



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 * № 6 * 1980

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.15.04

СПЕЦИФИЧНОСТЬ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Антонов В. К.

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

На основе собственных и литературных данных проанализирована специфичность и механизм действия протеолитических ферментов. Роль вторичных фермент-субстратных взаимодействий трактуется в рамках двухстадийной схемы образования продуктивного комплекса. Предлагаемая схема объясняет наблюдаемые в эксперименте изменения кинетических параметров ферментативной реакции в тех случаях, когда специфичность фермента проявляется в максимальной скорости, и связывания субстрата или когда наблюдается принцип «лучшее связывание — лучший катализ». Показано, что изученные в настоящее время протеолитические ферменты можно разделить на две группы по механизму действия: ферменты, реагирующие с субстратом по нуклеофильному (ковалентному) механизму, и ферменты, осуществляющие общий основной катализ присоединения воды к гидролизуемой связи.

I. ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты — весьма обширный класс биокатализаторов, выполняющих в организме важнейшие функции. К последним относится не только катаболизм белков и пептидов, но и регуляция многих жизненных процессов (см. [1]). Такие процессы, как биосинтез белков, свертывание крови, иммунный ответ, оплодотворение, образование гормонов и регуляторных пептидов, осуществляются при участии протеаз различной специфичности и эффективности.

Число известных гидролаз, расщепляющих аминые связи в пептидах (КФ 3.4), линейных (КФ 3.5.1) и циклических (КФ 3.5.2) амидах, приведенных в последнем (1978 г.) списке комиссии по номенклатуре ферментов [2], превышает 200, и, несомненно, что на самом деле это число значительно больше. Современная классификация гидролаз, расщепляющих пептидные связи (протеиназы), учитывает особенности строения их активных центров и подразделяет эти ферменты на четыре основные группы (табл. 1) [3]. Внутри каждой группы можно обнаружить значительное сходство отдельных наиболее изученных ферментов в отношении их первичных и третичных структур. Так, например, гомология в последовательности аминокислот между сериновыми протеиназами поджелудочной железы и плазмы крови достигает 40—50% [4]. Столь же высокая гомология наблюдается для группы кислых протеиназ животных [5]. Структур-

* Использованные сокращения: OP4P — 3-(4-пиридил)пропи-1-окси-, Арт — γ-морфолидопроцламин, But — α-аминомасляная кислота, Mns — 6-(N-метиламино)-2-нафтилсульфонил-, Nva — иорвалин, Nle — иорлейцин.

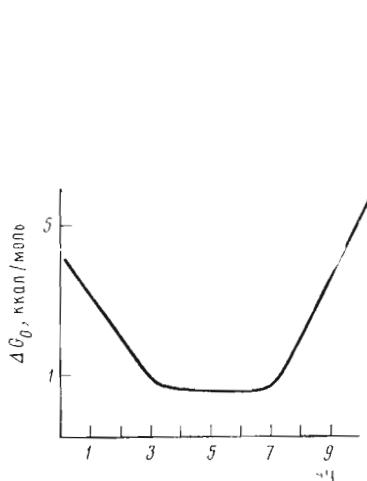


Рис. 1

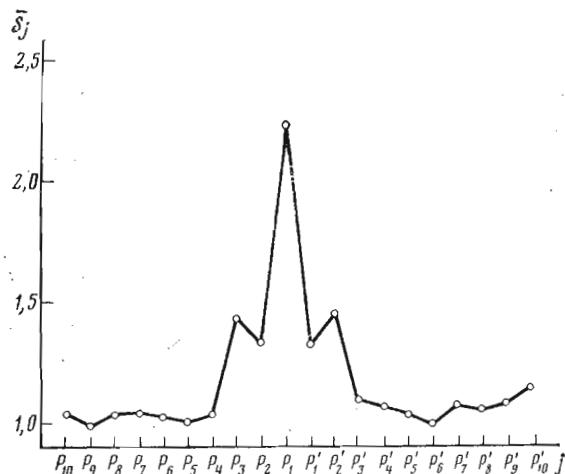


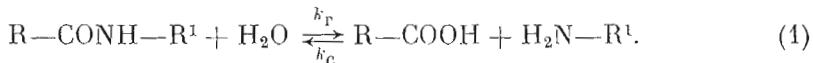
Рис. 2

Рис. 1. Зависимость стандартной свободной энергии гидролиза амидной связи от pH [8]

Рис. 2. Средние индексы специфичности аминокислотных остатков субстратов пептина в зависимости от положения остатка. $P_1, P_2 \dots P_n$ и $P'_1, P'_2 \dots P'_n$ — остатки в направлении соответственно к N- и C-концу от расщепляемой связи [20]

ная гомология между протеиназами животного и микробного происхождения существенно ниже, а иногда и полностью отсутствует [6].

Общим для всех этих ферментов является способность катализировать реакцию



Эта реакция, если не учитывать ионизацию продуктов, является эндоэргической в направлении гидролиза ($\Delta G_0 \approx 6$ ккал/моль) [7, 8]. Однако в реальных условиях ионизация продуктов вносит существенное изменение в суммарный энергетический эффект реакции, так что в определенном интервале pH (~4–7) изменение свободной энергии близко к нулю (рис. 1). Это справедливо для пептидов, не содержащих рядом с гидролизуемой связью свободных амино- или карбоксильных групп. Для незащищенного дипептида (например, аланилглицина) в расчете на ионизированные формы продуктов (pH 7) величина $\Delta G_0 \approx -4$ ккал/моль [9].

Скорости некатализируемого гидролиза и синтеза амидной связи чрезвычайно низки. Так, константа псевдопервого порядка гидролиза N-метиляцетамида (k_r) при 25°C составляет $\sim 3.5 \cdot 10^{-13}$ с⁻¹ (из работы [10] в пересчете на pH 7 и 25°C). Примерно такую же величину имеет в этих условиях константа скорости второго порядка (k_c) для синтеза амида (ср. [11]).

Протеолитические ферменты ускоряют гидролиз (и синтез) амидной связи, причем различные протеиназы ускоряют этот процесс в разной сте-

Таблица 1
Классификация протеолитических ферментов [3]

Группа	Классификационный номер [2]	Наиболее изученные представители
Сериновые протеиназы	3.4.21	α -Химотрипсин, трипсин, субтилизин, эластаза
Тиоловые протеиназы	3.4.22	Папапин, фицин
Кислые протеиназы	3.4.23	Пепсин, пенициллопепсин
Металлсодержащие протеиназы	3.4.24	Карбокспептидаза A, термализин

Таблица 2

Сравнительная активность некоторых протеиназ

Фермент	Субстрат	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	$k_{\text{кат}}/K_m, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$	Лит-ра	$k_{\text{нейферт}}, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$	Лит-ра	$k_{\text{нейферт}}/k_{\text{нейферт}}$
α-Химотрипсин	Ac-Ala-Ala-Tyr-Gly-NH ₂	10,3	1,87	$5,5 \cdot 10^3$	[12]	$k_{\text{OH}} 3,8 \cdot 10^{-5}$	[16]*	$1,4 \cdot 10^8$
Папапин	Z-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	8,9	2,9	$3,1 \cdot 10^3$	[13]	$k_{\text{SH}} 3 \cdot 10^{-5}$	[17]**	$1 \cdot 10^8$
Пепсин	Z-Ala-Ala-Phe-Phe-O ¹⁴ P	282	0,04	$7 \cdot 10^6$	[14]	$k_{\text{H}_2} 2,2 \cdot 10^{-4}$	[10]	$3,2 \cdot 10^{10}$
Карбоксипептидаза A	Z-Nva-Phe	290	0,069	$4,2 \cdot 10^6$	[15]	$k_{Zn^{2+}} 3 \cdot 10^{-6}$	[18]***	$1,4 \cdot 10^{12}$

* Для ацетиламида.

** Оценка на основании относительных скоростей реакции гидроксилиона и меркаптоэтанола с *n*-нитрофенилалатом.*** Оценка на основании относительных скоростей гидратации 2-пиридинальдегида в отсутствие и в присутствии Zn²⁺.

Таблица 3

Гидролиз пептида Z-Leu-Val-Phe(NO₂)-Ala-Apm кислыми протеиназами *

Фермент	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	$k_{\text{кат}}/K_m, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$	Относит. активность
Непсин	43	0,3	$1,43 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^4$
Химозин	$4,16 \cdot 10^{-2}$	0,25	46,4	4,2
Катепсин D	$6,6 \cdot 10^{-3}$	0,6	11	1

* Данные А. Г. Михайловой (лаборатория автора).

иени. При всей сложности и условности количественного сравнения эффективности протеиназ некоторое представление об этих различиях могут дать цифры, приведенные в табл. 2, в которой сравниваются константы скорости гидролиза лучших синтетических пептидных субстратов четырьмя протеиназами.

Протеолитические ферменты характеризуются не только разной эффективностью, но и разной специфичностью. Даже внутри одной группы протеиназ скорость гидролиза данного субстрата может отличаться на несколько порядков (табл. 3). Здесь, как и при сравнении эффективности разных ферментов, возникает проблема адекватного выбора субстрата для сравнения. Поэтому приведенные данные являются не более чем иллюстрацией. Ниже я вернусь к проблеме сопоставления эффективности и специфичности разных ферментов.

Приведенные выше же показывают, что протеолитические ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию гидролиза амидной связи, сильно различаются по своей эффективности и специфичности, что, очевидно, связано с различиями в их структуре и механизме действия. Возникает вопрос: как структура фермента связана с его механизмом действия и с проявляемой им специфичностью и эффективностью, т. е. что общее и что особенное есть в молекулярных механизмах катализа различными протеолитическими ферментами? Ниже я попытаюсь изложить современное состояние исследований этого вопроса.

II. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

1. Экспериментальные данные

Очевидно, что особенности каталитического действия отдельных протеиназ могут зависеть от: 1) структуры и конформации аминокислотных остатков (т. е. групп R и R¹ в схеме (1)) в субстратах, расщепляемых эти-

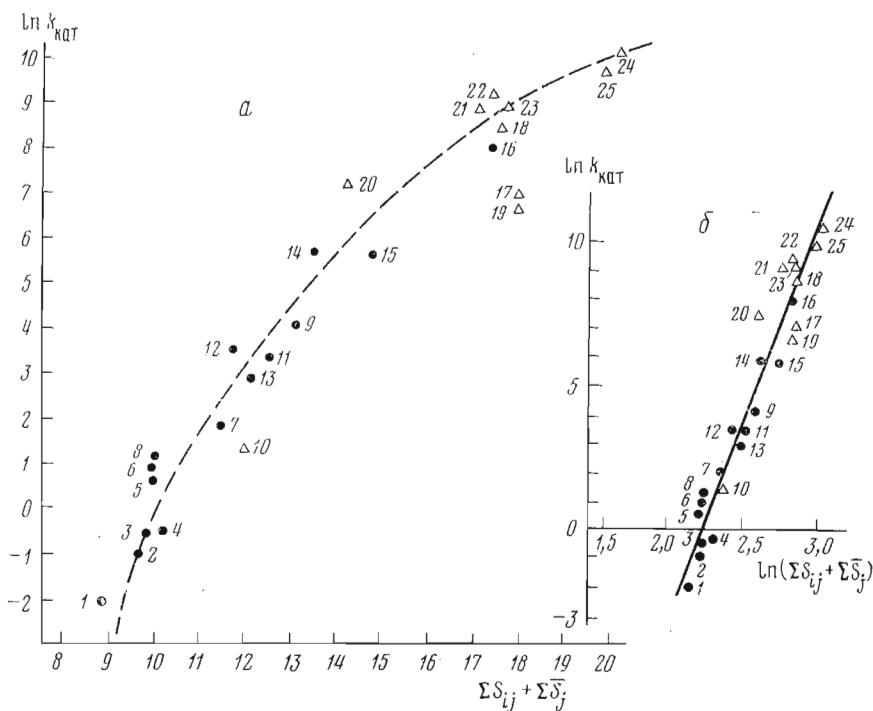


Рис. 3. Зависимость $k_{\text{кат}}$ от суммарного индекса специфичности для синтетических субстратов пепсина в полулогарифмических (α) и логарифмических (β) координатах. Треугольниками обозначены соединения, исследованные в работе [23], кружками — в работе [22], нумерация веществ соответствует приведенной в табл. 6

ми ферментами *in vivo*; 2) условий функционирования ферментов (рН и ионная сила среды, температура, вязкость и др.); 3) случайных, возникших в ходе эволюции различий в структуре каталитически важных участков ферментов. Действительно, различия, например, ренина и тромбина в первую очередь обусловлены типом субстратов (соответственно ангиотензиноген и фибриноген), химотрипсина и пепсина — в большей степени рН среды, а различия свиного пепсина и пепсина человека — скорее эволюционного характера. Оставляя в стороне третью причину возможных различий протеаз, рассмотрим подробнее первые две, имеющие прямое отношение к вопросам эффективности и специфичности ферментов и, следовательно, к механизмам катализа.

Достаточно полную информацию о влиянии структуры субстрата на его чувствительность к ферментативному гидролизу дает статистический анализ расщепления данным ферментом различных последовательностей в белках и пептидах. Этот подход был впервые использован в работе [19]. Детальный статистический анализ специфичности был проведен для пепсина [20]. Он позволил вычислить количественные параметры, так называемые индексы специфичности (S_{ij}), характеризующие вероятность нахождения данной аминокислоты (i) в данном положении j по отношению к расщепляемой связи гидролизуемого субстрата (см. табл. 4). Для каждого положения был вычислен средний индекс специфичности (\bar{S}_j), характеризующий отклонение от случайного распределения всех аминокислотных остатков в данном положении субстрата, т. е., иными словами, жесткость требований соответствующего участка активного центра пепсина к структуре боковой цепи аминокислот (рис. 2). Результаты анализа позволили установить, что: 1) протяженность связывающего субстрат участка активного центра пепсина соответствует 5–7 аминокислотным остаткам, что хорошо согласуется с известными из рентгеноструктурных дан-

Таблица 4

Значения индексов специфичности (S_{ij}) для некоторых наиболее предпочтительных и наиболее нежелательных аминокислотных остатков в положениях $P_3-P'_2$ субстратов пепсина [20] *

P_3	P_2	P_1	P'_1	P'_2
Ser +1,53	Asn +1,70	Leu +2,46	Trp +2,46	Arg +1,45
Pro +1,45	Glu +1,63	Phe +1,28	Tyr +1,52	Cys +1,42
Gly +1,45	Ala +1,36	Trp +1,67	Ile +1,40	Thr +1,36
Thr +1,34	Val +1,24	Glu +1,49	Phe +1,39	Ile +1,34
	Phe -1,43	Lys -3,48	Ser -1,37	
Phe -2,03	Pro -1,43	Cys -3,55	Pro -1,43	Asp -1,69
Met -2,16	Leu -1,58	Ile -5,25	Gly -1,82	Pro -1,89
Lys -2,90	Tyr -3,04	Arg -6,23	Thr -2,31	Phe -5,15

* Расщепляемая связь между остатками P_1 и P'_1 .

Таблица 5

Вероятность расщепления пептидных связей разными протеазами [24]

Фермент	Вероятность *	Фермент	Вероятность *
Химотрипсин	0,14	Эластаза	0,24
Пепсин	0,15	Папанин	0,26
Термолизин	0,18		

* Отношение числа расщепляемых амидных связей к общему числу амидных связей (6910) в последовательностях, рассмотренных в работе [24].

ных [21] размерами «щели» фермента, в которой расположены каталитически активные группы, 2) пепсин наиболее чувствителен к структуре аминокислоты в положении P_1 субстрата.

