

УДК 577.152.1

АКТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ ГИДРОЛАЗ: ОСНОВНЫЕ ТИПЫ СТРУКТУР И МЕХАНИЗМ КАТАЛИЗА

С. Д. Варфоломеев, А. Е. Пожитков

(кафедра химической энзимологии)

Статья написана по материалам доклада на междисциплинарном семинаре «Координационная химия и катализ» сделанного 15 ноября 1999 г. В работе проведен анализ структур каталитических участков активных центров гидролаз – ферментов, наиболее хорошо представленных в структурных базах данных. Оказалось, что, несмотря на очень большое разнообразие типов субстратов, участвующих в каталитическом процессе, число типов структур активных центров весьма ограничено. Выявлено пять основных типов каталитических центров гидролаз. В каждом из типов активных центров можно идентифицировать два основных компонента каталитического процесса: нуклеофильный (или электрофильный) агент, активирующий воду и электрофильный активатор реакционного центра. Высказано и подтверждено предположение, что согласованное действие этих двух компонентов активного центра обеспечивает эффективность ферментативного катализа. Основные положения иллюстрируются детальным описанием механизмов катализа α -химотрипсином, папаином, карбоксипептидазой, лизоцимом, пепсином, рибонуклеазой, органофосфатгидролазой, уреазой, пирофосфатазой, рестриктазой, щелочной фосфатазой, галоидалкандегалогеназой.

Ферментативный катализ, обеспечивающий реальные скорости биокаталитических процессов, обладает исключительно высокими каталитическими характеристиками. Сравнение ферментативных реакций с аналогичными неферментными каталитическими процессами показывает, что ферментативный катализ в 10^{10} – 10^{15} раз более эффективен в родственных реакциях. Усилия последних десятилетий были сосредоточены в основном на выяснении физико-химической природы специфичности ферментов. Методология этих исследований состоит в относительном сравнении кинетических характеристик субстратов различной структуры с поиском корреляции структура – реакционная способность [1–3]. При этом до настоящего времени открытым остается вопрос о причине столь высокой абсолютной эффективности ферментов как катализаторов химических реакций.

Нам представляется, что ответ на этот вопрос может быть найден на пути сравнения реальных структур активных центров ферментов с выявлением общих элементов, обеспечивающих ускорение процессов на элементарных химических стадиях. Основой для такого сравнения является богатая структурная информация, представленная в современных структурных базах данных.

Для проведения такого анализа нами были выбраны гидролазы, как наиболее изученный и хорошо представленный в базах данных класс ферментов. В настоящее время в классификации ферментов зарегистрировано 3705 ферментов, осуществляющих различные типы реакций. Гидролазы составляют около 30% от общего числа известных ферментов. Банк данных белковых структур содержит сведения о структурах нескольких тысяч белков, при этом число независимых структур (общее число структур за вычетом генетических модификаций) составляет около 300 [4].

Существуют экспериментально обоснованные представления о том, что в активных центрах фермента мож-

но условно выделить два участка: сорбционный и каталитический [1]. Сорбционный участок осуществляет образование комплекса субстрата с ферментом, он ответственен за селекцию субстрата и специфичность фермента. Каталитический центр представляет собой совокупность функциональных групп, осуществляющих перераспределение электронных плотностей и перенос групп непосредственно в химическом акте катализа.

Нами были проанализированы данные по структурам активных центров гидролаз с точки зрения сравнения ферментов по структурам активных центров. Вывод анализа оказался достаточно парадоксальным. Ферменты бесконечно вариабельны по структурам сорбционных участков активных центров и в высшей степени консервативны по структурам каталитических центров.

Идентификация групп, составляющих активный центр, представляет определенные трудности. Задача усложняется тем, что необходимо дискриминировать функциональные группы белка, входящие в каталитический и сорбционный участки активного центра. Значительную помощь в решении этой задачи оказала база данных SWISS-PROT, свободно доступная в сети Internet (<http://www.expasy.ch>). Для определенного числа структур белков, представленных в SWISS-PROT, идентифицированы аминокислоты, составляющие активный центр. Основными методами идентификации групп, образующих активный центр фермента являются химическая модификация, сайт-специфический мутагенез и данные, получаемые методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР.

База данных SWISS-PROT имеет поля, содержащие информацию об аминокислотах, составляющих активный центр фермента. Нами был разработан алгоритм и подготовлена компьютерная программа, производящая группировку заданного класса ферментов по сочетаниям аминокислот, составляющих активный центр. Результаты рабо-

ты программы явились основой первичной типизации гидролаз по структуре активных центров.

Для идентификации групп, составляющих каталитический центр и непосредственно участвующих в перераспределении электронных плотностей в процессе элементарных стадий катализа, использовали предположение о том, что эти группы находятся в непосредственной близости от молекулы воды, участвующей в гидролитическом процессе. Информация о классификации протеаз по типам каталитически существенных функциональных групп содержится в монографии В.К. Антонова [5]. Для анализа использовались данные, представленные в монографиях [6 – 8].

Основные типы каталитических центров гидролаз

Имидазольные и имидазол-карбоксилатные гидролазы

В идентификации типов активных центров гидролаз принципиально важным представляется определение нуклеофильной группы, непосредственно участвующей в активации воды. Для многих гидролаз этой группой является имидазольная группа гистидина. Каталитический центр гидролаз этого типа включает группы активации воды или гидроксильной (сульфгидрильной) группы серина или цистеина и часто цепь переноса протона в виде имидазольной группы гистидина и карбоксильной группы аспарагиновой или глутаминовых кислоты.

В табл. 1 приведены ферменты, осуществляющие активацию воды с участием имидазольной группы. Рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы включены в табл. 1 как аналоги панкреатической рибонуклеазы [8].

Типичным представителем этого типа ферментов являются химотрипсин, трипсин (сериновые протеазы) и папаин (цистеиновая протеаза). Механизм катализа этими ферментами часто включает промежуточное ацилирование гидроксильной или цистеиновой группы активного центра с образованием ацил-ферментных интермедиатов.

В гидролазах химотрипсинового типа идентифицируется цепь переноса протона с участием карбоксильной группы, принимающей участие в активации воды или гидроксильной группы серина на стадии ацилирования. Механизм катализа ферментами этого типа – предмет детального описания в ряде монографий [1, 5, 9]. Для α -химотрипсина активация воды осуществляется имидазолом His57, сопряженным водородной связью с Asp102. Активация субстрата с увеличением дефицита электронной плотности на реакционном центре осуществляется амидной группой Gly193 [5].

