, эти данные представляют собой структурную основу для интерпретации субстратной специфичности трипсина и подтверждают гипотезу о механизме действия трипсина, которая была высказана выше на основании кинетических данных.

Рассмотрим, наконец, значения констант скоростей деацилирования ацилтрипсинов, образованных в реакции с нейтральными и заряженными субстратами. Ранее, в работе [21] было показано, что ацилферментные соединения трипсина и α -химотрипсина, образованные при ацилировании ферментов незаряженными субстратами, деацилируются примерно с одинаковыми скоростями (см. табл. 5). Иначе говоря, специфичность трипсина и α -химотрипсина на стадии деацилирования незаряженных производных сходна и определяется величинами гидрофобности боковых цепей соответствующих субстратов (уравнение 6). Как следует из табл. 5, это правило в общем применимо и к заряженным, специфическим субстратам трипсина. Таким образом, образование ионной связи между боковой цепью заряженного субстрата и «анионным участком» трипсина практически не влияет на скорость деацилирования фермента, что в свою очередь указывает на постоянную величину энергии электростатического

* Используя данные значения расстояний, разделяющих положительный и отрицательный заряды, делокализованные по амидиновой и карбоксильной группе, и исходя из вычисленных значений стандартных свободных энергий электростатического взаимодействия субстрата и фермента в переходном состоянии реакций ацилирования (см. табл. 2—4), можно приблизительно оценить величину диэлектрической проницаемости среды в микроокружении ионной пары в активном центре трипсина. Используя формулу [29]

$$\Delta G_{эл} = 305 \frac{z_1 z_2}{r \cdot D}$$

z_i — валентности взаимодействующих ионов; r — расстояние между зарядами, Å; D — величина диэлектрической проницаемости среды; $\Delta G_{эл} = 4,2 \pm 0,8$ ккал/моль), находим значение диэлектрической проницаемости, примерно равное 20—30.

взаимодействия субстрата и фермента в ходе катализа трипсином* (см. рис. 1).

Кинетический анализ субстратной специфичности показывает, что каталитические механизмы действия трипсина и α -химотрипсина сходны на всех стадиях ферментативной реакции. Это сходство носит не только качественный, но и количественный характер, так как использование корреляционных уравнений, общих для обоих ферментов, позволяет рассчитать численные значения истинных констант Михаэлиса и констант скоростей в зависимости от гидрофобности аполярных фрагментов боковых цепей субстратов. Различия в субстратной специфичности трипсина и α -химотрипсина обусловлены образованием ионной связи между катионной группой боковой цепи специфических субстратов трипсина (производных лизина или аргинина) и анионной группой остатка Asp-189 активного центра фермента в *предпереходном состоянии* реакции ацилирования, по-видимому, в результате конформационных изменений фермент-субстратного комплекса. Результаты рентгеноструктурного анализа комплексов трипсина со специфическим низкомолекулярным, а также белковым ингибиторами, опубликованные в последнее время, подтверждают эту гипотезу.

Образующаяся ионная связь сохраняется в ацилферментном промежуточном соединении и разрушается лишь после прохождения переходного состояния реакции деацилирования. Так как свободная энергия электростатического взаимодействия боковой цепи специфического субстрата и активного центра фермента равна 4—5 ккал/моль (для различных производных аминокислот), это приводит к дополнительному ускорению реакции ацилирования трипсина в 100—1000 раз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Keil B. (1974) in *The Enzymes*, 3rd ed. (P. D. Boyer, ed.), vol. III, pp. 249—275. Acad. Press, New York — London.
2. Roberts D. V., Elmore D. T. (1974) *Biochem. J.*, **141**, 545—554.
3. Seydoux F., You J. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **44**, 745—751.
4. Gorecki M., Shalitin Y. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **29**, 189—193.
5. Sanborn B. M., Hein G. E. (1968) *Biochemistry*, **7**, 3616—3623.
6. Seydoux F., Coutouly G., You J. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2284—2290.
7. Blow D. M., Steitz T. A. (1970) *Annu. Rev. Biochem.*, **39**, 63—100.
8. Stroud R. M., Kay L. M., Dickerson R. E. (1974) *J. Mol. Biol.*, **83**, 185—208.
9. Bode W., Schwager P. (1975) *J. Mol. Biol.*, **98**, 693—717.
10. Bender M. L., Kezdy F. J. (1965) *Annu. Rev. Biochem.*, **34**, 49—76.
11. Mares-Guia M., Shaw E., Cohen W. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 5777—5781.
12. Shaw E. (1970) in *Structure-Function Relationships of Proteolytic Enzymes* (P. Desnuelle, H. Neurath, M. Ottesen, eds.), pp. 70—78, Acad. Press, New York.
13. Mares-Guia M., Figueiredo A. F. S. (1972) *Biochemistry*, **11**, 2091—2098.
14. Pauling L. (1948) *Amer. Sci.*, **36**, 58—62.
15. Wolfenden R. (1972) *Accounts Chem. Res.*, **5**, 10—18.
16. Lienhard G. E. (1973) *Science*, **180**, 149—154.
17. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) *Int. J. Chem. Kinetics*, **6**, 801—811.
18. Березин И. В., Мартинек К. (1971) *Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*, **16**, 411—420.