Дальнейшим шагом было установление корреляции между суммарными индексами специфичности и константами катализируемого пепсином гидролиза синтетических субстратов [22] (рис. 3). В логарифмических координатах эти корреляции могут быть описаны линейными уравнениями (2) и (3), позволяющими рассчитать величины $k_{\text{кат}}$ и $k_{\text{кат}}/K_m$ для любой последовательности аминокислот:

$$\ln k_{\text{кат}} = (13,75 \pm 0,67) \ln (\Sigma S_{ij} + \Sigma \bar{S}_j) - (31,34 \pm 1,75), \quad (2)$$

$$\ln (k_{\text{кат}}/K_m) = (16,13 \pm 1,08) \ln (\Sigma S_{ij} + \Sigma \bar{S}_j) - (36,77 \pm 2,82). \quad (3)$$

Целесообразно несколько подробнее остановиться на этих корреляциях. С моей точки зрения, они дают наиболее адекватную возможность сравнения специфичности и эффективности разных ферментов. Действительно, если определить специфичность фермента как его способность изменять скорость гидролиза субстрата при изменении структуры последнего, то эта способность может быть количественно описана на склоном графиков, подобных приведенным на рис. 3б. Фермент с «абсолютной» специфичностью будет характеризоваться графиком с большим склоном ($\tan \alpha \rightarrow \infty$), т. е. очень малые изменения в структуре субстрата будут приводить к очень большим изменениям в скорости гидролиза. Полностью неспецифический фермент будет иметь склон соответствующего графика близким к нулю. Другой подход к этой же проблеме может заключаться в определении вероятности расщепления, параметра вычисленного из данных статистического анализа для ряда ферментов в работе [24] (табл. 5).

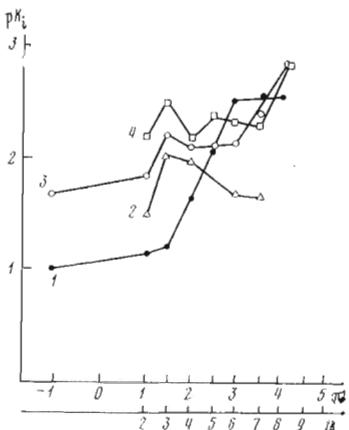


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость pK_i алкилборных кислот $H(CH_2)_nB(OH)_2$ от длины алкильной цепи (n) и ее гидрофобности (π) для α -химотрипсина (1) [26], внутриклеточной протеиназы *Bacillus subtilis* (2), мезентериопептидазы (3) [29] и субтилизина BPN' (4) [31]

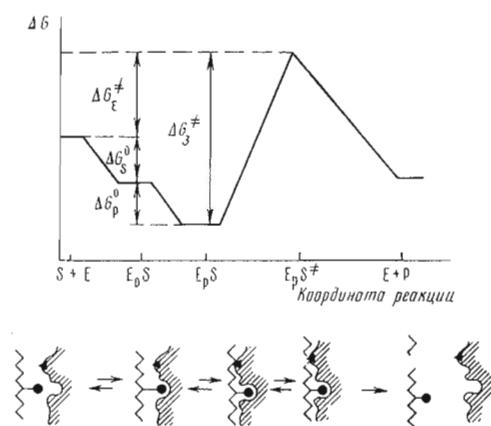


Рис. 5

Рис. 5. Схема связывания субстрата ферментом (фермент заштрихован) и соответствующая этой схеме диаграмма изменения свободной энергии по координате реакции при $K_p > 1$ (см. текст)

В соответствии с этими данными пепсин является одним из наиболее специфичных среди изученных таким способом ферментов.

Сравнительную эффективность ферментов можно характеризовать относительной скоростью расщепления субстратов, максимально быстро гидролизуемых данным ферментом (пределными значениями $k_{\text{кат}}$ или $k_{\text{кат}}/K_m$ на графиках типа рис. 3а). К сожалению, недостаток кинетических данных по гидролизу пептидных субстратов не позволяет пока провести такое сравнение. Тем не менее уже сейчас ясно, что структура удаленных от расщепляемой связи аминокислотных остатков субстрата (так называемая вторичная специфичность) играет важнейшую роль в катализе многими протеиназами.

Некоторые протеолитические ферменты, однако, значительно более чувствительны к структуре непосредственно примыкающего к гидролизуемой связи остатка (первичная специфичность), чем к удаленными от нее аминокислотам. Это видно хотя бы из сравнения таких ферментов, как трипсин и химотрипсин, и обусловлено конкретными структурными различиями в участке связывания остатка P_1 субстрата, т. е. в строении S_1 -локуса активного центра фермента. Сравнивать эти структурные различия сериновых протеиназ можно с помощью так называемых бифункциональных обратимых ингибиторов — алкилборных кислот [25—31]. Эти ингибиторы посредством остатка борной кислоты связываются с каталитическими группами фермента, а алкильная цепь, при достаточной ее длине, взаимодействует со связывающим субстрат участком. На рис. 4 приведены зависимости pK_i для ингибирования некоторых сериновых протеиназ алкилборными кислотами от длины алкильной цепи ингибитора. Видно, что по топографии S_1 -локуса ферменты типа субтилизина сильно отличаются от химотрипсина. Этот метод позволяет уточнять принадлежность данного фермента к тому или иному типу сериновых протеиназ.

Исследования кинетики гидролиза синтетических пептидов пепсином выявили интересную особенность, заключающуюся в том, что удлинение пептидной цепи субстратов очень сильно сказывается на величине $k_{\text{кат}}$ и мало влияет на величину K_m , характеризующую средство фермента к субстрату [22, 23]. В табл. 6 показано, что при переходе от ди- к тетрапепти-

Таблица 6

Кинетические константы катализируемого пепсином гидролиза пептидов

Номер	Субстрат *	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	$k_{\text{кат}}/K_m, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$
1	Z-Ala-Phe(NO ₂)-Apm	0,002	1,46	1,4
2	Z-Phe(NO ₂)-Ala-Apm	0,007	1,30	5,3
3	Z-Phe(NO ₂)-Val-Apm	0,010	0,78	12,8
4	Z-Leu-Phe(NO ₂)-Apm	0,011	0,73	14,6
5	Z-Phe(NO ₂)-Phe-Arg-OMe	0,034	0,92	36,8
6	Z-Phe-Phe(NO ₂)-Apm	0,034	0,88	38,8
7	Ac-Phe-Phe-Apm	0,402	2,37	43,0
8	Z-Phe(NO ₂)-Phe-Apm	0,052	0,74	70
9	Gly-Gly-Phe-Apm	0,950	3,9	245
10	Z-Gly-Pro-Phe-Phe-OP4P	0,056	0,14	400
11	Z-Asn-Phe(NO ₂)-Phe-Apm	0,450	0,84	538
12	Z-Val-Phe(NO ₂)-Ala-Apm	0,550	0,96	581
13	Z-Val-Phe(NO ₂)-Phe-Apm	0,316	0,17	1850
14	Ac-Phe(NO ₂)-Phe-Ala-Ala-OMe	5,21	0,85	6100
15	Z-Leu-Val-Phe(NO ₂)-Ala-Apm	4,30	0,59	7310
16	Z-Ala-Ala-Phe(NO ₂)-Phe-Apm	43,8	1,51	29000
17	Z-Gly-His-Phe-OP4P	15,8	0,44	35900
18	Z-Gly-Gly-Phe-Phe-OP4P	71,8	0,42	178500
19	Z-Gly-Ile-Phe-Phe-OP4P	12,6	0,07	180000
20	Z-Phe-Gly-Phe-OP4P	24,6	0,11	224500
21	Z-Gly-Leu-Phe-Phe-OP4P	134	0,03	446600
22	Z-Ala-Gly-Phe-Phe-OP4P	145	0,25	580000
23	Z-Phe-Gly-Gly-Phe-Phe-OP4P	127	0,13	976600
24	Z-Gly-Ala-Phe-Phe-OP4P	409	0,11	3718000
25	Z-Ala-Ala-Phe-Phe-OP4P	282	0,04	7050000

* Соединения 1—9, 11—16 — из работы [22], соединения 10, 17—25 — из работы [23].

Таблица 7

Кинетические параметры гидролиза субстратов, катализируемого Zn²⁺-карбоксипептидазой A [15]

Субстрат	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	$k_{\text{кат}}/K_m, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$	Субстрат	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	$k_{\text{кат}}/K_m, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$
Z-Gly-Phe	63	2,0	$3,15 \cdot 10^4$	Z-Nva-Phe	290	0,069	$4,2 \cdot 10^6$
Z-Ala-Phe	190	0,48	$3,95 \cdot 10^5$	Z-Nle-Phe	277	0,086	$3,2 \cdot 10^6$
Z-But-Phe	277	0,21	$1,32 \cdot 10^6$	Z-Leu-Phe	122	0,062	$1,97 \cdot 10^6$

дам величина $k_{\text{кат}}$ изменяется приблизительно в 10^5 раз, тогда как K_m — не более чем на порядок. Подобная ситуация отмечается и для ряда других протеиназ [32, 33]. Эти наблюдения трактовались [34, 35] как свидетельство того, что фермент обладает максимальным средством к субстрату, находящемуся не в основном состоянии в фермент-субстратном комплексе, а в переходном. Предполагается, что при связывании субстрата ферментом либо возникают напряжения, либо в комплексе Михаэлиса реализуются далеко не все возможные взаимодействия фермента и субстрата. В переходном состоянии напряжения снимаются или же возникают новые связи фермента и субстрата и освобождающаяся энергия расходуется на понижение активационного барьера реакции.

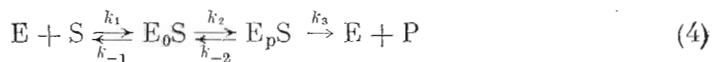
Однако во многих случаях наблюдаются иные, чем для пепсина, соотношения $k_{\text{кат}}$ и K_m . Так, для α -химотрипсина, по крайней мере при использовании в качестве субстратов эфиров ациламиноокислот, соблюдается известный принцип [36] «лучшее связывание — лучший катализ», а для карбоксипептидазы A изменения в структуре субстратов приводят к сниже-

нию величины K_m при практически постоянном значении $k_{\text{кат}}$ (табл. 7) [15]. Таким образом, специфичность фермента может проявляться на разных стадиях процесса превращения субстрата в продукты и приведенная выше концепция в каждом случае требует конкретизации.

2. Вторичные взаимодействия и специфичность протеаз (гипотеза ступенчатого связывания)

Попытаться с едипых позиций понять проявления специфичности протеолитических ферментов в наблюдаемых кинетических параметрах катализитического процесса можно, если предположить, что процесс комплексообразования фермента с субстратом является по крайней мере двухстадийным (рис. 5). На первой стадии происходит «заякоривание» субстрата (E_0S) по наиболее специфичному его участку, т. е. проявляется первичная специфичность фермента. На второй стадии реализуются все возможные взаимодействия между компонентами реакции (вторичная специфичность), что приводит к образованию продуктивного фермент-субстратного комплекса (E_pS). При этом система ступенчато теряет спачала трансляционные, а затем и вращательные степени свободы. В продуктивном комплексе фермент стабилизирует наиболее реакционноспособную форму субстрата *, т. е. на этой стадии создаются все условия для оптимального протекания последующей химической стадии реакции [38].

В этом случае для кинетической схемы процесса



начальная скорость образования продукта (при $k_{-1} \gg k_3$) будет равна (ср. [39])

$$V = \frac{k_3 K_p [E]_0 [S]_0}{K_s + (1 + K_p) [S]_0}, \quad (5)$$

где

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}, \quad \text{а} \quad K_p = \frac{k_2}{k_{-2} + k_3}.$$

Наблюдаемые в эксперименте кинетические константы

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_3 K_p}{1 + K_p} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3}, \quad (6)$$

$$K_m(\text{как}) = \frac{K_s}{1 + K_p} = K_s \frac{k_{-2} + k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3}, \quad (7)$$

$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_m(\text{как})} = \frac{k_3 K_p}{K_s} = \frac{k_2 k_3}{K_s (k_{-2} + k_3)} \quad (8)$$

оказываются, таким образом, эффективными величинами, причем константа скорости химической трансформации продуктивного комплекса $k_3 \geq k_{\text{кат}}$. В табл. 8 приведены выражения для экспериментальных кинетических параметров при разных соотношениях констант индивидуальных стадий K_p , k_{-2} и k_3 . В зависимости от соотношения этих величин наблюдаемое значение $k_{\text{кат}}$ может соответствовать константе скорости разных стадий или их комбинациям. Рассмотрим в рамках этой схемы данные о катализитических свойствах представителей четырех основных групп про-

* Более подробно идея стабилизации ферментом «активной» формы субстрата и вытекающие из нее следствия, объясняющие эффективность ферментов, изложены в работе [37].

Таблица 8

Значения наблюдаемых кинетических параметров при различном соотношении констант индивидуальных стадий

Вариант	K_p	k_3	$k_{\text{кат}}$	$K_m(\text{каж})$	$k_{\text{кат}}/K_m(\text{каж})$
1	≤ 1	$\leq k_{-2}$	$k_3 \cdot k_2/k_{-2}$	K_s	$k_3 k_2/K_s k_{-2}$
2	≤ 1	$\geq k_{-2}$	k_2	K_s	k_2/K_s
3	≥ 1	$\leq k_{-2}$	k_3	$K_s \cdot \frac{k_{-2}}{k_2}$	$k_3 k_2/K_s k_{-2}$
4	≥ 1	$\geq k_{-2}$	k_3	$K_s \cdot \frac{k_3}{k_2}$	k_2/K_s

Таблица 9

Влияние структурных изменений субстрата на кинетические и термодинамические параметры катализируемого α -химотрипсином гидролиза (по данным [41])

Номер	Субстрат	K_A, M	ΔG_s^{\ddagger} , ккал/моль	k_a, s^{-1}	$\Delta G_2^{\ddagger},$ ккал/моль	Суммарное изменение ΔG
I	$\text{CH}_3\text{COOCH}_3$	0,4	-0,55	0,01	20,3	$I \rightarrow II -5,5$
II	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	$3 \cdot 10^{-3}$	-3,5	0,67	17,8	$I \rightarrow III -1,2$
III	HCHCOOCH_3^* NHCOCH_3	3,4	+0,52	0,49	18,0	$II \rightarrow IV -3,6$
IV	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$ NHCOCH_3	$7,6 \cdot 10^{-3}$	-2,93	796	13,6	$III \rightarrow IV -7,8$

* Данные [42].

теолитических ферментов — химотрипсина, папаина, лепсина и карбоксипептидазы A.

α -Химотрипсин. Несмотря на обилие данных по специфичности этого фермента, сведения о кинетике катализируемого им гидролиза пептидов весьма ограничены. В ряду эфиров ациламиноислот наблюдается линейная зависимость между константами скорости ацилирования фермента (k_a) и константами ассоциации фермента и субстрата (K_A).*. Последние, в свою очередь, пропорциональны степени гидрофобности боковой цепи [40]. Таким образом, для этих субстратов соблюдается принцип «лучшее связывание — лучший катализ».

Чтобы понять связь структуры субстрата с его способностью расщепляться α -химотрипсином, рассмотрим роль отдельных структурных элементов производного ациламиноислоты. В табл. 9 приведено сравнение кинетических констант ацилирования α -химотрипсина четырьмя субстратами. Как видно, замена атома водорода на бензильную группу при отсутствии ациламиногруппы (соединения I→II) приводит к резкому улучшению связывания и сравнительно небольшому увеличению скорости ацилирования. Суммарное изменение свободной энергии составляет в этом случае около -5,5 ккал/моль. Если же аналогичную замену проводить при наличии N-ациламиногруппы (соединения III→IV), то суммарное изменение свободной энергии составит -7,8 ккал/моль. Следовательно, наличие N-ациламиногруппы способствует более эффективному взаимодействию

* Чтобы не смешивать эти константы с приведенными на схеме (4), они обозначены как k_a и K_A вместо обычно употребляемых обозначений k_2 и K_s .