Цепи переноса протона отсутствуют в ферментах папаинового и рибонуклеазного типа. Для активации воды достаточно действия имидазольной группы. Важно подчеркнуть, что в активных центрах ферментов можно идентифицировать как нуклеофильный агент, активирующий воду, так и электрофильный агент, действующий на субстрат. Активация субстрата осуществляется электрофильными агентами, в роли которых могут принимать участие амидные группы. В химотрипсине это группа Gly193, в папаине – Gln19, в рибонуклеазе – амидная группа Gln11.

Карбоксильные гидролазы

Каталитически активный центр ферментов этого типа содержит две или несколько карбоксильных групп

(табл. 2). В эту группу ферментов входят ферменты, расщепляющие как сложные эфиры, амиды, так и простые эфирные связи. Обычно ферменты этой группы характеризуются рН-оптимумом при относительно низких значениях рН. Типичными представителями этой группы гидролаз являются пепсин и лизоцим. Протонированная карбоксильная группа принимает участие в активации субстрата в качестве обобщенной кислоты, депротонированная форма – в качестве основания при активации воды. Механизм согласованного действия двух карбоксильных групп, выступающих в качестве нуклеофила (активатора воды) и электрофила (активатора субстрата) – предмет детального обсуждения в литературе [5, 7].

В лизоциме карбоксильная группа Glu35 в протонированной форме активирует реакционный центр, а также путем донирования протона индуцирует дефицит электронной плотности. Карбоксильная группа Asp52 в депротонированной форме активирует воду по общесловному механизму, приближая реакционную способность воды к реакционной способности гидроксильного иона.

Zn^{2+} -, Co^{2+} -, Ni^{2+} -зависимые гидролазы

Активные центры ферментов этой группы содержат ионы металлов (Zn^{2+} , Co^{2+} или Ni^{2+}), образующиеся комплексы с белком весьма унифицированной структуры. Лигандами иона металла являются функциональные группы двух гистидинов (имидазол) и аспарагиновой или глутаминовой кислоты (карбоксильная группа). Гидролазы этого типа приведены в табл. 3.

Типичными представителями этой группы ферментов являются карбоксипептидаза А и термолизин. Ионы металла (Zn^{2+} или Co^{2+}) образуют комплексы с белком унифицированной структуры.

Как известно, ионы металла в активных центрах ферментов могут осуществлять две функции: 1) электрофильного агента, активирующего атакуемый реакционный центр; 2) электрофильного активатора воды – генератора гидроксильных ионов [10]. Комплекс иона металла в структуре активных центров карбоксипептидазы и термолизина выступает в виде электрофильного агента, активирующего атакуемый реакционный центр субстрата. Активация воды осуществляется основанием в виде депротонированной карбоксильной группы.

Примером такого же типа активации субстрата может служить ортофосфатгидролаза – фермент, катализирующий гидролиз фосфорорганических пестицидов, а также боевых отравляющих веществ типа зарин, зоман и Vx [11–15]. Схема активации субстрата может быть представлена в виде схемы, показанной на рис. 1.

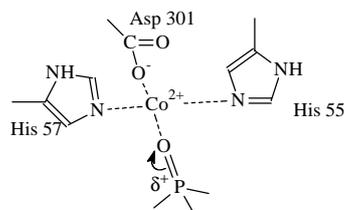


Рис. 1

Т а б л и ц а 1

Имидазольные и имидазол-карбоксилатные гидролазы

| № | ЕС | Фермент | № | ЕС | Фермент |
|----|-----------|--|----|-----------|--|
| 1 | 3.1.1.1 | Carboxylesterase | 46 | 3.4.21.38 | Coagulation factor XIIIa |
| 2 | 3.1.1.2 | Arylesterase | 47 | 3.4.21.39 | Chymase |
| 3 | 3.1.1.3 | Triacylglycerol lipase | 48 | 3.4.21.41 | Complement component Clr |
| 4 | 3.1.1.7 | Acetylcholinesterase | 49 | 3.4.21.42 | Complement component Cls |
| 5 | 3.1.1.8 | Cholinesterase | 50 | 3.4.21.43 | Classical-complement pathway C3/C5 convertase |
| 6 | 3.1.1.13 | Sterol esterase | 51 | 3.4.21.45 | Complement factor I |
| 7 | 3.1.1.34 | Lipoprotein lipase | 52 | 3.4.21.46 | Complement factor D |
| 8 | 3.1.1.47 | 2-acetyl-1-alkylglycerophosphocholine esterase | 53 | 3.4.21.47 | Alternative- complement pathway C3/C5 convertase |
| 9 | 3.1.21.1 | Deoxyribonuclease I | 54 | 3.4.21.48 | Cerevisin |
| 10 | 3.1.25.1 | Deoxyribonuclease(pyrimidine dimer) | 55 | 3.4.21.50 | Lysyl endopeptidase |
| 11 | 3.1.26.4 | Ribonuclease H | 56 | 3.4.21.53 | Endopeptidase La |
| 12 | 3.1.27.1 | Ribonuclease T2 | 57 | 3.4.21.54 | Gamma-renin |
| 13 | 3.1.27.3 | Ribonuclease T1 | 58 | 3.4.21.59 | Tryptase |
| 14 | 3.1.27.4 | Ribonuclease U2 | 59 | 3.4.21.61 | Kexin |
| 15 | 3.1.27.5 | Pancreatic ribonuclease | 60 | 3.4.21.62 | Subtilisin |
| 16 | 3.1.27.6 | Enterobacter ribonuclease | 61 | 3.4.21.63 | Oryzin |
| 17 | 3.1.27.10 | RRNA endonuclease | 62 | 3.4.21.64 | Proteinase K |
| 18 | 3.1.30.2 | Serratia marcescens nuclease | 63 | 3.4.21.65 | Thermomycolin |
| 19 | 3.1.31.1 | Micrococcal nuclease | 64 | 3.4.21.66 | Thermitase |
| 20 | 3.4.14.5 | Dipeptidyl-peptidase IV | 65 | 3.4.21.68 | T-plasminogen activator |
| 21 | 3.4.14.10 | Tripeptidyl-peptidase II | 66 | 3.4.21.69 | Protein C(activated) |
| 22 | 3.4.16.2 | Lysosomal Pro-X carboxypeptidase | 67 | 3.4.21.70 | Pancreatic endopeptidase E |
| 23 | 3.4.16.4 | Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase | 68 | 3.4.21.71 | Pancreatic elastase II |
| 24 | 3.4.16.5 | Carboxypeptidase C | 69 | 3.4.21.72 | IgA-specific serine endopeptidase |
| 25 | 3.4.16.6 | Carboxypeptidase D | 70 | 3.4.21.73 | U-plasminogen activator |
| 26 | 3.4.19.1 | Acylaminoacyl-peptidase | 71 | 3.4.21.74 | Venombin A |
| 27 | 3.4.21.1 | Chymotrypsin | 72 | 3.4.21.75 | Furin |
| 28 | 3.4.21.4 | Trypsin | 73 | 3.4.21.76 | Myeloblastin |
| 29 | 3.4.21.5 | Trombin | 74 | 3.4.21.77 | Semenogelase |
| 30 | 3.4.21.6 | Coagulation factor Xa | 75 | 3.4.21.78 | Granzyme A |
| 31 | 3.4.21.7 | Plasmin | 76 | 3.4.21.79 | Granzyme B |
| 32 | 3.4.21.9 | Enteropeptidase | 77 | 3.4.21.80 | Streptogrisin A |
| 33 | 3.4.21.10 | Acrosin | 78 | 3.4.21.81 | Streptogrisin B |
| 34 | 3.4.21.12 | Alpha-lytic endopeptidase | 79 | 3.4.21.82 | Glutamyl endopeptidase II |
| 35 | 3.4.21.19 | Glutamyl endopeptidase | 80 | 3.4.21.83 | Oligopeptidase B |
| 36 | 3.4.21.20 | Cathepsin G | 81 | 3.4.21.84 | Limulus clotting factor C |
| 37 | 3.4.21.21 | Coagulation factor VIIa | 82 | 3.4.21.86 | Limulus clotting enzyme |
| 38 | 3.4.21.22 | Coagulation factor Ixa | 83 | 3.4.21.93 | Proprotein convertase1 |
| 39 | 3.4.21.26 | Prolyl oligopeptidase | 84 | 3.4.21.94 | Proprotein convertase2 |
| 40 | 3.4.21.27 | Coagulation factor Xia | 85 | 3.4.21.95 | Snake venom factor V activator |
| 41 | 3.4.21.32 | Bradyurin | 86 | 3.4.21.96 | Lactocepin |
| 42 | 3.4.21.34 | Plasma kallikrein | 87 | 3.5.1.1 | Asparaginase |
| 43 | 3.4.21.35 | Tissue kallikrein | 88 | 3.5.3.3 | Creatinase |
| 44 | 3.4.21.36 | Pancreatic elastase | 89 | 3.8.1.5 | Haloalkane dehalogenase |
| 45 | 3.4.21.37 | Leukocyte elastase | | | |