* В принципе данные табл. 5 могли бы соответствовать механизму ферментативной реакции, по которому после завершения реакции ацилирования происходило бы необратимое разрушение ионной связи между боковой цепью специфического субстрата и «анионным участком» фермента. В этом случае для катализа трипсином наблюдалось бы существенное увеличение отношения констант k_{-2}/k_3 по сравнению с реакциями α -химотрипсина (здесь k_{-2} — константа скорости распада ацилфермента в направлении, обратном реакции ацилирования, см. [17]). Однако при изучении кинетики специфических реакций α -химотрипсина и трипсина в присутствии добавленных нуклеофильных агентов было показано [17, 19], что как отношения k_{-2}/k_3 , так и абсолютные величины констант k_{-2} и k_3 являются близкими для реакций, катализируемых этими ферментами. Эти данные согласуются с механизмом реакции представленным на рис. 1.

19. Клесов А. А. (1972) Канд. дис. «Взаимосвязь структуры и реакционной способности субстратов α -химотрипсина», МГУ.
20. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. (1971) FEBS Lett., 15, 125—128.
21. Bender M. L., Killheffer J. V., Jr., Kezdy F. J. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 5330—5331.
22. Himoe A. (1970) J. Biol. Chem., 245, 1836—1841.
23. Klyosov A. A., Kazanskaya N. F. (1972) 8th Meeting FEBS, Amsterdam, Abstr. no 232.
24. Hansch C., Quinlan J. E., Lawrence G. L. (1968) J. Org. Chem., 33, 347—350.
25. Hansch C., Coats E. (1970) J. Pharm. Sci., 59, 731—743.
26. Inagami T., Mitsuda H. (1964) J. Biol. Chem., 239, 1388—1394.
27. Vajda T., Szabo T. (1973) Acta biochim. et biophys. Acad. scient. hung., 8, 9—22.
28. Wang S.-S., Carpenter F. H. (1968) J. Biol. Chem., 243, 3702—3710.
29. Уэбб Л. (1966) Ингибиторы ферментов и метаболизма, гл. 6, «Мир», М.
30. Bernhard S. A., Gutfreund H. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 1238—1243.
31. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. (1971) FEBS Lett., 15, 121—124.
32. Kasserra H. P., Laidler K. J. (1969) Can. J. Chem., 47, 4021—4029.
33. Mares-Guia M., Shaw E. (1965) J. Biol. Chem., 240, 1579—1585.
34. Kriger M., Kay L. M., Stroud R. M. (1974) J. Mol. Biol., 83, 209—230.
35. Roberts D. V., Elmore D. T. (1974) Biochem. J., 141, 545—554.
36. Seydoux F. (1970) Eur. J. Biochem., 17, 209—216.

Поступила в редакцию
26.I.1977

**THE NATURE OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF TRYPSIN.
ROLE OF SIDE-CHAIN POSITIVE CHARGE AND HYDROPHOBICITY
IN REACTIVITY OF SPECIFIC SUBSTRATES**

KLYOSOV A. A.

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A hypothesis has been proposed on the mechanism of trypsin action on specific substrates, i. e. derivatives of basic amino acids (lysine and arginine). It implies that (a) in the enzyme-substrate non-covalent complex the side chain binds with the active site pocket exclusively due to hydrophobic interactions, rather than electrostatically; (b) a «salt-bridge» between the cationic group of a substrate side chain, and anionic site of the enzyme active center is formed in the pre-transition state of the acylation step as a result of a conformational change; (c) the electrostatic interaction between the enzyme and substrate is preserved in the acyl-enzyme intermediate as well as in the transition state of the deacylation step, and is destroyed in the post-transition state of the deacylation. Such a model is in agreement both with the kinetic results and the pertinent X-ray data on the structure of enzyme-inhibitor complex. The energy of the electrostatic enzyme-substrate interaction is equal to 4.2 ± 0.8 kcal/mole, which means 100-1000-fold increase in the acylation rate.