вию бензильной группы с ферментом. С другой стороны, введение N-ациламиногруппы в соединения, не содержащие бензильной группы ($I \rightarrow III$), приводит к очень небольшому изменению суммарной свободной энергии ($-1,2$ ккал/моль), тогда как в случае соединений ($II \rightarrow IV$), содержащих $C_6H_5CH_2$ -группу, такая замена дает выигрыш в $-3,6$ ккал/моль.

Таким образом, обе группы вносят вклад в суммарное изменение свободной энергии, причем эти изменения взаимозависимы. Характерно, что введение N-ациламиногруппы не только не улучшает связывание субстрата с ферментом, но даже ухудшает его. Вся энергия взаимодействия этой группы с ферментом, по-видимому, расходуется на понижение активационного барьера, причем ее величина зависит от структуры боковой цепи субстрата.

В рамках рассмотренной выше двухстадийной схемы комплексообразования можно представить себе, что первое взаимодействие осуществляется боковой цепью субстрата, причем это взаимодействие реализуется не полностью. Далее происходит образование продуктивного комплекса за счет возникновения водородной связи между протоном ациламиногруппы и карбонильным кислородом Ser-214 [43]. Эта связь тем прочнее, чем эффективнее взаимодействие с ферментом боковой цепи субстрата. В свою очередь, боковая цепь прочнее связывается в активном центре при возникновении такой водородной связи. Происходит как бы взаимная подстройка субстрата и фермента. Максимальное отношение величин K_p для эфира гидрокоричной кислоты и Ac-Phe-OMe можно оценить примерно в $2,5 \cdot 10^3$, если всю разницу в суммарном изменении свободной энергии при введении N-ациламиногруппы ($-3,6$ ккал/моль) отнести за счет изменения положения равновесия $E_0S \rightleftharpoons E_pS$. При этом K_p для Ac-Phe-OMe не должно сильно отличаться от единицы. Следует отметить, что, по данным Березина и сотр. [44], изменение свободной энергии за счет введения N-ациламиногруппы имеет энтропийную природу, т. е. фермент служит как бы энтропийной ловушкой для этой группы.

Таким образом, принцип «лучшее связывание — лучший катализ» реализуется для субстратов α -химотрипсина (производных N-ациламинокислот) за счет влияния первой стадии процесса (образование комплекса E_0S) на эффективность прохождения второй стадии (образование продуктивного комплекса E_pS). Кинетически это отвечает случаям 1 или 2 в табл. 8.

Еще один структурный элемент субстрата — уходящая группа. Показано, что для так называемых полуспецифических субстратов, т. е. субстратов с неаминокислотной уходящей группой, скорость гидролиза α -химотрипсином (в терминах $k_{\text{кат}}/K_m$) пропорциональна изменению стандартной свободной энергии гидролитической реакции (рис. 6) [45]. Это означает, что уходящие группы такого типа не вносят никакого вклада в катализ за счет взаимодействия с ферментом. На рис. 7 представлен график изменения свободной энергии системы по координате реакции для серии производных *n*-нитрофенилаланина. Видно, что все полуспецифические субстраты, включая даже Ac-Phe(NO_2)-Gly-NH₂, имеют очень близкий уровень свободной энергии переходного состояния.

Разница в $k_{\text{кат}}$ (и $k_{\text{кат}}/K_m$) обусловлена здесь различием в энергиях основного состояния, тогда как в переходном состоянии, если и возникают дополнительные взаимодействия субстрата с ферментом, они одинаковы для всех этих субстратов. Таким взаимодействием может быть образование H-связи карбонильного кислорода субстрата с NH-группами пептидных связей Ser-195 и Gly-193 фермента [43]. Введение в Ac-Phe(NO_2)-Gly-NH₂ метильной группы, т. е. переход к Ac-Phe(NO_2)-Ala-NH₂, понижает свободную энергию активации на 3 ккал/моль. Исследование структуры комплекса химотрипсина с трипсиновым панкреатическим ингибитором в кристалле [46] позволили заключить, что метильная группа остатка аланина в положении P_1' субстрата (и ингибитора) образует

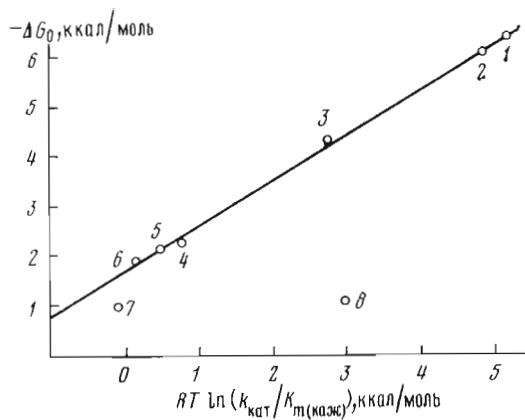


Рис. 6. Корреляция стандартной свободной энергии гидролиза и константы скорости второго порядка катализируемого α -химотрипсином гидролиза «полуспецифических» субстратов Ac-Phe(NO₂)-X [45]. 1 — X=OEt, 2 — OMe, 3 — NHC₆H₄NO₂-n, 4 — NHC₆H₅, 5 — NH₂, 6 — NH-NH₂, 7 — Gly-NH₂, 8 — Ala-NH₂

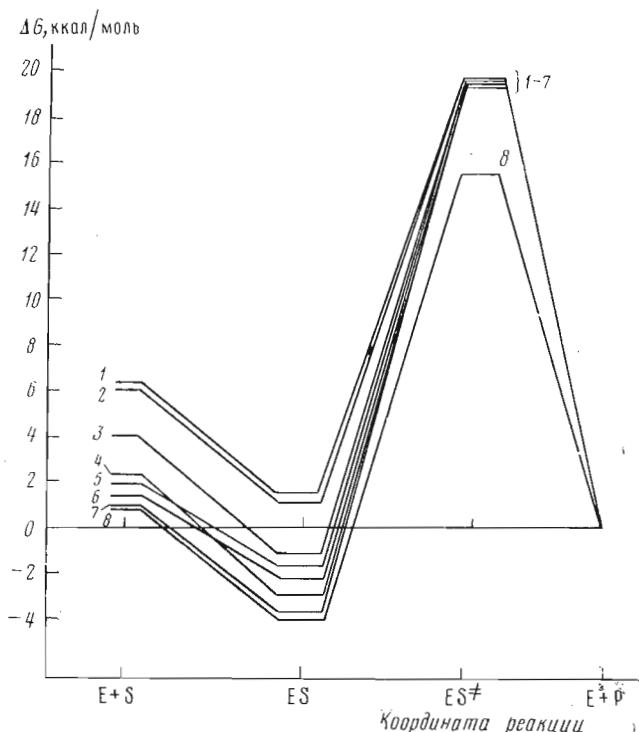


Рис. 7. Изменение свободной энергии по координате реакции для «полуспецифических» субстратов α -химотрипсина. Обозначения те же, что и на рис. 6

благоприятные для катализа контакты с Cys-42 и His-57 фермента, но неблагоприятный контакт с гидроксильной группой Ser-195. Предполагается, что эти контакты приводят к напряжениям в основном состоянии, которые снимаются в переходном состоянии за счет поворота боковой цепи Ser-195 вокруг связи C_α—C_β в положение, характерное для образования ацилфермента. Однако, как показали данные конформационного анализа [47], этот поворот осуществляется очень легко уже при связывании суб-

Таблица 10

Кинетические константы катализируемого α -химотрипсином гидролиза пептидных субстратов [12, 48]

№ п.п.	Субстрат	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	$k_{\text{кат}}/K_m, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$
1	Ac-Phe-NH ₂	0,06	31	2
2	Ac-Phe-Gly-NH ₂	0,14	15	10
3	Ac-Phe-Ala-NH ₂	2,8	25	114
4	Ac-Ala-Phe-Gly-NH ₂	0,355	23,2	15,3
5	Ac-Pro-Phe-Gly-NH ₂	0,765	14,9	54,3
6	Ac-Tyr-NH ₂	0,17	32	5
7	Ac-Tyr-Gly-NH ₂	0,64	23	28
8	Ac-Tyr-Ala-NH ₂	7,5	17	440
9	Ac-Gly-Tyr-Gly-NH ₂	0,48	7,8	128
10	Ac-Ala-Tyr-Gly-NH ₂	1,41	29,1	48,5
11	Ac-Val-Tyr-Gly-NH ₂	2,8	14,7	190,5
12	Ac-Pro-Tyr-Gly-NH ₂	4,4	31,5	31,7
13	Ac-Ala-Ala-Tyr-Gly-NH ₂	10,3	1,87	5508

Таблица 11

Кинетические параметры гидролиза пептидов, катализируемого папанином [51, 52]

Субстрат	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	$k_{\text{кат}}/K_m, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$
Z-Gly-Gly-NH ₂	0,08	6,4	13
Z-Gly-Asn-NH ₂	0,08	9,3	8,6
Z-Gly-Gln-NH ₂	0,06	5,7	10,5
Z-Gly-Val-NH ₂	0,39	3,6	107
Z-Gly-Leu-NH ₂	1,29	1,95	660
Z-Gly-Trp-NH ₂	0,73	0,9	815
Z-Val-Glu-Leu-Gly	1,4	4,7	298
Z-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	8,9	2,9	3070
Z-Gly-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	3,4	2,4	1416
Moc-Gly-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	1,4	3,9	359
Moc-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	7,9	4,3	1840
Gly-Val-Glu-Leu-Gly	0,07	1,5	46,6
Gly-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	0,7	2,2	318
Mns-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	0,4	0,5	800
Mns-Gly-Gly-Val-Glu-Leu-Gly	4,3	0,46	9348

страта за счет вытеснения молекулы воды, причем «продуктивное» положение Ser-195 становится в комплексе энергетически наиболее выгодным. Таким образом, по моему мнению (см. также [47]), нет оснований постулировать напряжения в основном состоянии фермент-субстратного комплекса. Скорее всего при образовании продуктивного комплекса взаимодействие метильной группы с Cys-42 и His-57 способствует его стабилизации и тем самым понижает активационный барьер реакции. Иными словами, величина K_p пептида, содержащего эланин, больше, чем K_p глицинового пептида.

Хотя данные по кинетике катализируемого α -химотрипсином гидролиза пептидов весьма скучны, все же и в этом случае можно отметить некоторые закономерности. Из данных, приведенных в табл. 10 [12, 48], видно, что вторичные взаимодействия играют меньшую роль в катализе α -химотрипсином, чем, например, в случае пепсина (ср. табл. 6).

Анализ зависимости $k_{\text{кат}}$ от K_m показывает (рис. 8), что она удовлетворительно согласуется с зависимостью, предсказываемой на основании двухстадийной схемы: для медленно расщепляемых, относительно коротких пептидов K_m — практически постоянная величина ($K_p \ll 1$), тогда как при увеличении длины пептида увеличение $k_{\text{кат}}$ сопровождается понижением K_m (K_p становится больше единицы).

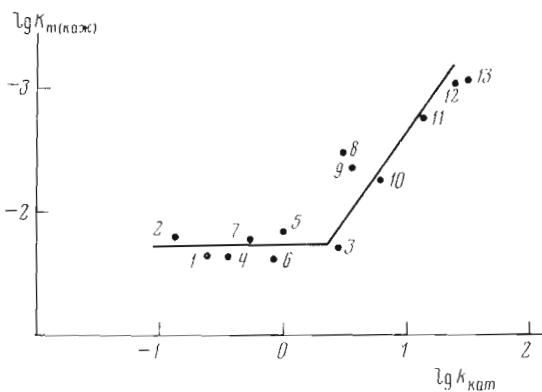


Рис. 8

Рис. 8. Зависимость $\lg K_m(\text{каж})$ от $\lg k_{\text{кат}}$ для субстратов α -химотрипсина. Номера соединений 1—5 соответствуют приведенным в табл. 10. Соед. 6 — Ac-Pro-Phe-NH₂, 7 — Ac-Pro-Ala-Phe-NH₂, 8 — Ac-Ala-Pro-Phe-NH₂, 9 — Ac-Pro-Ala-Pro-Phe-NH₂, 10 — Ac-Pro-Ala-Pro-Phe-Gly-NH₂, 11 — Ac-Pro-Ala-Pro-Phe-Ala-NH₂, 12 — Ac-Pro-Ala-Pro-Phe-Ala-Ala-NH₂, 13 — Ac-Pro-Ala-Pro-Phe-Ala-Ala-NH₂.
Данные из работ [12, 33]

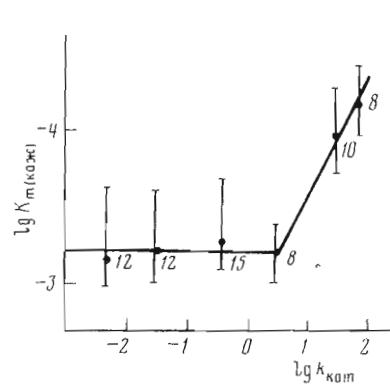


Рис. 9

Рис. 9. Зависимость $\lg K_m(\text{каж})$ от $\lg k_{\text{кат}}$ для субстратов пепсина. Точки показывают среднее значение $\lg \bar{K}_m(\text{каж})$ при среднем (в каждом десятичном интервале величин $k_{\text{кат}}$) значениях $\lg k_{\text{кат}}$. Прямые дают разброс значений $\lg K_m(\text{каж})$. Цифры — число субстратов. Данные из работ [22, 23, 54]

Папаин. Этот фермент довольно близок химотрипсину по своей специфичности, однако лишен столь выраженной предпочтительности к остаткам ароматических аминокислот в положении P_1 субстрата. Например, остаток фенилаланина связывается ферментом, как правило, в локусе S_2 , а не S_1 , как у химотрипсина [49, 50]. В табл. 11 приведены кинетические параметры гидролиза ряда пептидов, катализируемого папаином. Видно, что, как и в случае α -химотрипсина, вариации в $k_{\text{кат}}$ не очень велики, но все же больше, чем изменения K_m . Таким образом, и в этом случае вторичные взаимодействия фермента с субстратом могут играть значительную роль в использовании энергии связывания для понижения активационного барьера реакции. Действительно, Фрутон и сотр. [53] недавно показали, что связывание субстратов папаином — двухстадийный процесс, причем сгущней, лимитирующей скорость, является распад продуктивного комплекса. Иначе говоря, равновесие в системе $E_0S \rightleftharpoons E_pS$ сдвинуто для этих субстратов в сторону продуктивного комплекса ($K_p > 1$). Были получены подтверждения того, что образование продуктивного комплекса сопровождается конформационным изменением белка.

Пепсин. Как уже указывалось выше, пепсин наиболее специфичен в отношении структуры аминокислотного остатка в положении P_1 субстрата. Разумно предположить, что именно этот остаток «заякоривается» при образовании первого (E_0S) комплекса (рис. 5). Наблюданная независимость величины $K_m(\text{каж})$ в ряду синтетических субстратов (табл. 6) может быть обусловлена тем, что для этих субстратов пепсина $K_p < 1$ (случай 1 в табл. 8). Тогда наблюдаемые величины $k_{\text{кат}} = k_3 K_p$ и $K_m(\text{каж}) = K_s$. Так как для большинства исследованных субстратов остаток в P_1 или один и тот же, или близкий по структуре, очевидно, что для всех субстратов как значения K_s , характеризующие стадию образования E_0S , так и значения $K_m(\text{каж})$ будут одинаковыми. Значения $k_{\text{кат}}$ будут тем больше, чем большие K_p (чем выше k_3). Такое положение должно сохраняться до тех пор, пока $K_p < 1$, после чего $k_{\text{кат}}$ станет постоянной величиной (равной k_3 или k_2 в зависимости от соотношения k_3 и k_{-2}), а $K_m(\text{каж})$ будет уменьшаться. Действительно, как видно из рис. 9,

Таблица 12

Термодинамические параметры связывания и гидролиза пептидов пепсином [22]

Субстрат	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0 , энтр. ед.	ΔG^\ddagger	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger , энтр. ед.
	ккал/моль	ккал/моль	ккал/моль	ккал/моль	ккал/моль	ккал/моль
Z-Phe(NO ₂)-Phe-Apm	-4,25	0,6	16,3	19,5	7,8	-39,3
Z-Val-Phe(NO ₂)-Ala-Apm	-4,15	1,2	18,0	18,0	6,1	-40,0
Z-Leu-Val-Phe(NO ₂)-Ala-Apm	-4,35	1,9	21,0	16,7	5,4	-44,6

Таблица 13

Связывание α -химотрипсином борной кислоты и арилалкилборных кислот R-B(OH)₂ [28]

R	\bar{K}_1 , М ⁻¹	$-\Delta G_0$	$-\Delta G^*_{\text{S}}$	$\Delta \Delta G^{**}$
		ккал/моль	ккал/моль	ккал/моль
HO	10	1,4		
C ₆ H ₅	780	4,0	3,0	+0,4
C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂	10950	5,6	4,2	0
C ₆ H ₅ (CH ₂) ₃	5200	5,1	4,8	+1,1
C ₆ H ₅ (CH ₂) ₄	3300	4,85	5,1	+2,0

* Изменение свободной энергии при переносе остатка из воды в октанол [68].
** $\Delta \Delta G := \Delta G_0 - (\Delta G_S + \Delta G_0[H_3BO_3])$.