Образование комплекса иона кобальта с субстратом приводит к индуцированию положительного заряда на реакционном атоме фосфора, что облегчает нуклеофильную атаку и нуклеофильное замещение.

Согласно [15], второй ион металла в активном центре органофосфатгидролазы выступает в виде генератора ионов OH⁻. Схема активации воды может быть представлена в виде схемы, показанной на рис. 2.

Ион металла выступает в качестве электрофильного агента, вытесняя протон из воды, что ведет к образованию в активном центре подвижного и высоко реакционноспособного гидроксильного иона.

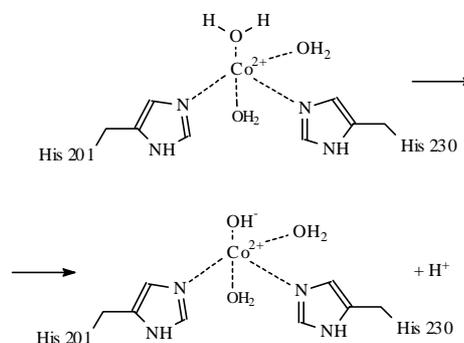


Рис. 2

Таблица 2

 Mg^{2+} , Mn^{2+} -зависимые гидролазы

Карбоксильные гидролазы

| № | ЕС | Фермент |
|----|-----------|--|
| 1 | 3.2.1.1 | Alpha-amylase |
| 2 | 3.2.1.2 | Beta-amylase |
| 3 | 3.2.1.3 | Glucan 1,4-alpha-glucosidase |
| 4 | 3.2.1.4 | Cellulase |
| 5 | 3.2.1.7 | Inulinase |
| 6 | 3.2.1.8 | Endo-1,4-beta-xylanase |
| 7 | 3.2.1.10 | Oligo-1,6-glucosidase |
| 8 | 3.2.1.14 | Chitinase |
| 9 | 3.2.1.17 | Lysozyme |
| 10 | 3.2.1.20 | Alpha-glucosidase |
| 11 | 3.2.1.21 | Beta-glucosidase |
| 12 | 3.2.1.23 | Beta-galactosidase |
| 13 | 3.2.1.25 | Beta-mannosidase |
| 14 | 3.2.1.260 | Beta-fructofuranosidase |
| 15 | 3.2.1.31 | Beta-glucuronidase |
| 16 | 3.2.1.33 | Amylo-1,6-glucosidase |
| 17 | 3.2.1.37 | Xylan 1,4-beta-xylosidase |
| 18 | 3.2.1.39 | Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase |
| 19 | 3.2.1.41 | Alpha-dextrin endo-1,6-alpha-glucosidase |
| 20 | 3.2.1.45 | Glucosylceramidase |
| 21 | 3.2.1.52 | Beta-N-acetylhexosaminidase |
| 22 | 3.2.1.54 | Cyclomaltodextrinase |
| 23 | 3.2.1.58 | Glucan 1,3-beta-glucosidase |
| 24 | 3.2.1.60 | Glucan 1,4-alpha-maltotetrahydrolase |
| 25 | 3.2.1.62 | Glycosylceramidase |
| 26 | 3.2.1.68 | Isoamylase |
| 27 | 3.2.1.73 | Licheninase |
| 28 | 3.2.1.76 | L-iduronidase |
| 29 | 3.2.1.78 | Mannan endo-1,4-beta-mannosidase |
| 30 | 3.2.1.81 | Agarase |
| 31 | 3.2.1.83 | Kappa-carrageenase |
| 32 | 3.2.1.85 | 6-phospho-beta-galactosidase |
| 33 | 3.2.1.86 | 6-phospho-beta-glucosidase |
| 34 | 3.2.1.91 | Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase |
| 35 | 3.2.1.108 | Lactase |
| 36 | 3.2.1.132 | Chitosanase |
| 37 | 3.2.1.135 | Neopullulanase |
| 38 | 3.4.23.1 | Pepsin A |
| 39 | 3.4.23.3 | Gastricin |
| 40 | 3.4.23.4 | Chymosin |
| 41 | 3.4.23.5 | Cathepsin D |
| 42 | 3.4.23.15 | Renin |
| 43 | 3.4.23.16 | Retropepsin |
| 44 | 3.4.23.18 | Aspergillopepsin I |
| 45 | 3.4.23.20 | Penicillopepsin |
| 46 | 3.4.23.21 | Rhizopuspepsin |
| 47 | 3.4.23.22 | Endothiapepsin |
| 48 | 3.4.23.23 | Mucoropepsin |
| 49 | 3.4.23.24 | Candidapepsin |
| 50 | 3.4.23.25 | Saccharopepsin |
| 51 | 3.4.23.29 | Polyporopepsin |
| 52 | 3.4.23.32 | Scytalidopepsin B |
| 53 | 3.4.23.34 | Cathepsin E |
| 54 | 3.4.23.35 | Barrierpepsin |
| 55 | 3.4.23.38 | Plasmepepsin I |
| 56 | 3.4.23.39 | Plesmipsin II |
| 57 | 3.4.23.40 | Phytepsin |
| 58 | 3.5.1.38 | Glutaminase-(asparagin)-ase |

Таким образом, ионы металла в активном центре могут играть двойную роль. Типичным поведением комплекса металла в активном центре гидролаз представляется его действие как сильного электрофильного агента, активирующего субстрат путем индуцирования на реакционном центре дефицита электронной плотности. Кроме того, комплекс металла может участвовать в электрофильной активации воды. Наиболее очевидно это распределение ролей ионов металлов при анализе структуры и механизма катализа Mg^{2+} (Mn^{2+})-зависимых ферментов, в частности неорганической пирофосфатазой [16 – 20].