существует заметная тенденция уменьшения $K_{m(\text{ката})}$ при увеличении $k_{\text{кат}}$ сверх некоторой предельной величины ($\sim 10 \text{ с}^{-1}$). Следует подчеркнуть, что $k_{\text{кат}} \leq k_3$, т. е. величина константы скорости химического превращения (k_3) может быть существенно выше наблюдаемой в эксперименте кинетической константы.

Как показали термодинамические исследования гидролиза субстратов пепсина, различающихся длиной полипептидной цепи, удаленные от расположимаемой связи остатки вносят вклад главным образом в понижение энталпии активации (табл. 12) [22]. Ясно, что, измеряя температурную зависимость $k_{\text{кат}}$, мы фактически (при $K_p < 1$) измеряем зависимость от температуры констант k_3 , k_2 или k_{-2} , т. е. наблюдаемое изменение энталпии активации может быть на самом деле изменением энталпии при образовании продуктивного комплекса (E_pS).

Аналогичное явление может наблюдаться и при изучении рН-зависимости $k_{\text{кат}}$. Действительно, для разных субстратов пепсина в комплексах с ферментом наблюдались различающиеся значения констант ионизации катализитических групп фермента [54]. Это становится понятным, если предположить, что для разных субстратов вклад индивидуальных констант в наблюдаемую величину $k_{\text{кат}}$ различен.

Наконец, следует указать на наблюдавшуюся Фрутоном и сотр. [55] разницу стационарных и предстационарных кинетических констант гидролиза длинноцепочечных пептидов. В отличие от медленно гидролизуемых субстратов быстро расщепляемые субстраты пепсина имеют разные значения константы скорости гидролиза, регистрируемые по скорости появления свободной аминогруппы и по изменению флуоресценции субстрата. Это различие может быть связано с разным соотношением констант k_{-2} и k_3 в схеме (4).

Карбоксипептидаза A. Особенностью этой протеиназы является то, что здесь первичное взаимодействие реализуется по остатку P'_1 , т. е. остатку С-концевой аминокислоты, образующей расщепляемую связь своей аминогруппой. Вариации в структуре остатка P'_1 в ряду от Gly до Nle приводят

к некоторому росту величины $k_{\text{кат}}$, которая быстро достигает постоянного значения, и к систематическому уменьшению величины K_m (см. табл. 7 [45]). Этот случай очень хорошо укладывается в схему двухстадийного образования продуктивного комплекса при условии $K_p > 1$ (случай 3, табл. 8).

Для этого фермента, как и для папаина, были получены прямые доказательства двухстадийного образования фермент-субстратного комплекса [56]. Было также обнаружено двухстадийное отщепление продуктов реакции, т. е. было показано, что кинетическая схема симметрична относительно центральной стадии химического превращения субстрата (см. табл. 14):

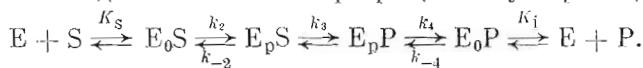


Таблица 14

Кинетические параметры гидролиза Gly-Phe, катализируемого карбоксипентидазой по схеме [56]

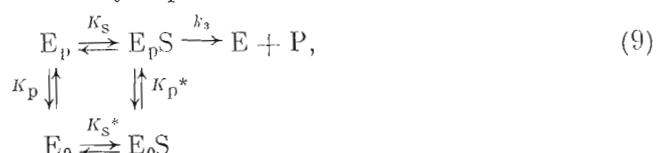
K_S	k_2	k_{-2}	k_3	k_4	k_{-4}	K_i
21 мМ	3250 с ⁻¹	1000 с ⁻¹	0,01 с ⁻¹	1750 с ⁻¹	1160 с ⁻¹	10 мМ

Двухстадийная схема была также доказана для рибонуклеазы А [57], НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы [58], аминоацил-тРНК-синтетазы [59] и ряда других ферментов [60–65].

Таким образом, стадийное образование продуктивного фермент-субстратного комплекса, по-видимому, общее для ферментативного катализа явление. Очевидно, именно с ним связаны различные проявления специфичности протеолитических ферментов в наблюдаемых кинетических константах ($k_{\text{кат}}$ или K_m). Сами эти константы во многих случаях — эффективные величины. Для протеиназ (и возможно, для многих других ферментов) разным стадиям связывания соответствуют разные уровни специфичности: первичная специфичность реализуется на первой стадии «узнавания» субстрата ферментом, причем здесь, по-видимому, реализуются неспецифические взаимодействия, такие, которые мало зависят от направления связи (гидрофобные, электростатические и т. п.). На второй стадии проявляется вторичная специфичность и реализуется топохимическое соответствие субстрата активному центру фермента. Именно эта стадия определяет эффективность последующей химической стадии процесса. В основном состоянии продуктивного комплекса структура субстрата максимально близка структуре переходного состояния.

Согласно представлениям, развитым в работе [37], фермент стабилизирует наиболее реакционноспособную форму субстрата и эффективность катализа определяется энергией такой стабилизации. Некоторые возможные механизмы стабилизации будут рассмотрены ниже.

Следует отметить, что в рамках существующих теорий ферментативного катализа трудно объяснить различные проявления специфичности ферментов в кинетических константах. Так, например, формально близкие изложенным здесь представления Кошланда об индуцированном соответствии фермента и субстрата [66] не согласуются с проявлением специфичности в максимальных скоростях реакции. Согласно Кошланду, активный фермент (E_p) существует в равновесии с неактивной формой (E_0), каждая из которых способна связывать субстрат:



где $K_p = [E_p] / [E_0]$ и $K_p^* = [E_pS] / [E_0S]$.

В этом случае наблюдаемые кинетические параметры

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_3 K_p^*}{1 + K_p^*} \quad \text{и} \quad K_{m(\text{каж})} = K_s \frac{K_p^*(1 + K_p)}{K_p(1 + K_p^*)}.$$

Как и в рассмотренном выше случае (1, табл. 8), $k_{\text{кат}}$ будет изменяться при $K_p^* < 1$ до тех пор, пока это неравенство сохраняется. При этом значение $K_{m(\text{каж})}$ будет увеличиваться с увеличением K_p^* и стремиться к $K_{m(\text{каж})} = K_s(1 + K_p) / K_p$. Хотя K_p не зависит от структуры субстрата и должно быть постоянным для каждого фермента в данных условиях, величина K_s всегда является переменной, поскольку она отражает связывание *всего* субстрата, а не постоянной для ряда субстратов части. Следовательно, в рамках этой схемы связывание субстратов будет меняться с изменением их структуры.

3. Аналоги переходного состояния

В свете изложенных выше данных мы представляем правильным рассматривать так называемые аналоги переходного состояния [67] скорее как аналоги состояния субстрата в продуктивном фермент-субстратном комплексе или в некоторых случаях как аналоги промежуточных соединений ферментативной реакции. Как видно из данных табл. 13 [28], для наиболее близкого субстрату аналого — фенилэтилборной кислоты вклад алкильной цепи и остатка борной кислоты аддитивен и в точности соответствует наблюдаемому изменению свободной энергии связывания. Для других фенилалкилборных кислот связывающая способность используется не полностью, что указывает на неполное соответствие их связывающему участку фермента. Если теперь сравнить величины ΔG_0 фенилэтилборной кислоты и эфира гидрокоричной кислоты (см. табл. 9), то связывание в первом случае оказывается на $\sim 2,1$ ккал/моль более эффективным, чем во втором. Эту разницу можно приписать изменению свободной энергии системы α -химотрипсии — эфир гидрокоричной кислоты при образовании продуктивного комплекса. В таком случае суммарное изменение свободной энергии при связывании этого субстрата ($\Delta G_s + \Delta G_p$) будет $-5,6$ ккал/моль. Очевидно, это приблизительно та величина, которая может быть использована в катализе для понижения активационного барьера сравнительно с конгруэнтной неферментативной реакцией. Отношение величин $k_{\text{кат}} / K_{m(\text{каж})}$ ($220 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$) химотрипсинового гидролиза метилового эфира гидрокоричной кислоты и $k_{\text{он}}$ ($1,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [16]) для его щелочного гидролиза составляет $1,8 \cdot 10^4$. Это соответствует изменению свободной энергии в $5,88$ ккал/моль. Как видно, эта величина удовлетворительно совпадает с величиной, рассчитанной из суммарного изменения свободной энергии. Таким образом, если различие в энергии связывания субстрата и соответствующего ему «аналога переходного состояния» приписать образованию продуктивного комплекса, то суммарное изменение свободной энергии, по крайней мере в рассмотренном случае, удовлетворительно согласуется с наблюдавшейся эффективностью ферментативного катализа.

4. Конформационная специфичность и непродуктивное связывание

Помимо структуры аминокислотных остатков субстрата важное значение при сопоставлении специфичности ферментов может играть конформация и конформационная подвижность субстрата. Действительно, если две формы субстрата находятся в равновесии:



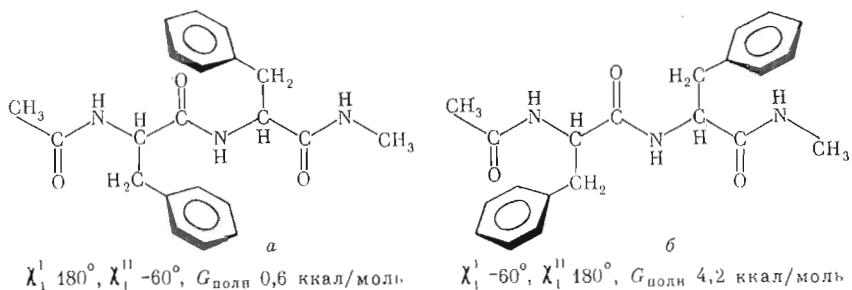


Рис. 10. Конформации Ac-Phe-Phe-NHMe по работе [69]

где $K = [S_2] / [S_1]$, а фермент связывает и превращает лишь одну форму, например S_2 :



то скорость реакции (при $k_2 \ll k_{-1}$) выразится как

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_s \frac{1+K}{K} + [S]_0},$$

где $[S]_0$ — полная концентрация всех форм субстрата. Таким образом, наблюдаемое значение $K_{m(\text{каж})} = K_s \frac{1+K}{K}$ будет тем больше, чем сильнее равновесие сдвинуто в сторону негидролизуемой формы, и наличие конформационного равновесия будет влиять на связывание ($K_{m(\text{каж})}$), а не на катализ (k_2).

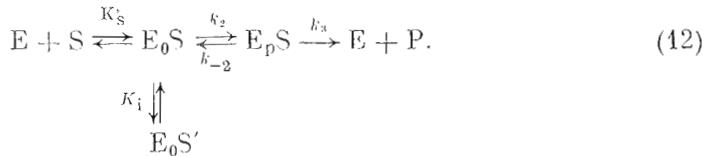
Отсюда следует, что значение $K_{m(\text{каж})}$ субстратов, имеющих в растворе преимущественно негидролизуемую конформацию, должно сильно отличаться от этой величины для субстратов, имеющих нужную конформацию. Было показано [69], что субстраты пепсина — пептиды типа А-Phe-Phe-В (где А и В — Ас, NHMe или аминокислоты) имеют в растворе конформацию, представленную на рис. 10а, стабилизированную взаимодействием двух ароматических остатков с пептидной связью и между собой. В этой конформации расщепляемая связь окрашена ароматическими группами. Судя по данным рентгеноструктурного анализа пепсина [70], такие соединения должны связываться в форме, показанной на рис. 10б. Следовало бы ожидать, что пептиды указанного типа должны заметно отличаться от других пептидов, не содержащих последовательности Phe-Phe, величиной $K_{m(\text{каж})}$. Однако, как видно из данных табл. 6, этого не происходит.

Объяснение этому можно найти опять-таки в рамках двухстадийной схемы комплексообразования. Для большинства субстратов, приведенных в табл. 6, наиболее специфической является одна и та же аминокислота (фенилаланин в положении P_1), т. е. значения K_s (образование комплекса E_0S) во всех случаях должны быть одинаковыми и, очевидно, не должны зависеть от конформации пептида. При значениях $K_p < 1$ $K_{m(\text{каж})} = K_s$, т. е. наблюдаемая константа Михаэлиса также не будет зависеть от конформации.

Различия в конформации могут оказаться на положении равновесия $E_0S \rightleftharpoons E_pS$, однако, поскольку конформационные переходы происходят уже на ферменте и сводятся к потере ротационных степеней свободы разными

конформерами, влияние конформации субстрата на положение равновесия не должно быть значительным.

Влияние конформации субстрата на образование продуктивного комплекса может быть велико в том случае, если конформационные переходы в субстрате невозможны или очень сильно затруднены. В этом случае конформер с «неправильной» конформацией будет связываться непродуктивно, как это показано на схеме (12):



Соответствующие этой схеме катализитические параметры:

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_3 K_p}{K_p + (1 + K_i)}, \quad K_{m(\text{каж})} = \frac{K_s}{K_p + (1 + K_i)} \quad \text{и} \quad \frac{k_{\text{кат}}}{K_{m(\text{каж})}} = \frac{k_3 K_p}{K_s},$$

где $K_i = [E_0S']/[E_0S]$. Субстрат с фиксированной «неправильной» конформацией будет давать преимущественно непродуктивный комплекс (K_i очень велико, а K_p мало). Значения катализитических констант в этом случае будут: $k_{\text{кат}} = k_3 K_p / K_i$, а $K_{m(\text{каж})} = K_s / K_i$, т. е. субстрат будет хорошо связываться, но плохо расщепляться ферментом.

Конформационная жесткость может наблюдаться в случаях, если субстратом протеазы является нативный белок. Здесь соответствие как структуры, так и конформации участка белка, прилегающего к расщепляемой связи, должно быть оптимальным для эффективного протекания реакции. Очевидно, именно этим объясняется удивительная избирательность протеиназ в реакциях ограниченного протеолиза. Имеющиеся данные свидетельствуют об отсутствии энергетически очень невыгодных конформаций аминокислотных остатков в белках [71]. Таким образом, по-видимому, конформации полипептидной цепи субстрата в растворе и в комплексе с участком активного центра фермента не должны сильно различаться. Для низкомолекулярных субстратов α -химотрипсина этот вывод имеет кинетические [72], физико-химические [73] и расчетные [47] обоснования.

III. ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАСПЩЕПЛЕНИЯ АМИДНОЙ СВЯЗИ

1. Вводные замечания

Амидная связь представляет собой резонансно-стабилизированную структуру с энергией стабилизации ~ 16 ккал/моль. Связь C—N является частично двойной. Порядки связей и распределение зарядов показаны на рис. 11 [74]. Распределение электронной плотности в амидной связи по-

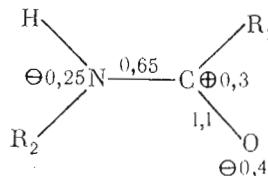


Рис. 11. Распределение зарядов и порядки связей в амидной группе [74]

казывает, что атака молекулой воды или другим нуклеофильным реагентом должна быть направлена на атом углерода карбонильной группы. Однако вода очень слабый нуклеофил ($pK_a = 1,75$), поэтому некатализируемый гидролиз амидной связи протекает чрезвычайно медленно. Чтобы ускорить реакцию, необходимо увеличить либо положительный заряд па

карбонильном атоме углерода, либо отрицательный заряд на атакующей группе. Это может быть в принципе достигнуто тремя способами:

- 1) протонированием карбонильного атома кислорода (общий кислотный катализ);
- 2) отщеплением протона от молекулы воды (общий основной катализ);
- 3) заменой воды более сильным нуклеофилом, образующим с амидом энергетически более «богатое» промежуточное соединение (например, эфир), с последующим расщеплением этого соединения водой (ковалентный или нуклеофильный катализ). Ферменты реализуют все три указанные выше возможности. Каталитическими группами в белках могут выступать функциональные группы аминокислотных остатков (здесь не рассматриваются коферменты, отсутствующие у протеиназ) или ионы металлов.

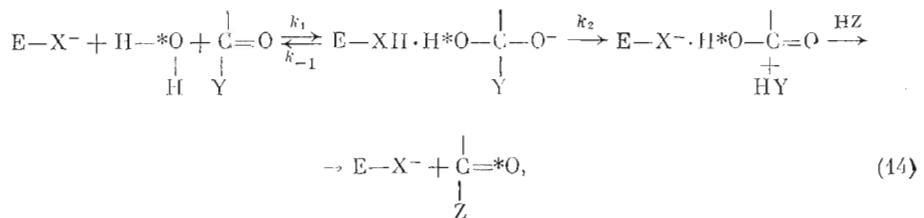
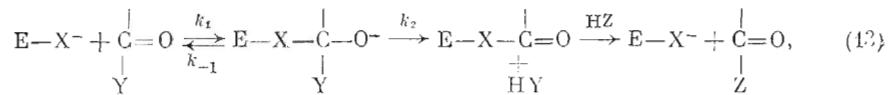
Функциональные группы аминокислотных остатков по своей способности к ионизации и по нуклеофильности покрывают очень большой интервал значений (табл. 15). Очевидно, однако, что успевшо функционировать в роли основного или кислотного катализатора эти группы могут лишь в том случае, если соответствующая ионная форма находится в достаточно большой концентрации. Так как протеолитические ферменты работают в крайне разных условиях в отношении рН среды (от 1–2 для кислых протеиназ до 8–9 для щелочиных), очевидно, что и в качестве каталитических групп в них должны выступать разные остатки аминокислот. Действительно, в соответствии с классификацией протеиназ, мы находим в качестве каталитически активных групп остатки серина (сериновые протеиназы), цистеина (тиоловые протеиназы), аспарагиновой кислоты (кислые протеиназы) и ионы металлов, функционирующие у большинства изученных металлоконденсирующих протеиназ вместе с карбоксильными группами остатков глутаминовой кислоты. Здесь важно отметить два обстоятельства: 1) рН-оптимум действия каждой из этих групп ферментов заметно отличается от pK_a их каталитических групп. Наибольшая разница имеется у сериновых протеиназ, где рН-оптимум 7,5–8,5, а $pK_a \sim 14$. Очевидно, должны существовать механизмы, повышающие концентрацию ионизированных форм оснований при оптимальных для катализа значениях рН; 2) нуклеофильность каталитических групп для разного типа ферментов очень различна. Однако нет оснований полагать, что эффективность катализа коррелирует с нуклеофильностью этих групп (см. табл. 2). Вероятно, должны существовать механизмы, компенсирующие низкую нуклеофильность каталитических групп ферментов, имеющих низкие pK_a . Мы рассмотрим эти механизмы при анализе функционирования отдельных типов протеиназ.

2. Нуклеофильный или общий основной катализ?

Как же функционируют нуклеофильные каталитические группы ферментов? Выше уже отмечалось, что основание может выступать в роли общего основного катализатора, способствуя отщеплению протона от молекулы воды, или в роли нуклеофильного (ковалентного) катализатора, непосредственно атакуя расщепляемую связь амида. До недавнего времени было известно лишь, что гидроксильная группа остатка серина и тиоловая группа соответствующих протеиназ функционируют как нуклеофильные каталитические группы при гидролизе эфиров ациламинокислот. Оставалось неясным, функционируют ли они таким же образом при гидролизе амидов и как функционируют каталитические группы других ферментов. В 1973 г. в нашей лаборатории [75] и независимо в лаборатории А. Фершта [76] были получены доказательства того, что катализируемый α -химотрипсином гидролиз пептидов происходит по нуклеофильному механизму с промежуточным образованием ковалентного «ацилфермента».

В дальнейшем в нашей лаборатории было разработано несколько методических подходов для различения нуклеофильного и общего основного механизмов ферментативного катализа:

а) Исследование включения тяжелого кислорода в продукты переноса ацильной группы субстрата на нуклеофил (или в продукты трансцептидации). Как видно из схемы (13), в случае нуклеофильного механизма, т. е. образования ковалентного промежуточного соединения с ферментом, тяжелокислородная метка не должна включаться в продукт трансцептидации, тогда как общий основной механизм катализа должен сопровождаться включением ^{18}O (схема (14)).



где X – катализическая группа, Y – отщепляемая группа субстрата и Z – нуклеофил. Успех этого метода определяется относительной скоростью реакций гидролиза промежуточного соединения и реакции переноса.

б) Исследование включения тяжелокислородной метки в непрогидролизованный субстрат. Как видно из приведенных выше схем, лишь в случае общего основного механизма при благоприятном соотношении констант k_2 и k_{-1} будет наблюдаться включение метки в субстрат.

в) Исследование скорости обмена кислорода в карбоксильной группе ацильного продукта гидролиза в отсутствие и в присутствии второго (аминного) продукта реакции. Очевидно, что если обмен идет через образование ковалентного промежуточного соединения с ферментом, то присутствие второго продукта не может ускорить включение метки. В противном случае образование и гидролиз пептидной связи будут способствовать дополнительному включению тяжелого кислорода при условии, что скорость синтеза-гидролиза пептида превышает скорость собственно обмена кислорода.

Следует отметить, что однозначную информацию о механизме может дать лишь совместное использование нескольких методов. Так, например, в случае, если X – карбоксильная группа и гидролиз промежуточного ангидрида идет по карбонильной группе фермента, использование лишь метода «а» не дает однозначной информации о механизме. В этом случае необходимо исследовать включение метки в карбоксильную группу активного центра фермента. Обнаружение включения ^{18}O в субстрат однозначно свидетельствует об общем основном механизме, однако, если такое включение не обнаруживается, это может быть следствием неблагоприятного соотношения констант k_{-1} и k_2 .

Благодаря использованию этих подходов мы доказали общий основной механизм катализа в случае пепсина [77] и в случае лейцинаминопептидазы [78].

Рентгеноструктурные данные по пенициллопепсику [79], термолизину [80], а также данные по тяжелокислородному обмену в карбоксипептидазе A [81] позволяют считать, что эти ферменты функционируют по общему основному механизму.

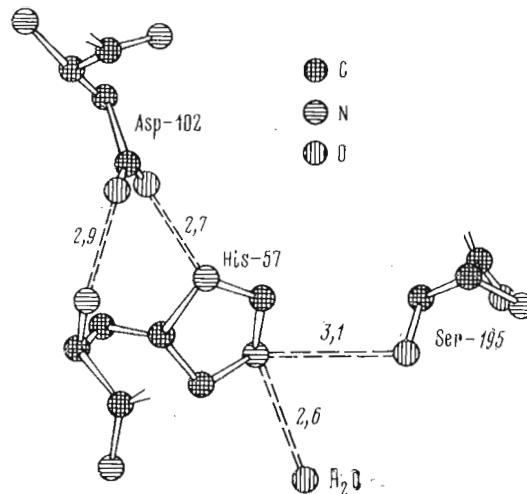
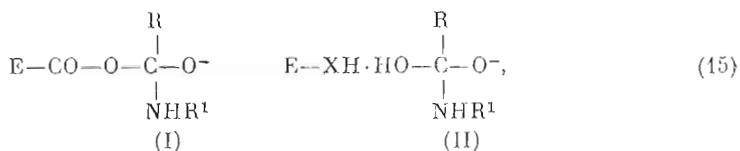


Рис. 12. Система переноса заряда в α -химотрипсине по [84]. Приведены длины связей в ангстремах

Таким образом, можно заключить, что протеиназы используют оба механизма катализа — нуклеофильный и общий основной, причем ферменты, содержащие сильноосновную каталитическую группу, работают по нуклеофильному механизму, тогда как ферменты со слабоосновной каталитической группой функционируют по механизму общего основного катализа. Такое различие вполне понятно, если принять во внимание, что ковалентная связь, образованная слабым основанием, разрывается легче связи, образованной аминогруппой [82], и таким образом, распад тетраэдрического промежуточного соединения (I), образованного слабоосновной карбоксильной группой фермента



будет происходить преимущественно в направлении исходного субстрата. В то же время промежуточное соединение (II), образованное с участием молекулы воды, должно во много раз эффективнее распадаться в направлении продуктов реакции.

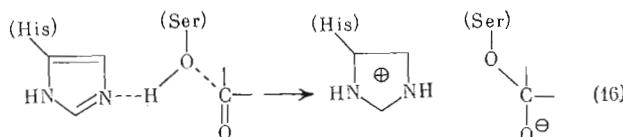
Рассмотрим несколько подробнее механизм каталитического действия наиболее изученных представителей каждой группы протеиназ.

α -Химотрипсин. Как уже отмечалось, pK_a гидроксильной группы серинового остатка (~ 14) на 6–7 единиц выше рН-оптимума действия фермента. Поэтому степень ионизации каталитически активной группы должна быть очень низкой. Возникает вопрос: может ли такая низкая концентрация «активной» формы фермента обеспечить наблюдаемые скорости катализа или же истинное pK_a гидроксильной группы серинового остатка в химотрипсине существенно ниже и, соответственно, много выше концентрация его «активной» формы? Очевидно, что если бы функционировала только «активная» форма фермента, истинные значения каталитических констант гидролиза превышали бы наблюдаемые в 10^7 – 10^8 раз. Это означает, например, что истинная константа скорости ацилирования химотриптина нитрофениловым эфиром фенилаланина ($k_a = 2,37 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$) составляла бы минимум $2,4 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$, что превышает константы скоростей диффузии контролируемых реакций. Катализ химотрипсином нельзя

поэтому объяснить функционированием в активном центре ионизированной спиртовой группы Ser-195 с $pK_a \sim 14$. Как известно из рентгеноструктурных данных [83], гидроксильная группа серина-195 входит в так называемую систему переноса заряда, включающую остатки His-57 и Asp-102 (рис. 12). Это дало основание постулировать наличие у α -химотрипсина сложного нуклеофильного кластера, включающего остатки Asp-102, His-57 и Ser-195 с $pK_a \sim 7$ [84]. Предполагалось, что карбоксильная группа остатка Asp-102 имеет аномально высокое значение $pK_a (\sim 6,7)$, поэтому протон у N^{e_2} -атома имидазола может легко протонировать карбоксилат-ион Asp-102, что облегчает перенос протона гидроксильной группы серина на атом N^{e_2} имидазольного остатка.

Однако последующее уточнение координат α -химотрипсина [85] показало, что по крайней мере в нативном ферменте ориентация гидроксильной группы Ser-195 такова, что она не может образовывать водородную связь с N^{e_2} -атомом остатка His-57. Кроме того, последние исследования методом ЯМР привели к выводу [86], что остаток Asp-102 имеет нормальное значение pK_a . Роль этого остатка, вероятно, заключается в уменьшении конформационной подвижности имидазола His-57 и стабилизации таутомерной формы имидазольного остатка с протоном у N^{e_2} -атома [47, 86]. Квантовомеханические расчеты системы переноса заряда [87] показывают, что существует высокий активационный барьер для переноса протона от O^r остатка Ser-195 на N^{e_2} -атом His-57.

Итак, в нативном ферменте, по-видимому, отсутствуют механизмы, способствующие ионизации гидроксильной группы серинового остатка. Однако это не означает, что такая же ситуация сохраняется в фермент-субстратном комплексе. При образовании комплекса происходит изменение ориентации гидроксильного остатка серина, расстояние $O^r(195) - N^{e_2}(57)$ существенно уменьшается [47] и активационный барьер переноса протона понижается [87]. Таким образом, «активной» формой α -химотрипсина и, по-видимому, других сериновых протеиназ является фермент-субстратный комплекс. Есть основание полагать, что не только отдельные группы фермента изменяют свое состояние при образовании фермент-субстратного комплекса, но и расщепляемая группа субстрата фиксируется в состоянии, облегчающем нуклеофильную атаку. В соответствии с исследованиями модельных систем [88, 89] нарушение копланарности амидной группы существенно облегчает нуклеофильную атаку на карбонильный атом углерода. Такое нарушение копланарности было отмечено в комплексе трипсина с трипсиновым панкреатическим ингибитором методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения [90]. Эти данные согласуются с представлением о стабилизации ферментом наиболее реакционноспособной формы субстрата [37]. Перенос протона и нуклеофильная атака происходят, по-видимому, по согласованному механизму (16):

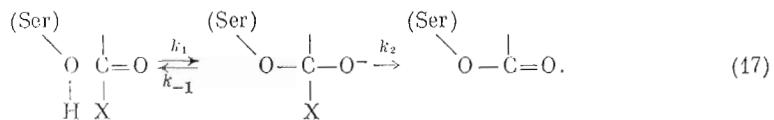


Нуклеофильная атака облегчается также образованием водородных связей карбонильного кислорода субстрата с NH-группами амидных связей остатков Ser-195 и Gly-193 в основной цепи [43] (общий кислотный катализ).

Таким образом, в сериновых протеиназах механизмом, «повышающим» концентрацию ионизированной формы каталитически активной группы, является общий основной катализ имидазолом, эффективность которого зависит от взаимодействий как расщепляемой группы, так и боковой цепи

аминокислотного остатка в положении P_1 субстрата с соответствующими группами фермента. Аминоакильтные остатки в других положениях менее существенны для эффективности.

Образовавшийся на этой стадии катализа тетраэдрический аддукт может распадаться как в направлении продуктов реакции (ацил-фермент), так и в направлении регенерации субстрата:



Фактически наблюдаемая скорость ацилирования представляет собой комбинацию констант скоростей образования и распада тетраэдрического промежуточного соединения:

$$k_a = \frac{k_1}{1 + k_{-1}/k_2}.$$

В зависимости от характера уходящей группы (X) соотношение этих констант может быть различным. Когда X=OR, протонирование кислорода уходящей группы — процесс термодинамически невыгодный ($pK_a \text{ C}-\text{O}-\text{R} \approx -4$), однаково возможен уход алкоголят-иона ($pK_a \sim 15$) и его протонирование в переходном состоянии. Судя по величине k_{-1}/k_2 в модельных реакциях (для щелочного гидролиза этилбензоата $k_{-1}/k_2 = 0,18$ [91]), наблюдаемое значение $k_a \approx k_1$. При гидролизе амидов уход аниона амина RNH_2^- невозможен ($pK_a \sim 35$ [92]), тогда как протонирование уходящей группы (относительно сильного основания) должно происходить легко. Соотношение k_{-1}/k_2 для гидролиза амидов больше единицы (бензамида — 4,2 [91]), и лимитирующей стадией является, по-видимому, распад тетраэдрического промежуточного соединения [93].