Ионы металла, входящие в активный центр вместе с пирофосфатом, играют, по-видимому, вспомогательную роль. Субстрат фиксируется в активном центре фермента множеством ионных взаимодействий с участием положительно заряженных групп белка Lys193, Arg78, Lys56. Основные каталитические события разыгрываются, по-видимому, с участием двух других ионов металла Mg^{2+} или Mn^{2+} .

Лигандами высокоаффинного центра комплексообразования Mg^{2+} или Mn^{2+} являются карбоксильные группы Asp65, Asp70 и Asp102, а также три молекулы воды. Низкоаффинный центр для металла образуется карбоксильными группами остатков аспарагина, пятью молекулами воды и карбоксильной группой Glu20. Комплекс формально является положительно заряженным. Оправданным представляется предположение, что высокоаффинный центр выполняет функции электрофильного активатора воды (генератора гидроксильных ионов), а низкоаффинный – электрофильного агента, активатора субстрата (рис. 3).

К обсуждаемому типу активного центра можно отнести фруктоза-bis-фосфатазу (3.1.3.11), dUTP-пирофосфатазу (3.6.1.23), фосфорибозил-АТФ-пирофосфатазу (3.6.1.31), специфические рестриктазы и ДНК-полимеразы [21 – 25].

Согласованное действие нуклеофильного и электрофильного агента – основа эффективности гидролаз

Анализируя структуры активных центров гидролиза, можно выделить ограниченное число функциональных групп белка, способных играть роль нуклеофильных активаторов воды и электрофильных активаторов субстрата. В качестве общеоосновного активатора могут выступать депротонированная карбоксильная группа аспарагиновой или глутаминовой кислот, а также имидазольная группа гистидина*.

Депротонированная карбоксильная группа – основной нуклеофильный агент, активирующий воду. Эта активация может проходить как при непосредственном взаимодействии с молекулой воды, так и через имидазольное кольцо как проводник протона. Ион металла в комплексе с белковыми молекулами может выступать как электрофильный активатор воды. Список возможных

* Интересное исключение составляет пенициллинамидаза (ЕС 3.5.1.11), нуклеофильным активатором воды в которой выступает, по-видимому, N-концевая аминогруппа [26].

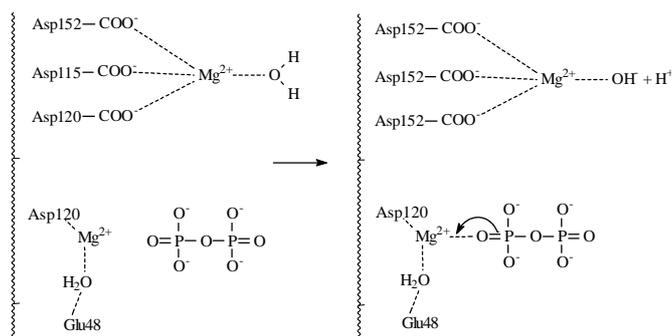


Рис. 3

электрофильных агентов несколько шире. В него входят карбоксильная группа аспарагиновой и глутаминовой кислот как донор протона, комплексы ионов металлов и амидные группы белка как возможные компоненты, образующие водородную связь с донированием протона в реакционный центр.

Существенным предположением данной концепции является положение о том, что в ферментативных гидролитических реакциях каталитические процессы идут под согласованным действием нуклеофильного и электрофильного агентов. Проведенный нами анализ структур и механизмов подтверждает это положение. При достаточно достоверной идентификации групп каталитического участка активного центра всегда можно обнаружить нуклеофил – активатор воды и электрофил – активатор реакционного центра субстрата.

Ограниченность числа возможных функциональных групп нуклеофилов и электрофилов приводит к ограниченному числу типов активных центров. Если суммировать данные о структуре активных центров, то можно выделить следующие типы нуклеофильных и электрофильных агентов, входящих в активные центры гидролаз.

Активаторы воды (или белкового нуклеофила при образовании ковалентного интермедиата)

- I_{αβ} – имидазол (α), имидазол-карбоксилат (β);
- II – карбоксильная группа в депротонированной форме;
- III – комплексы металлов (Mg²⁺, Mn²⁺) с карбоксильными группами;
- IV – комплексы металлов (Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺).

Электрофильные агенты

- 1 – амидная группа (амид пептидной цепи, аспарагин, глутамин);
- 2 – карбоксильная группа в протонированной форме, электрофилом является протон;
- 3 – комплексы ионов металлов: Zn²⁺, Co²⁺;
- 4 – комплексы Mg²⁺, Mn²⁺.

Если исходить из предположения, что для эффективного катализа необходимо согласованное участие нуклеофильной и электрофильной группы, возможное число комбинаций представляет матрица (рис. 4).

| | | | |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| I ₁ | I ₂ | I ₃ | I ₄ |
| II ₁ | II ₂ | II ₃ | II ₄ |
| III ₁ | III ₂ | III ₃ | III ₄ |
| IV ₁ | IV ₂ | IV ₃ | IV ₄ |

Рис. 4

На практике, однако, из шестнадцати возможных активных центров реализуются пять:

- I₁ – тип химотрипсина, рибонуклеазы, папаина;
- II₂ – тип лизоцима, пепсина;
- III₃ – тип карбоксипептидазы, термолизина;
- III₄ – тип пиррофосфатазы, рестриктаз;
- IV₃ – тип щелочной фосфатазы, органофосфатгидролазы.