Впрочем, возможность образования тетраэдрического комплекса при гидролизе амидов, катализируемом α -химотрипсином, недавно [94] была поставлена под сомнение на том основании, что протонирование сильноосновной аминогруппы в тетраэдрическом промежуточном соединении должно быть очень быстрым процессом, не уступающим по скорости нуклеофильной атаке на карбонильный углерод субстрата. Альтернативным механизмом является механизм типа S_N2 .

Распад тетраэдрического комплекса приводит в случае сериновых протеиназ к образованию ковалентного ацил-фермента. Это промежуточное соединение имеет существенно более высокий уровень свободной энергии, чем исходный пептид. Так, для гидролиза Ac-Phe-Gly-NH₂ разница свободных энергий субстрата и ацил-фермента составляет $\sim 2,7$ ккал/моль [75] (см. рис. 13). Гидролиз ацил-фермента идет по тому же механизму, что и ацилирование фермента, однако в этом случае в качестве нуклеофила выступает не гидроксильная группа Ser-195, а молекула воды. В целом катализ α -химотрипсином может быть представлен рис. 14.

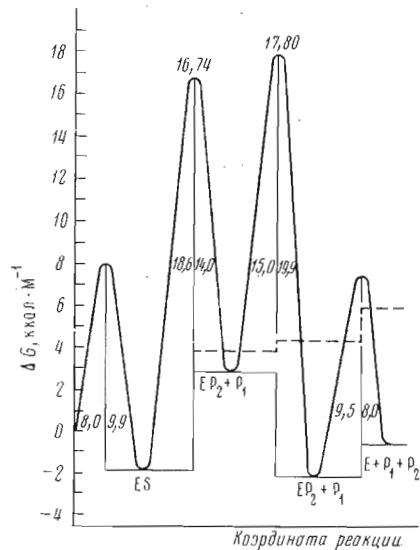


Рис. 13. Диаграмма изменения свободной энергии по координате реакции для гидролиза Ac-Phe-Gly-NH₂ α -химотрипсином при pH 7,3. Пунктиром показаны уровни свободной энергии в расчете на ионизированные формы продуктов [75]

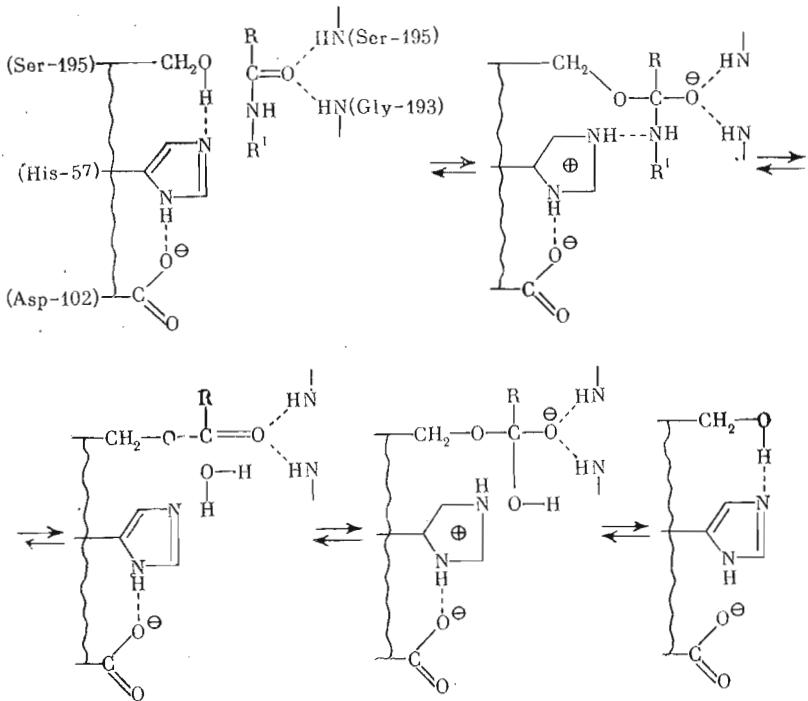
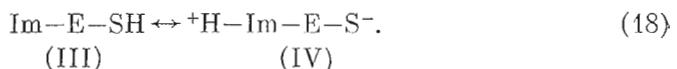


Рис. 14. Схема механизма действия α -химотрипсина

Папаин. Эта протеиназа функционирует при более кислых значениях pH (~6), чем α -химотрипсин. Каталитически активный остаток цистеина (Cys-25) ионизируется с pK_a 8,2 [95]. Таким образом, различие в pK_a нуклеофильной группы и pH_{opt} фермента в этом случае весьма невелико. Наряду с Cys-25 в активном центре папаина и других тиоловых протеиназ функционирует остаток имидазола (His-159 у папаина). Каталитически активные группы папаина могут функционировать в двух кинетически перенасыщенных состояниях (III) и (IV).



Тиолат-ион — сильный нуклеофил (табл. 15), поэтому можно думать, что он функционирует как нуклеофильный катализатор. Действительно, при гидролизе эфиров ациламиноокислот было доказано [96, 97] промежуточное образование ацил-папаина E-S-COR. В отношении гидролиза пептидов такие доказательства, однако, отсутствуют. Нуклеофильная атака тиолат-ионом облегчается образованием в продуктивном комплексе водородных связей между карбонильным кислородом субстрата и NH-группами основной цепи Cys-25 и боковой цепи Gln-19. Исследование реакционной способности каталитического центра папаина [98] показало, что он, по всей вероятности, функционирует в состоянии (IV) и механизм расщепления может быть представлен схемой (рис. 15).

Таким образом, катализ папаином не требует каких-либо специальных механизмов активации нуклеофила, как это имеет место в случае сериновых протеиназ. Эффективность его в общем сравнима с эффективностью химотрипсинового катализа (ср. табл. 10 и 11). Однако в папаине расщепляемая группа субстрата и каталитические группы фермента, по-видимому, нуждаются в дополнительных механизмах для жесткой фиксации, отсутствующих у химотрипсина. Это связано с тем, что локусом первичной специфичности папаина является участок S_2 , отстоящий на одну ами-

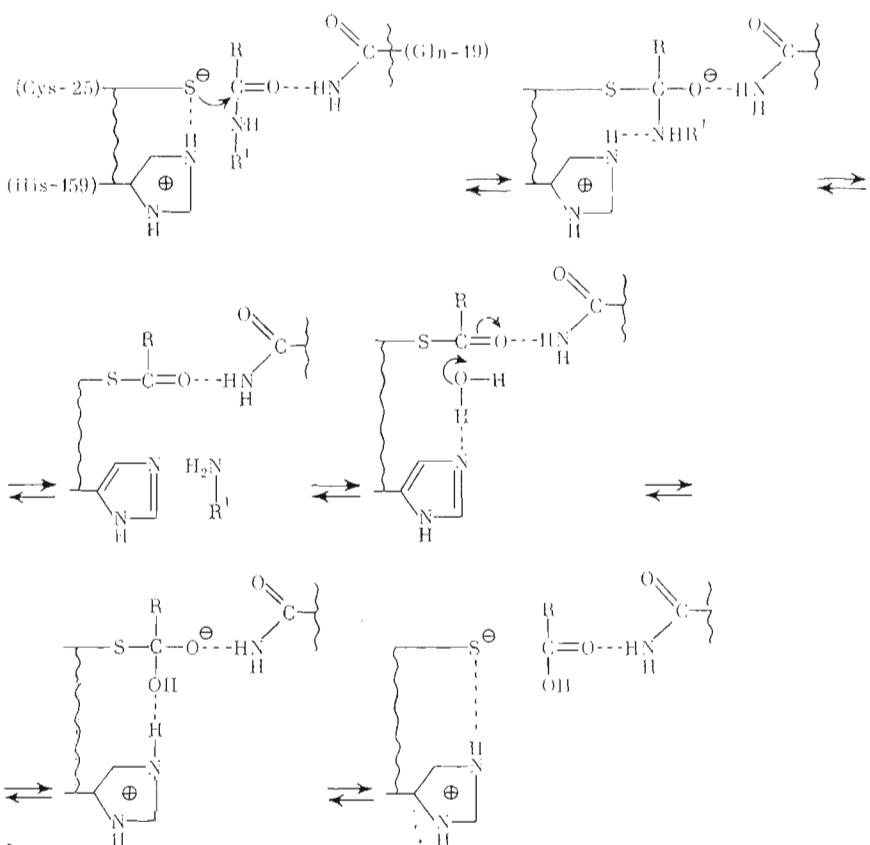


Рис. 15. Схема механизма действия папанина

ионизлоту от гидролизуемой связи [50]. Такая дополнительная фиксация может достигаться так называемым щелевым эффектом. Папанин представляет собой двухдоменный белок с активным центром, расположенным в области «щели» между доменами. Было показано [95, 99], что связывание субстратов изменяет сегментную подвижность доменов. Как указывалось выше, для папанина было доказано двухстадийное образование продуктивного фермент-субстратного комплекса, т. е. его вторичная специфичность весьма важна для катализа.

Пепсин. В активных центрах пепсина и, по-видимому, большинства других кислых протеиназ функционируют две карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты (в пепсине – Asp-32 и Asp-215). Эти две группы значительно различаются по pK_a : одна из них имеет $pK_a \sim 1,5$ (Asp-32), а другая – 4,5 (Asp-215) [100, 101]. В третичной структуре ферментов эти группы сближены и взаимодействуют друг с другом [21]. В качестве нуклеофила при рН-оптимуме действия пепсина ($\text{pH } 1\text{--}4$), очевидно, выступает группа с низким pK_a , несущая при этих pH отрицательный заряд. Даже для карбоксильных групп с обычными значениями pK_a ($\sim 4,5$) их реакционная способность в качестве нуклеофильных агентов примерно на 6 порядков ниже реакционной способности гидроксил- и тиолат-ионов (см. табл. 15). Поэтому следовало бы ожидать, что катализ кислыми протеиназами должен быть значительно менее эффективным, чем сериновыми и тиоловыми протеиназами. Однако это не так. Гидролиз многих субстратов пепсином происходит значительно быстрее, чем α -химотрипсином (ср. табл. 6 и 10). Очевидно, существуют какие-то механизмы компенсации низкой нуклеофильности карбоксилат-иона.

Таблица 15

pK_a и реакционная способность в отношении гидролиза
n-нитрофенилацетата некоторых нуклеофилов [17]

Нуклеофил	<i>pK_a</i>	<i>k₂, M⁻¹ мин⁻¹</i> по гидролизу <i>n</i> -нитро- фенилацетата	Относительная реактивность
H ₂ O	-1,7	6·10 ⁻⁷	1
CH ₃ COO ⁻	4,8	5,4·10 ⁻⁴	850
Имидазол	7,0	29	4,8·10 ⁷
Меркаптоэтанол	9,5	700	1,2·10 ⁹
Фенол	10,0	105	1,75·10 ⁸
OH ⁻	15,7	890	1,5·10 ⁹

Как указывалось выше, пепсины и, очевидно, другие кислые протеиназы функционируют по механизму общего основного катализа, т. е. фактически атакующей карбонильную группу субстрата частицей является вода, а карбоксилат-ион способствует отщеплению протона от молекулы воды. Скорость переноса протона от молекулы воды на карбоксилат-ион должна быть очень низкой [102]. Поэтому маловероятно, что перенос протона происходит в предпереходном состоянии. Очевидно, здесь имеют место согласованные процессы присоединения воды к карбонильному углероду и отщепления протона. Однако эффективная атака водой может происходить лишь в том случае, если карбонильная группа сильно поляризована. Такая поляризация в пепсине, по-видимому, достигается за счет эффективного протонирования карбонильного атома кислорода протоном остатка Asp-215. Этот протон расположен между атомами кислорода карбонильных групп Asp-32 и Asp-215:



Такой механизм атаки требует точной взаимной ориентации групп активного центра, расщепляемой группы субстрата и молекулы воды, что должно приводить к значительным энтропийным потерям. Действительно, как было показано выше, катализ пепсином характеризуется значительной отрицательной энтропией активации (см. табл. 12). Можно предположить, что точная ориентация достигается в продуктивном фермент-субстратном комплексе за счет вторичных взаимодействий и этот процесс тем более эффективен, чем эффективнее эти взаимодействия.

Нельзя исключить, что наряду с эффективным протонированием карбонильного кислорода субстрата и точной взаимной ориентацией реагирующих групп в E_pS-комплексе (см. схему 4) происходит нарушение резонансной стабилизации амидной группы, как это предполагается и для химотрипсинового катализа. Иначе говоря, чем сильнее равновесие сдвинуто в сторону E_pS-комплекса (чем выше *K_p*), тем ближе его структура к структуре переходного состояния в реакции гидролиза. Именно эти механизмы могут компенсировать низкую нуклеофильность карбоксилат-иона в кислых протеинах.

Один из возможных механизмов такого рода был предложен в работе Джеймса и сотр. [79] по кристаллографическому анализу пепциллопепсина (рис. 16). Согласно этим данным, связывание субстрата приводит за счет вторичных взаимодействий к конформационным перестройкам, результатом которых является протонирование пептидной связи между Thr-216 и Gly-217 и перенос протона с атома азота этой связи на карбоксиль-

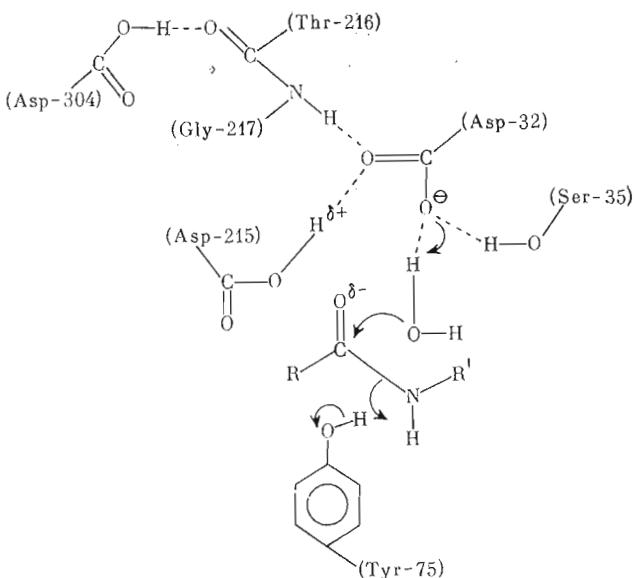
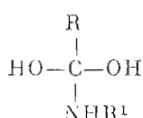


Рис. 16. Система водородных связей в активном центре пептиллопепсина по [79]

ную группу Asp-32. Это приводит к повышению электрофильности протона остатка Asp-215, расположенного между карбоксилами Asp-215 и Asp-32. Этот механизм, однако, должен привести кнейтрализации отрицательного заряда на карбоксилат-ионе Asp-32 и потере этим остатком функций общего основного катализатора. Кроме того, в отличие от пептиллопепсина в пепсине отсутствует His-157, играющий, по мнению авторов работы [79], важную роль в перераспределении зарядов. По моему мнению, вторичные взаимодействия приводят, скорее, к точной фиксации карбонильного кислорода субстрата вблизи протона остатка Asp-215, который служит катализатором общего кислотного типа на этой стадии процесса, а также к нарушению конформации амидной группы субстрата.

Тот факт, что в ходе пепсинового гидролиза наблюдается включение тяжелокислородной метки в субстрат [77], свидетельствует об образовании относительно стабильного тетраэдрического промежуточного соединения



В этом соединении уход NHR'-группы должно предшествовать ее протонирование и ионизация одной из гидроксильных групп [103]. Хотя эти реакции должны проходить относительно быстро (образование сильной сопряженной кислоты и слабого сопряженного основания), распад тетраэдрического промежуточного комплекса с отщеплением воды и регенерацией субстрата — еще более быстрая реакция. Таким образом, в этом процессе, как и в случае катализа химотрипсином, лимитирующей стадией является распад промежуточного соединения. Если это так, то наблюдаемая pH-зависимость пепсинового катализа должна характеризовать группу активного центра, дающую протон на уходящую группу субстрата. Нисходящая ветвь pH-зависимости для незаряженных субстратов имеет точку перегиба при pH ~4,5 [100], что очень хорошо совпадает с pK_a Asp-215. Можно думать, что именно эта группа служит не только обицим

кислотным катализатором на стадии образования тетраэдрического промежуточного соединения, но и донором протона. Предположение, высказанное в работе [79], о том, что донором иротона является остаток Тир-75, кажется мне несостоятельным, поскольку существование фенолят-иона в кислой среде невозможно.