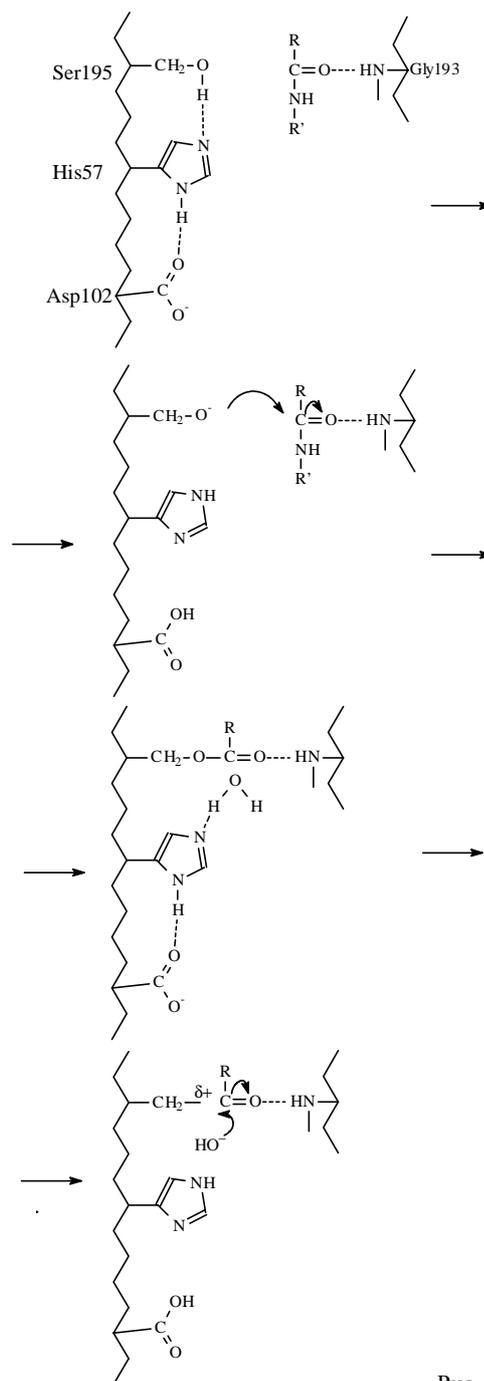


Рис. 5

Таблица 3

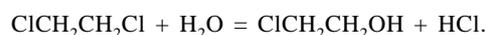
Zn²⁺ - и Co²⁺ - зависимые гидролазы

| № | ЕС | Фермент |
|----|-----------|--|
| 1 | 3.1.3.1 | Alkaline phosphatase |
| 2 | 3.1.3.2 | Acid phosphatase |
| 3 | 3.1.8.1 | Organophosphate hydrolase |
| 4 | 3.4.11.1 | Leucyl aminopeptidase |
| 5 | 3.4.11.2 | Membrane alanine aminopeptidase |
| 6 | 3.4.11.7 | Glutamyl aminopeptidase |
| 7 | 3.4.11.10 | Bacterial leucyl aminopeptidase |
| 8 | 3.4.13.19 | Membrane dipeptidase |
| 9 | 3.4.15.1 | Peptidyl-dipeptidase A |
| 10 | 3.4.15.5 | Peptidyl-dipeptidase Dcp |
| 11 | 3.4.17.1 | Carboxypeptidase A |
| 12 | 3.4.17.2 | Carboxypeptidase B |
| 13 | 3.4.17.3 | Lysine(arginine)carboxypeptidase |
| 14 | 3.4.17.10 | Carboxypeptidase H |
| 15 | 3.4.17.12 | Carboxypeptidase M |
| 16 | 3.4.17.15 | Carboxypeptidase A2 |
| 17 | 3.4.17.18 | Carboxypeptidase T |
| 18 | 3.4.17.19 | Thermostable carboxypeptidase 1 |
| 19 | 3.4.24.3 | Microbial collagenase |
| 20 | 3.4.24.7 | Interstitial collagenase |
| 21 | 3.4.24.11 | Nepilysin |
| 22 | 3.4.24.12 | Envelysin |
| 23 | 3.4.24.15 | Thimet oligopeptidase |
| 24 | 3.4.24.16 | Neurolysin |
| 25 | 3.4.24.17 | Stromelysin 1 |
| 26 | 3.4.24.18 | Meprin A |
| 27 | 3.4.24.21 | Astacin |
| 28 | 3.4.24.22 | Stromelysin 2 |
| 29 | 3.4.24.23 | Matrilysin |
| 30 | 3.4.24.24 | Gelatinase A |
| 31 | 3.4.24.26 | Pseudolysin |
| 32 | 3.4.24.27 | Thermolysin |
| 33 | 3.4.24.28 | Bacillolysin |
| 34 | 3.4.24.34 | Neutrophil collagenase |
| 35 | 3.4.24.35 | Gelatinase B |
| 36 | 3.4.24.36 | Leishmanolysin |
| 37 | 3.4.24.37 | Saccharolysin |
| 38 | 3.4.24.38 | Autolysin |
| 39 | 3.4.24.40 | Serralysin |
| 40 | 3.4.24.42 | Atrolysin C |
| 41 | 3.4.24.44 | Atrolysin E |
| 42 | 3.4.24.46 | Adamalysin |
| 43 | 3.4.24.52 | Trimerelysin I |
| 44 | 3.4.24.53 | Trimerelysin II |
| 45 | 3.4.24.55 | Pitriysin |
| 46 | 3.4.24.56 | Insulysin |
| 47 | 3.4.24.59 | Mitochondrial intermediate peptidase |
| 48 | 3.4.24.64 | Mitochondrial processing peptidase |
| 49 | 3.4.24.65 | Macrophage elastase |
| 50 | 3.4.24.66 | Choriolysin L |
| 51 | 3.4.24.67 | Choriolysin H |
| 52 | 3.4.24.68 | Tentoxilysin |
| 53 | 3.4.24.69 | Bontoxilysin |
| 54 | 3.4.24.70 | Oligopeptidase A |
| 55 | 3.4.24.71 | Endothelin-converting enzyme 1 |
| 56 | 3.4.24.72 | Fibrolase |
| 57 | 3.4.24.73 | Jararhagin |
| 58 | 3.4.24.74 | Fragilysin |
| 59 | 3.5.1.5 | Urease |
| 60 | 3.5.1.26 | N4-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase |

Проиллюстрируем эти типы катализа известными из литературы или реконструированными из структурных данных механизмами реакций.

Тип I₁

Схема катализа α-химотрипсином [5] представлена на рис. 5. Активация гидроксильной группы серина и воды осуществляет цепь переноса протона с участием имидазола и карбоксильной группы. Близкий механизм катализа наблюдается для реакций, протекающих по принципиально другому химическому пути. Примером может служить галоидалкандегалогеназа (ЕС 3.8.1.5). Фермент осуществляет гидролиз 1,2-дихлорэтана с образованием хлорид-аниона [27]:



Процесс протекает (рис. 6) с участием ковалентного эфирного интермедиата, образуемого Asp124 с 2-хлорэтановой группой, последующий гидролиз эфира приводит к образованию 1-окси-2-хлорэтана. Так же, как и в случае α-химотрипсина, на стадии деацилирования активного центра и на стадии гидролиза интермедиата принимает участие обобщенный нуклеофил в виде имидазольно-карбоксилатного комплекса (His289 – Asp260).

Как показано на рис. 7, для папаина и других сульфгидрильных протеаз активация сульфгидрильной группы и воды проходит без участия карбоксилат-аниона [5].

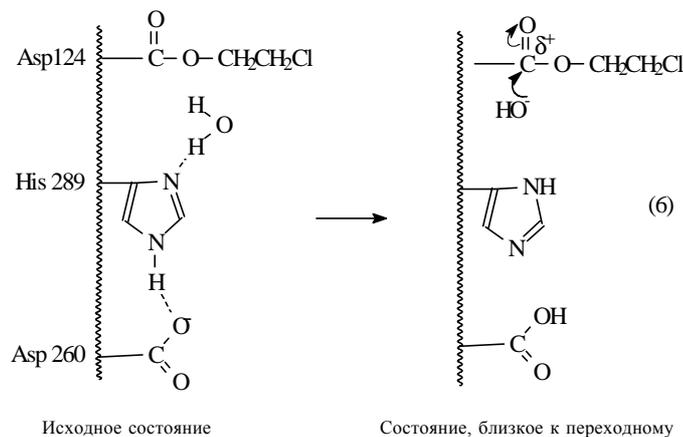


Рис. 6

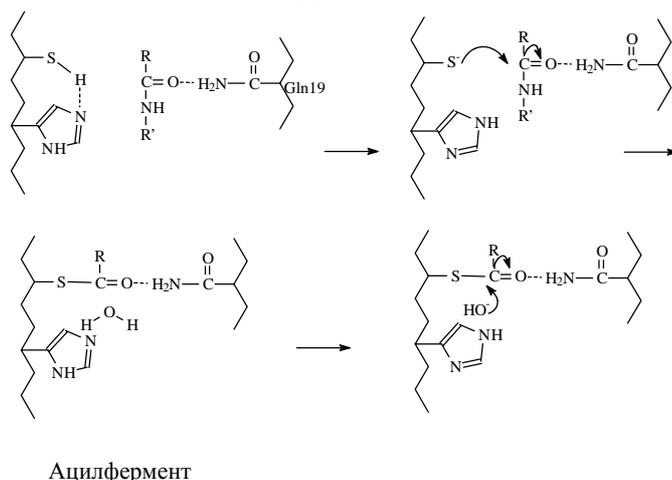


Рис. 7

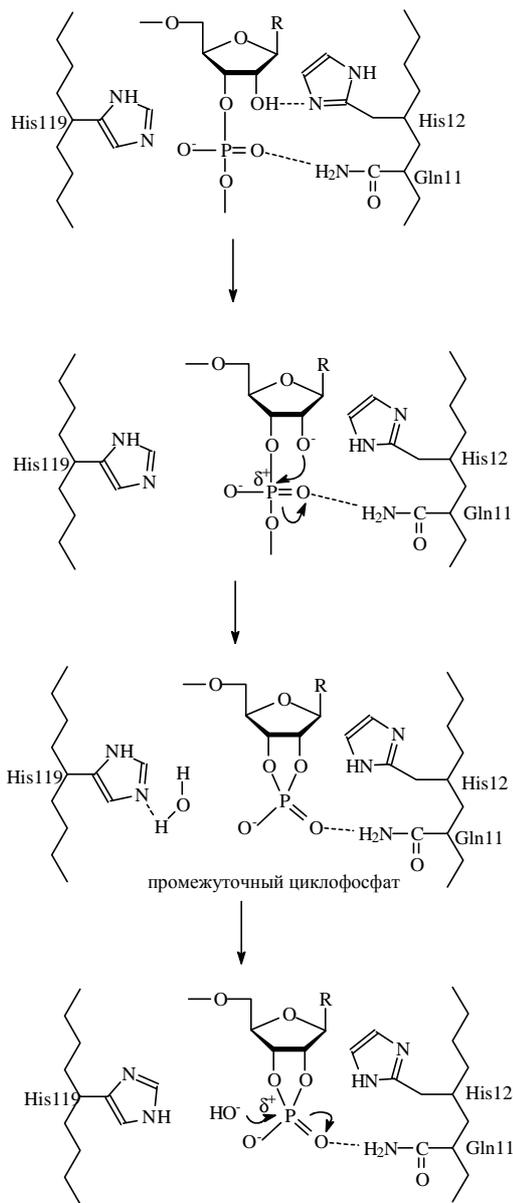


Рис. 8

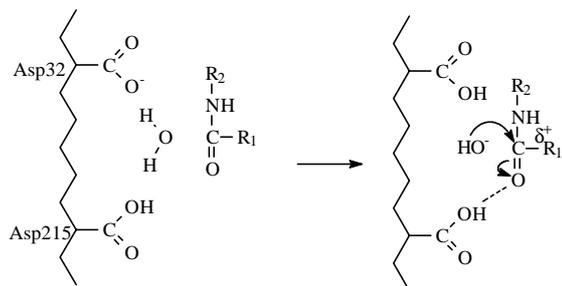


Рис. 9

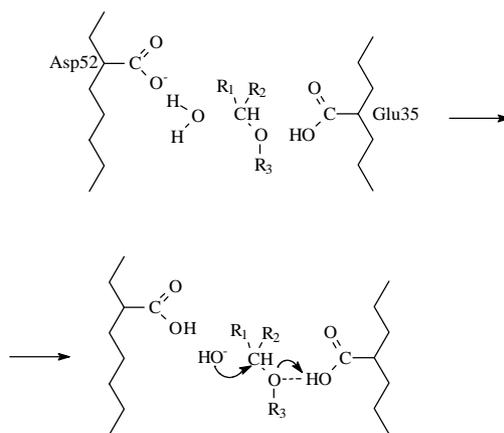


Рис. 10

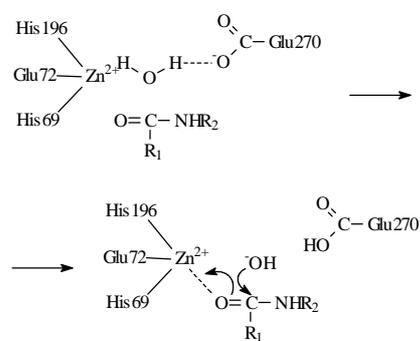


Рис. 11

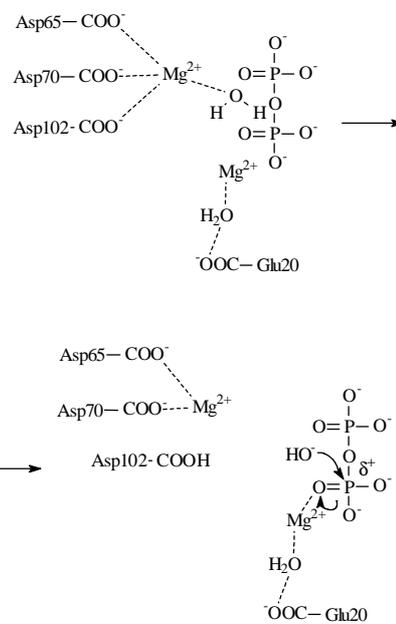


Рис. 12

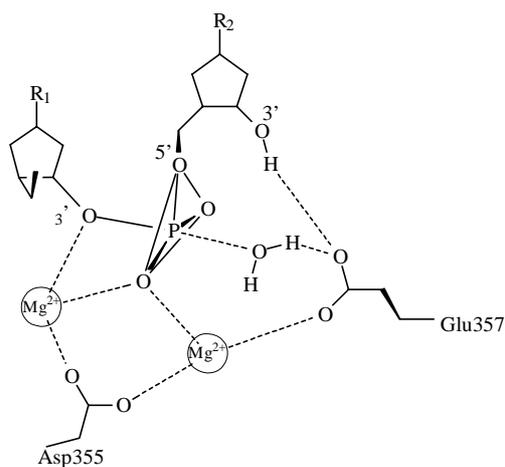


Рис. 13

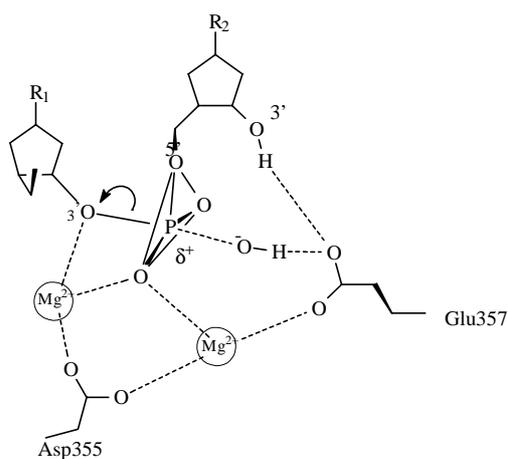


Рис. 14

В качестве электрофильного агента-активатора субстрата предполагается участие глутамата 19 [5].

В соответствии с устоявшимися представлениями [8], имидазольные группы выступают в качестве общесосновного активатора нуклеофила в панкреатической рибонуклеазе и в родственных ферментах. При этом амидную группу глутамата, так же, как и в случае папаина, можно рассматривать как электрофильный активатор субстрата (рис. 8).

Тип II₂

Реакции этого класса осуществляются под согласованным действием двух карбоксильных групп, одна из которых в ионной форме выступает в качестве нуклеофильного активатора воды, другая в протонированной форме «работает» как электрофильный активатор субстрата.

В аспартильных протеазах, типичным представителем которых является пепсин, процессы, происходящие в активном центре, можно представить в виде схемы, показанной на рис. 9.

Большая группа карбонгидролаз, осуществляющих гидролиз простых эфиров использует этот же механизм активации воды и атакуемого субстрата. Для наиболее изученного представителя этого класса ферментов, лизоцима, схема протекающих процессов представлена на рис. 10 [6].

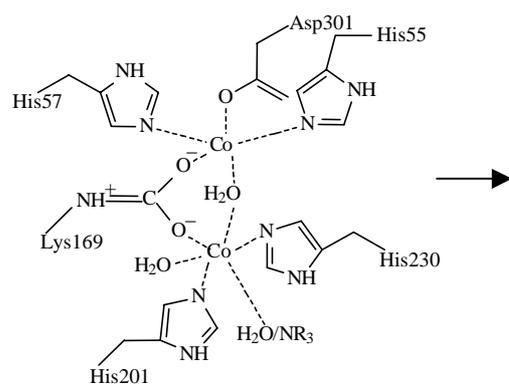


Рис. 15

Тип II₃