Еще одна особенность пепсинового катализа — близкие скорости гидролиза пептидных и эфирных (депептидных) субстратов. Вероятно, это связано с невозможностью ухода в кислой среде алcoxильной группы в виде аниона и необходимостью ее протопирирования в промежуточном комплексе. Этот процесс, как уже отмечалось (стр. 827), должен идти довольно медленно.

Распад промежуточного соединения приводит к комплексу фермент — продукты реакции, и здесь возникает новая проблема: как же объяснить хорошо известные реакции транспептидации, катализируемые пепсином? Действительно, многочисленные эксперименты [104, 105] четко показывают, что пепсин катализирует как реакции транспептидации по типу ацильного переноса, так и реакции аминопереноса. Исследование кинетики последней реакции показало [106], что фермент образует общий комплекс с переносимой группой, если в качестве субстратов использовать разные соединения, содержащие одинаковую переносимую группировку.

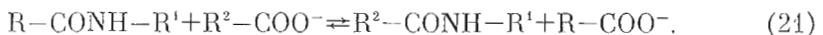
Следует четко различать реакции ресинтеза и транспептидации: первые дают выход продукта, не превышающий в обычных условиях 1%, а вторые идут с выходами до 20–30% от количества исходного субстрата.

При объяснении реакции транспептидации возникают две проблемы: термодинамическая и кинетическая. Долгое время факт транспептидации рассматривали как доказательство образования в ходе катализа ковалентного соединения с переносимой группой субстрата. Считалось, что энергия амидной связи субстрата должна сохраняться на всех стадиях процесса транспептидации, чтобы обеспечить эффективное образование продукта переноса. Действительно, если рассматривать образование амидной связи между аминокислотами



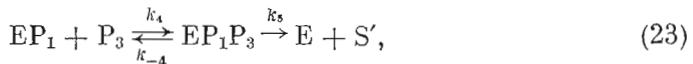
то, даже учитывая, что в интервале pH 3–6 константа равновесия этой реакции ~ 1 [8], можно ожидать выхода продукта (при реальных концентрациях реагирующих веществ около $1 \cdot 10^{-3}$ М) порядка 0,1%. Такие выходы типичны для реакций ресинтеза.

Однако в случае транспептидации процесс идет по другой схеме:



Ясно, что константа равновесия этой реакции независимо от pH будет близка к единице, а равновесная концентрация образующегося пентида $R^2-CONH-R^I$, как легко подсчитать, будет достигать 50% концентрации исходных веществ. Таким образом, нет оснований объяснять транспептидацию ни сохранением энергии амидной связи в промежуточных комплексах с ферментом [101], ни особенностями ионного состояния продуктов реакции в нековалентном комплексе с ферментом [79]. Как показали данные по pH-зависимости константы скорости транспептидации [107], эта величина не зависит от pH в интервале 3–5,5.

Однако для объяснения этого процесса существует еще одна проблема — кинетическая. Если пепсин образует нековалентный комплекс с переносимой группой, то он должен существовать достаточно долго, чтобы связать акцептор, т. е. константа скорости диссоциации этого комплекса должна быть ниже, чем обычно наблюдаемые константы скорости диссоциации комплексов фермент — продукт ($\sim 1 \cdot 10^4$ с⁻¹). Ранее пами было показано [106], что в реакциях транспептидации



где P_1 и P_2 – соответственно аминный и ацильный продукты гидролиза субстрата (S), P_3 – акцептор транспептидации и S' – продукт транспептидации, отношение скорости гидролиза субстрата (v_h) к скорости транспептидации (v_t) при условии $k_5 \ll k_{-4}$ будет

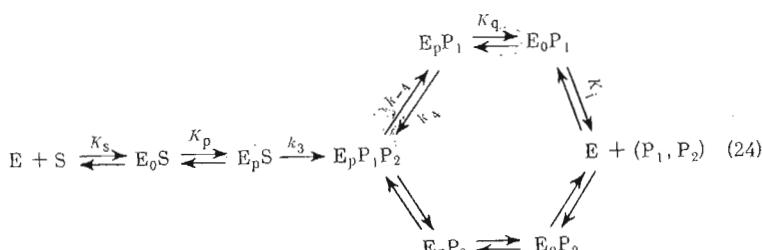
$$\frac{v_h}{v_t} = \frac{k_3 k_{-4}}{k_4 k_5} \cdot \frac{1}{[P_3]}.$$

Отсюда, предполагая, что константы скорости образования P_1 из $EP_1(k_3)$ и P_3 из $EP_1P_3(k_{-4})$ примерно одинаковы, а константа скорости образования комплекса EP_1P_3 близка к диффузионной ($k_4 \approx 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$), можно оценить значение k_3 (и k_{-4}), зная v_h/v_t и k_5 при фиксированном значении $[P_3]$:

$$k_3(k_{-4}) = \sqrt{\frac{v_h}{v_t} k_4 k_5 [P_3]}.$$

Подставляя сюда значения v_h/v_t , k_5 и $[P_3]$ для системы Ac-Phe-Tyr+Ac-Phe(NO_2) из работы [106], получим $k_3 (= k_{-4}) \approx 9 \text{ c}^{-1}$.

Таким образом, чтобы обеспечить наблюдаемые скорости транспептидации, комплекс EP_1P_3 должен иметь константу диссоциации порядка $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (приимая скорость ассоциации $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$). Что касается диссоциации комплекса EP_1 , то прямые измерения константы равновесия $E + P_1 \xrightleftharpoons{K_1} EP_1$ дают значения $K_1 \approx 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ [54]. Если константа скорости распада EP_1 , как показано выше, $\sim 9 \text{ c}^{-1}$, то скорость ассоциации должна быть $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, что на несколько порядков ниже обычно наблюдаемых величин ($\sim 1 \cdot 10^7$). Объяснить это различие можно, предположив, что в ходе катализа имеет место не только двухступенчатое образование продуктивного комплекса фермент–субстрат, но и ступенчатая диссоциация комплекса фермент–продукты (ср. [55]), т. е. диссоциации комплекса EP_1 предшествует изменение его состояния. Таким образом, полная кинетическая схема пепсинового катализа может быть представлена как



В этой схеме комплексу E_pP_1 соответствует комплекс EP_1 в схемах (22 и 23). Кажущаяся константа диссоциации комплекса E_pP_1 , $K_{1(\text{каж})} = K_1 K_q / (1 + K_q)$ и равенство $K_{1(\text{каж})} = K_1 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ будет, если $K_q \gg 1$, т. е. равновесие $E_pP_1 \xrightleftharpoons{K_q} E_0P_1$ смешено вправо ($K_q = [E_0P_1] / [E_pP_1]$). Таким образом, возможно, что образование E_pP_1 из E и P_1 затруднено низкой скоростью превращения E_0P_1 в E_pP_1 . Транспептидация идет, по-видимому, путем присоединения акцепторов к комплексам E_pP_2 или E_0P_1 , причем в за-

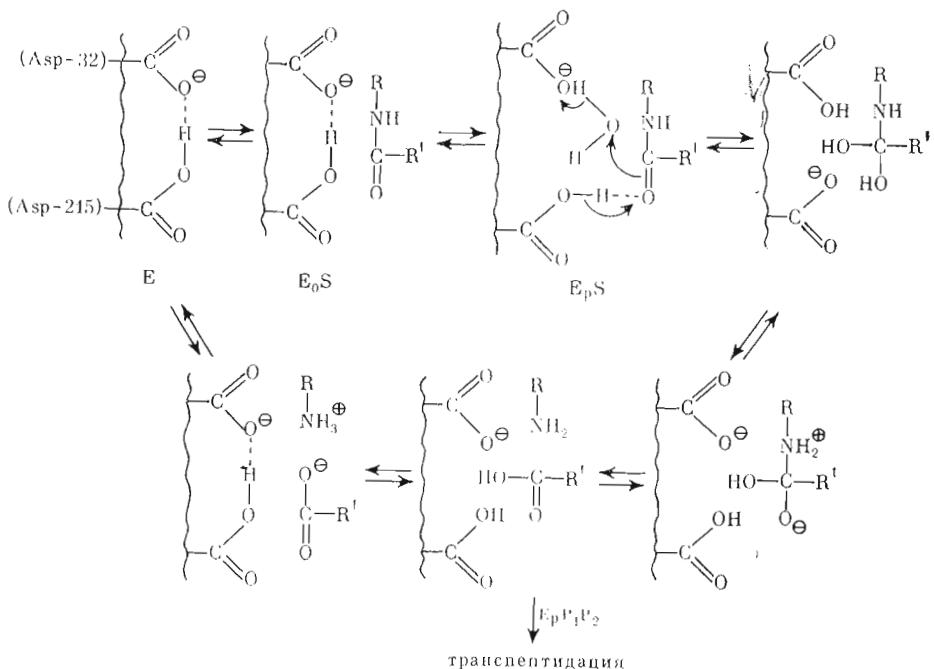
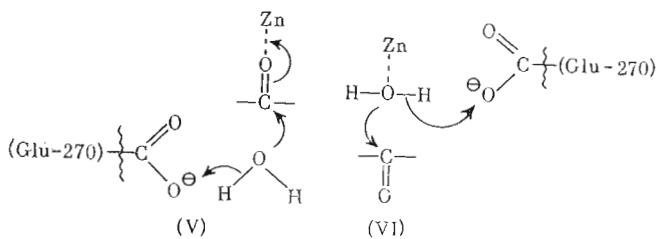


Рис. 17. Схема механизма действия пепсина

висимости от соотношения концентраций этих комплексов наблюдается преимущественно транспептидация по типу ацильного переноса или по типу аминопереиноса. В целом механизм пепсинового катализа может быть представлен схемой, изображенной на рис. 17.

Карбоксипептидаза А. В активном центре этого фермента функционируют карбоксилат-ион остатка Glu-270, остаток Tyr-248 и атом Zn²⁺. Общепризнанной является лишь роль остатка Tyr-248 как донора протона уходящей группы. Что касается карбоксилат-иона, то эта группа выполняет роль или нуклеофильного катализатора, атакуя карбонил расщепляемой связи с образованием ангидрида [108], или катализатора общеосновного типа, способствуя отщеплению протона от молекулы воды [81]. Существующие данные позволяют предположить, что при гидролизе амидной связи карбоксилат-ион выполняет функции катализатора общеосновного типа, тогда как при гидролизе эфирной связи он функционирует как нуклеофильная катализитическая группа. В пользу общего основного катализа карбоксилат-ионом свидетельствуют также данные рентгеноструктурного анализа другого Zn²⁺-содержащего фермента — термолизина [80]. Так или иначе, карбоксипептидаза, как и пепсин, содержит слабую нуклеофильную катализитическую группу. Однако по своей эффективности этот фермент относится к наиболее быстро действующим протеиназам. Здесь, как и в случае пепсина, возникает вопрос о компенсаторных механизмах, и несомненно, что именно атом Zn²⁺ играет при этом главную роль. Существует две точки зрения на роль атома Zn²⁺. Одна из них [109] заключается в том, что Zn²⁺ образует координационную связь с карбонильным кислородом, обеспечивая эффективную поляризацию карбонильной группы (V). Вторая [80] предполагает, что в координационную сферу атома цинка включается молекула воды и таким образом цинк стабилизирует гидроксил-ион, увеличивая его концентрацию, и, следовательно, повышает нуклеофильность системы карбоксилат-ион — вода (VI).



В последнее время были получены данные, сближающие эти две точки зрения [110]. Было показано, что в окружение атома Zn^{2+} входит как карбонильная группа субстрата, так и молекула воды (рис. 18), причем такое окружение характерно для самых разных Zn^{2+} -содержащих ферментов, включая такие, как ангидраза угольной кислоты и алкогольдегидрогеназа.

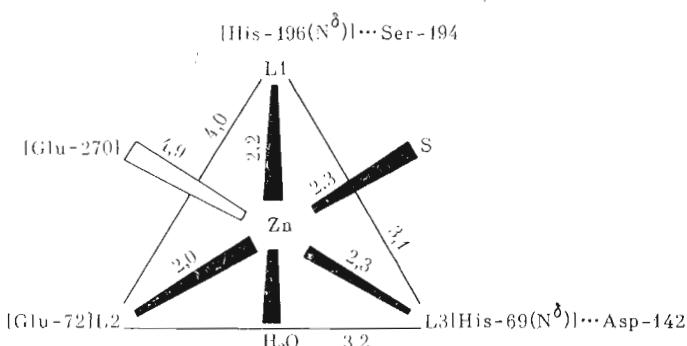


Рис. 18. Схема окружения атома Zn^{2+} в карбоксипептидазе *A* по [110].
L1, L2, L3 — лиганды, S — субстрат (карбонильный атом кислорода);
приведены длины связей в ангстремах

Таким образом, в карбоксипептидазе *A* и, по-видимому, в других Zn^{2+} -содержащих протеиназах реализуются два механизма повышения эффективности: поляризация карбонильной группы (см. [111]) и стабилизация гидроксил-иона, возникающего при переносе протона от воды на карбоксилат-ион Glu-270. Эта стабилизация становится возможной, поскольку

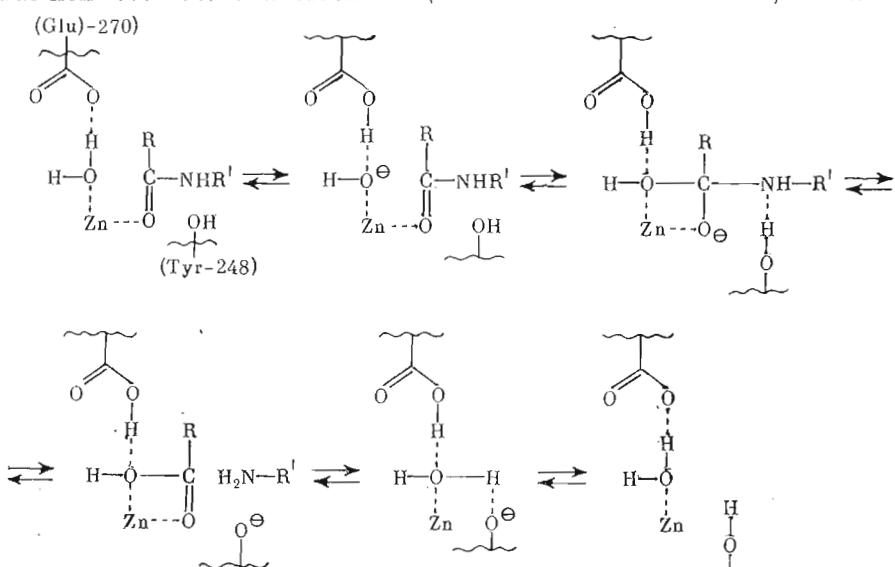


Рис. 19. Схема механизма действия карбоксипептидазы *A*

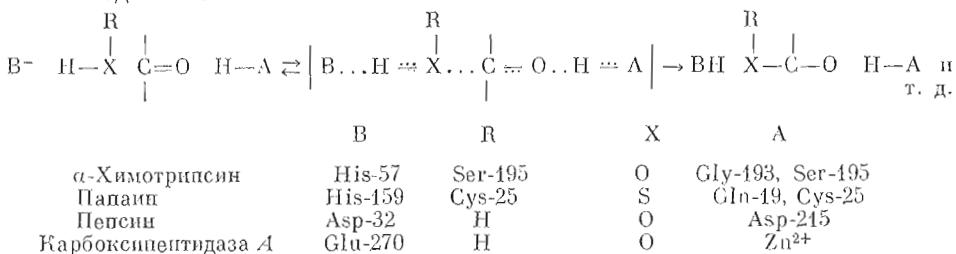
pK_a Zn²⁺-OH⁻-пары ~7 [112]. Итак, механизм катализа карбоксипептидазой A может скорее всего быть представлен схемой, изображенной на рис. 19.