Ферменты этого типа используют активацию воды карбоксилатным анионом и электрофильную активацию атакуемого центра комплексом иона цинка, кобальта или никеля. «Классическим» представителем этого типа ферментов являются карбоксипептидазы (рис. 11) [5].

Тип III₄

Активные центры ферментов этого типа содержат ионы Mg^{2+} (или Mn^{2+}), один из которых, по-видимому, играет роль генератора гидроксильных ионов, другой – электрофильного активатора атакуемого центра. К ферментам этого типа можно отнести пирофосфатазы, ряд рестриктаз. Для пирофосфатазы схема процесса представлена на рис. 12.

Структура биметаллического активного центра 3'-5'-экзонуклеазы представлена на рис. 13 [21].

Структура, приближающаяся к переходному состоянию, представлена на рис. 14.

Тип IV₃

Каталитический гидролиз под действием ферментов этого типа протекает с согласованным участием двух комплексов ионов Zn^{2+} (или Co^{2+}). Примерами такого рода ферментов могут быть органофосфатгидролазы или щелочная фосфатаза. Для органофосфатгидролазы, проводящей гидролиз триэфиров фосфорной кислоты, схема каталитического действия может быть представлена так, как показано на рис. 15 [31].

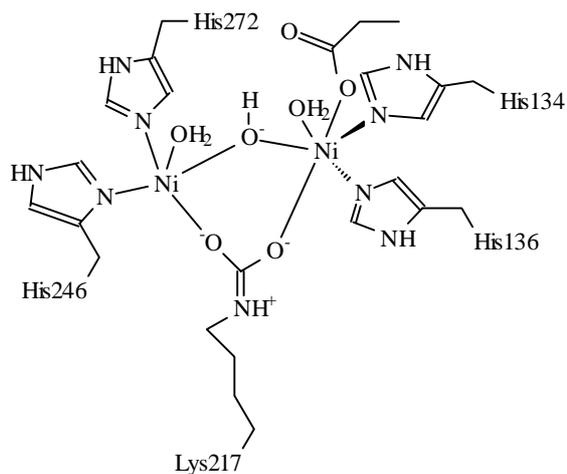


Рис. 16

Для сравнения на схеме представлена структура Ni-зависимой уреазы [28]. Видно, что активные центры Zn²⁺ (Co²⁺)-зависимой органофосфатгидролазы и Ni-зависимой уреазы полностью аналогичны (рис. 16).

Для щелочной фосфатазы из *E. coli* процессы активации, протекающие с фосфорилированием Ser102, по нашему мнению, наиболее адекватно отражает схема, представленная на рис. 17 (структурные данные работы [29]).

Какова физическая природа элементарных актов в перераспределении электронных плотностей в механизме катализа? Синхронные процессы с перемещением такого большого числа атомов физически невозможны. Это означает, что в активном центре должны относительно продолжительное время существовать короткоживущие про-

межуточные состояния, такие, как стабилизированное белком активированное состояние воды (в пределе – гидроксильный ион).