Суммируя данные по механизмам расщепления амидных связей протеазами, можно сформулировать следующее: по типам механизма известные четыре группы протеиназ могут быть сведены к двум группам: одна из них, включающая в себя сериновые и тиоловые ферменты, может быть объединена в группу «оловых» — протеиназ, для которых характерен нуклеофильный механизм расщепления амидной связи. На эффективность этих ферментов, особенно сериновых протеиназ, мало влияют вторичные взаимодействия удаленных от расщепляемой группы остатков субстрата. Нуклеофильность каталитических групп у них высокая, и здесь не требуется какие-либо особые механизмы ее увеличения, за исключением обычных механизмов общего основного и общего кислотного катализа на стадиях нуклеофильной атаки и распада тетраэдрического промежуточного соединения.

Вторая группа — «карбоксильные» протеиназы, включающие в себя металло содержащие ферменты и кислые протеиназы, характеризуется общим основным механизмом расщепления амидной связи. Эти ферменты имеют слабую нуклеофильную каталитическую группу и нуждаются в особых механизмах компенсации этой слабой нуклеофильности. У Zn²⁺-содержащих протеиназ это, по-видимому, достигается как стабилизацией гидроксил-иона за счет его координации с атомом цинка, так и поляризацией карбонильной группы субстрата. У кислых протеиназ это достигается эффективным протонированием атома кислорода карбонильной группы, которое обеспечивается точной ориентацией всех взаимодействующих атомов. Такая точная ориентация достигается за счет взаимодействия удаленных от расщепляемой связи остатков субстрата с ферментом.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отвечая на вопрос, сформулированный в начале статьи об общности и различиях каталитических механизмов протеиназ, можно констатировать, что все они (или по крайней мере изученные на сегодня) используют довольно сходные способы расщепления амидной связи, которые можно представить единой схемой:



Детали этой схемы варьируют у различных типов ферментов в зависимости от условий их функционирования и типа расщепляемых субстратов. Так, у кислых протеиназ, атакующих в основном денатурированные белки и вынужденных использовать слабые основания в качестве нуклеофильной группы, выработался механизм, использующий вторичные белок-лигандные взаимодействия для повышения эффективности катализа. Эти взаимодействия значительно слабее влияют на эффективность сериновых протеиназ, использующих сильное основание в качестве каталитической группировки.

По-видимому, можно говорить об эволюции каталитических механизмов протеиназ, однако в настоящее время мы не можем расставить известные типы протеолитических ферментов на эволюционной лестнице. Это дело будущих исследований.

Автор выражает глубокую признательность всем сотрудникам лаборатории химии ферментов Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, работы которых легли в основу этой статьи и которые приняли активное обсуждение ее в рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Proteases and biological control (1975) Reich E., Rifkin D. B., Shaw E., eds, Cold Spring Harbor, N. Y.
2. Enzyme Nomenclature, Recomendations (1978) of the Nomenclature Committee of IUB, Acad. Press, 1979.
3. Hartley B. S. (1960) Ann. Rev. Biochem., **29**, 45–72.
4. Hartley B. S. (1974) Sympos. Soc. Gen. Microbiol., **24**, 152–160.
5. Foltmann B., Pedersen V. B. (1977) Adv. Exptl Biol. and Med., **95**, 3–22.
6. Delbaere L. I. J., Hutchon W. L. B., James M. N. G., Thiessen W. E. (1975) Nature, **257**, 758–761.
7. Fruton J. S., Simmonds S. (1958) General Biochemistry, 2nd ed. Chap. 29, John Wiley, N. Y.
8. Козлов Л. В., Гинодман Л. М., Орехович В. Н., Валуева Т. А. (1966) Биохимия, **31**, 315–321.
9. Borsook H., Dubnoff J. W. (1940) J. Biol. Chem., **132**, 307–315.
10. Yamana T., Mizukami Y., Tsuji A., Yasuda Y., Masuda K. (1972) Chem. Pharm. Bull., **20**, 881–891.
11. Morawetz H., Otaki P. S. (1963) J. Amer. Chem. Soc., **85**, 463–468.
12. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Datler H. (1973) Eur. J. Biochem., **39**, 381–391.
13. Lowbridge J., Fruton J. S. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 6754–6761.
14. Sachdev G. P., Fruton J. S. (1970) Biochemistry, **9**, 4465–4470.
15. Клесов А. А., Вэлли Б. Л. (1977) Биоорган. химия, **3**, 806–815.
16. Bender M. L., Kezdy F. J., Gunter C. R. (1964) J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3714–3721.
17. Бендер М. (1964) в кн.: Механизмы катализа нуклеофильных реакций производных карбоновых кислот, с. 41, «Мир», М.
18. Pockier Y., Meany J. E. (1967) J. Amer. Chem. Soc., **89**, 631–636.
19. Tang J. (1963) Nature, **199**, 1094–1095.
20. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1976) Биоорган. химия, **2**, 803–810.
21. Андреева Н. С., Федоров А. А., Гущина А. Е., Рыскулов Р. Р., Шутцевер И. Е., Сафро М. Г. (1976) Молекулярн. биология, **12**, 922–936.
22. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1977) Биоорган. химия, **3**, 1663–1670.
23. Medzihradzky K., Voynick I. M., Medzihradzky-Schweiger H., Fruton J. S. (1970) Biochemistry, **9**, 1154–1162.
24. Powers J. C., Harley D., Myers D. V. (1977) Adv. Exptl Biol. and Med., **95**, 141–157.
25. Антопов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1968) Докл. АН СССР, **183**, 1435–1438.
26. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1970) Молекулярн. биология, **4**, 558–569.
27. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. (1970) FEBS Lett., **7**, 23–25.
28. Antonov V. K., Ivanina T. V., Ivanova A. G., Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. (1972) FEBS Lett., **20**, 37–40.
29. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjieva A., Blagoev B. (1976) Int. J. Peptide and Protein Res., **8**, 225–231.
30. Ротанова Т. В., Кляус Р., Иванова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1976) Биоорган. химия, **2**, 837–845.
31. Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1978) Биоорган. химия, **4**, 694–697.
32. Thompson R. C., Blout E. R. (1973) Biochemistry, **12**, 57–65.
33. Bauer C.-A., Thompson R. C., Blout E. R. (1976) Biochemistry, **15**, 1296–1299.
34. Дженкес Б. (1972) Катализ в химии и энзимологии, с. 228, «Мир», М.
35. Fersht A. (1977) Enzyme Structure and Mechanism, W. H. Freeman and Co., p. 248, Reading and San Francisco.
36. Knowles J. R. (1965) J. Theor. Biol., **9**, 213–228.
37. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И., Антонов В. К. (1980) Биоорган. химия, **6**, 645–654.
38. Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya. (1969) Adv. Enzymol., **32**, 21–53.
39. Knorre D. G. (1975) FEBS Lett., **58**, 50–52.
40. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) Int. J. Chem. Kinetics, **6**, 801–811.
41. Березин И. В., Мартинек К. (1977) в кн.: Основы физической химии ферментативного катализа, с. 134, «Высшая школа».

42. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. (1971) FEBS Lett., **15**, 121–124.
 43. Henderson R. (1970) J. Mol. Biol., **54**, 341–354.
 44. Martinek K., Dorovska V. H., Berezin I. V. (1972) Biochim. et biophys. acta, **271**, 80–86.
 45. Козлов Л. В., Дьяченко Е. Д., Антонов В. К. (1977) Биоорган. химия, **3**, 105–110.
 46. Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J. (1973) Biochemistry, **12**, 2035–2041.
 47. Попов Е. М. (1977) Молекуляри. биология, **11**, 5–41.
 48. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dutler H. (1970) FEBS Lett., **8**, 257–260.
 49. Lowe G. (1976) Tetrahedron, **32**, 291–302.
 50. Berger A., Schechter I. (1970) Phil. Trans. Roy. Soc. London, **B257**, 249–255.
 51. Alecio M. R., Dann M. L., Lowe G. (1974) Biochem. J., **141**, 495–501.
 52. Lowbridge J., Fruton J. S. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 6754–6761.
 53. Фрутон Дж. С., Меттис Дж. А. (1976) Советско-Американский симпозиум по химии и физике белка, тезисы докл., с. 17, Рига.
 54. Clement G. E. (1973) Progr. Bioorg. Mech., **2**, 177–238.
 55. Sachdev G. P., Fruton J. S. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 3424–3427.
 56. Harrison L. W., Vallee B. L. (1978) Biochemistry, **17**, 4359–4363.
 57. Hammes G. G. (1968) Adv. Protein Chem., **23**, 1–57.
 58. Coates J. H., Hardman M. J., Shore J. D., Gutfreund H. (1977) FEBS Lett., **84**, 25–28.
 59. Giegé R., Kern D., Ebel J. P., Grosjean H., De Henau S., Chantrenne H. (1974) Eur. J. Biochem., **45**, 351–362.
 60. Williams T. J., Shafer J. A., Goldstein I. J., Adamson T. (1978) J. Biol. Chem., **253**, 8538–8544.
 61. Virden R., Bristow A. F., Pain R. H. (1978) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **82**, 951–956.
 62. Sinnott M. L., Souchard I. J. L. (1973) Biochem. J., **133**, 89–98.
 63. Rosenberg T. L. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 3834–3838.
 64. Yon J. M. (1976) Biochimie, **58**, 61–69.
 65. Schuber F., Travé P., Pascal M. (1979) Bioorg. Chem., **8**, 83–90.
 66. Koshland D. E., Meet K. E. (1967) Ann. Rev. Biochem., **37**, 359–410.
 67. Wolfenden R. (1976) Ann. Rev. Biophys. and Bioengng, **5**, 271–306.
 68. Hansch C. (1972) J. Org. Chem., **37**, 92–95.
 69. Kreissler M. A., Akhmedov N. A., Arkhipova S. F., Lipkind G. M., Popov E. M. (1974) J. Chimie Phys., **71**, 913–919.
 70. Andreeva N. S., Gustchina A. E., Fedorov A. A., Shutzkever N. E., Volnova T. V. (1977) Adv. Exptl Biol. and Med., **95**, 23–31.
 71. Липкинд Г. М., Попов Е. М. (1971) Молекуляри. биология, **5**, 667–679.
 72. Антонов В. К. (1972) Докл. АН СССР, **205**, 839–842.
 73. Gerig J. T., Rimerman R. A. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **40**, 1149–1154.
 74. Poland D., Scheraga H. A. (1967) Biochemistry, **6**, 3791–3796.
 75. Лякишева А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1973) Молекуляри. биология, **7**, 810–816.
 76. Fastrez J., Fersht A. R. (1973) Biochemistry, **12**, 2025–2034.
 77. Antonov V. K., Ginodman L. M., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Gurova A. G., Rumsh L. D. (1978) FEBS Lett., **88**, 87–90.
 78. Антонов В. К., Явашев Л. П., Волкова Л. И., Садовская В. Л., Гинодман Л. М. (1979) Биоорган. химия, **5**, 1427–1429.
 79. James M. N., Hsu I. N., Delbare L. I. J. (1977) Nature, **267**, 808–813.
 80. Weaver L. H., Kester W. R., Matthews B. W. (1977) J. Mol. Biol., **114**, 119–132.
 81. Breslow R., Wernick D. L. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 1303–1307.
 82. Kirsch J. F., Jencks W. P. (1964) J. Amer. Chem. Soc., **86**, 833–837.
 83. Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S. (1969) Nature, **221**, 337–340.
 84. Birktoft J. J., Blow D. M. (1972) J. Mol. Biol., **68**, 187–240.
 85. Matthews D. A., Alden R. A., Birktoft J. J., Freer T., Kraut J. (1977) J. Biol. Chem., **252**, 8875–8883.
 86. Bochovchin W. W., Roberts J. D. (1978) J. Amer. Chem. Soc., **100**, 8041–8047.
 87. Хургина Ю. И., Бурштейн К. Я. (1974) Докл. АН СССР, **217**, 965–968.
 88. Winkler F. K., Dunitz J. D. (1971) J. Mol. Biol., **59**, 169–182.
 89. Bürgi H. B., Dunitz J. D., Shefter E. (1973) J. Amer. Chem. Soc., **95**, 5065–5067.
 90. Huber R., Kukla D., Bode W., Schwager P., Bartels K., Deisenhofer J., Steigmann W. (1974) J. Mol. Biol., **89**, 73–101.
 91. Bender M. L., Ginger R. D., Unik J. P. (1958) J. Amer. Chem. Soc., **80**, 1044–1048.
 92. Беляев Р. (1977) в кн.: Протон в химии, с. 110, «Мир», М.
 93. O'Leary M. H., Kluzet M. D. (1970) J. Amer. Chem. Soc., **92**, 6089–6090.
 94. Komiya M., Bender M. L. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **76**, 557–560.
 95. Lowe G., Yuthavong Y. (1971) Biochem. J., **124**, 107–115.
 96. Lowe G., Williams A. (1965) Biochem. J., **96**, 199–204.
 97. Brubacher L. J., Bender M. L. (1966) J. Amer. Chem. Soc., **88**, 5871–5880.
 98. Shipton M., Brocklehurst K. (1978) Biochem. J., **171**, 385–401.

99. Drenth J., Kalk K. H., Swen H. M. (1976) Biochemistry, **15**, 3731—3738.
100. Denburg J. L., Nelson R., Silver M. S. (1968) J. Amer. Chem. Soc., **90**, 479—486.
101. Knowles J. R. (1970) Phil. Trans. Roy. Soc. London, **B257**, 135—146.
102. Eigen M. (1964) Angew. Chem. Int. Ed., **3**, 1—14.
103. Kirby A. J., McDonald R. S., Smith C. R. (1974) J. Chem. Soc. (Perkin II), 1495—1504.
104. Fruton J. S., Fujii S., Knappenberger M. H. (1961) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **47**, 759—761.
105. Takahashi M., Wang T. T., Hoffmann T. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **57**, 39—46.
106. Antonov V. K., Rumsh L. D., Tichodeeva A. R. (1974) FEBS Lett., **46**, 29—33.
107. Михайлова А. Г., Пожарский С. Л., Костецкий П. В., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1977) Биоорганическая химия, **3**, 1090—1099.
108. Makinen M. W., Yamamura K., Kaiser E. T. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **73**, 3882—3886.
109. Hartsuck J. A., Lipscomb W. N. (1971) The Enzymes, **3**, 1—56.
110. Agros P., Garavito R. M., Eventoff W., Rossmann M. G., Branden C. I. (1978) J. Mol. Biol., **126**, 141—158.
111. Scheiner S., Lipscomb W. N. (1977) J. Amer. Chem. Soc., **99**, 3466—3472.
112. Groves J. T., Dias R. M. (1979) J. Amer. Chem. Soc., **101**, 1033—1035.

Поступила в редакцию
13.IX.1979

SPECIFICITY AND MECHANISMS OF ACTION OF PROTEOLYTIC ENZYMES

ANTONOV V. K.

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

The specificity and mechanisms of action of proteolytic enzymes have been analyzed on the basis of the author's data and those compiled in literature. The role of the secondary enzyme-substrate interactions is described in the framework of the two-stage formation of the productive complex. This scheme explains variations in the kinetic parameters of enzymic reaction when specificity is manifested as a maximal rate, an effective substrate binding or when the principle «better binding — better catalysis» is observed. It is shown that proteolytic enzymes hitherto studied can be divided according to their mechanism of action into two groups: either reacting with the substrate as a nucleophilic (covalent) catalyst, or acting as a general base catalyst at the stage of water addition to the cleavable bond.