Таким образом, в активных центрах всех гидролаз, несмотря на бесконечное разнообразие субстратов и реакционных центров, в подавляющем числе случаев можно идентифицировать общекислотные и общесосновные группы, активирующие субстрат и воду. В обобщенном виде схема активации представлена на рис. 18.

В рамках этих представлений мы возвращаемся к Бренстеду (1924), впервые описавшему общесосновной и общекислотный катализ органическими молекулами. Количественные исследования Бренстеда и его многочисленных последователей выявили простые закономерности, связывающие кислотность и основность молекул с их каталитическими возможностями в ряду однотипных реакций [30].

Значение коэффициентов Бренстеда α и β лежат в интервале 0–1. В первом приближении эти величины могут быть интерпретированы как степень переноса протона в структуре, приближающейся к переходному состоянию.

Можно высказать несколько предположений, объясняющих в рамках рассматриваемых структурных особенностей активных центров высокую эффективность каталитических центров ферментов. Общекислотные и общесосновные процессы, протекающие в активных центрах ферментов, происходят с коэффициентами Бренстеда близкими к единице. В случае активации воды это означает, что какое-то время в активном центре фермента активированная форма воды представляет собой сольватированный белком гидроксильный ион, реакционная способность которого в реакции нуклеофильного заме-

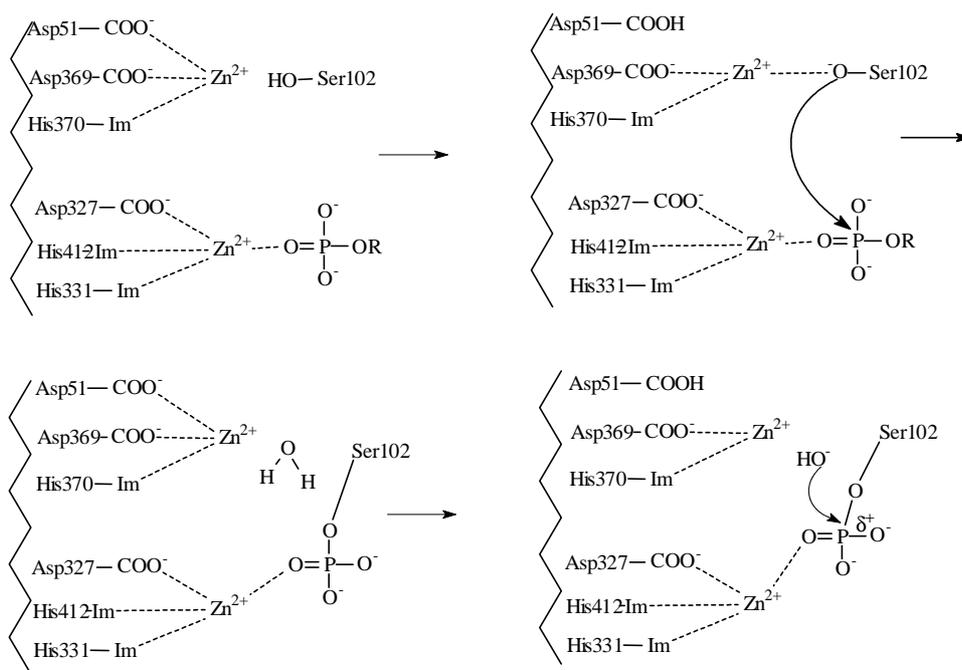


Рис. 16

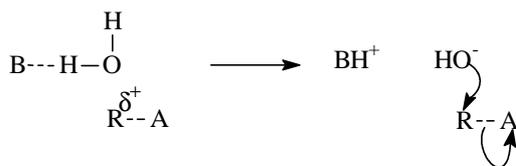


Рис. 17

щения в 10^7 раз выше, чем реакционная способность воды. При Бренстедовском коэффициенте единица, аналогичных увеличений реакционной способности можно ожидать и при общекислотной активации субстрата. Совместное действие этих эффектов должно приводить к ускорению (в 10^{10} – 10^{15} раз) соответствующей реакции. Это вполне соответствует диапазону ускорений, наблюдаемых в ферментативном катализе (см. выше). Принципиальным представляется выяснение природы механизмов, стабилизирующих реакционные частицы в активных центрах фермента. Увеличение времени жизни, прежде всего, должно быть связано с кинетическими механизмами, предотвращающими обратные процессы «схлопывания» разделенных зарядов. Помимо прямого белкового «сольватационного» эффекта стабилизации зарядов функциональными группами активного центра, возможно, существуют специфические белковые конформационные эффекты. Речь идет о небольших структурных изменениях активного центра, например конформационном повороте отдельных групп после стадии разделения зарядов. Возможно, найденные во многих ферментах системы переноса заряда

по термодинамическому потенциалу с участием ионогенных групп (например, имидазол-карбоксилатный комплекс) являются одной из форм стабилизации высокорекционной способности частицы в активном центре. Описанный в данной работе феномен инвариантности структур каталитических центров ферментов при практически бесконечной варируемости специфичности ферментов и, соответственно, сорбционных участков активного центра позволяет сформулировать ряд новых вопросов.

1. В чем причина такого ограниченного числа типов каталитических центров? Почему природа оказалась столь скудна на структуры? Можно высказать предположение, что возникновение эффективных каталитических структур типа описанных выше – событие в высшей степени редкое. Возникшие эволюционным или случайным образом структуры природа «запомнила» и научилась использовать во всем многообразии обсуждаемого класса ферментов.

2. Обсуждаемые типичные структуры являются трехмерным продуктом сворачивания полипептидной цепи различных белков, существенно различающихся по первичной структуре. Тем не менее, существует алгоритм сборки структур, позволяющий в нужной точке пространства локализовать необходимую функциональную группу. Этот алгоритм, по-видимому, определяется первичной последовательностью аминокислот и может быть назван вторичным кодом. Природа этого вторичного кода не очевидна и требует специального анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М., 1977.
2. Клесов А.А. Успехи биоорганического катализа. М., 1979.
3. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М., 1982.
4. Holm L., Sander C. // Science. 1996. **273**. 595.
5. Антонов В. К. Химия протеолиза. М., 1991.
6. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1982.
7. Полторак О.М., Чухрай Е.С. Физико-химические основы ферментативного катализа. М., 1971.
8. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М., 1992.
9. Bender M.L. Mechanism of homogeneous catalysis from proton to proteins. N.Y., 1971.
10. Неорганическая биохимия. М, 1978.
11. Crimsly J.K., Scholtz J.M., Pace C.N., Wild J.R. // Biochemistry. 1992. **36**. P. 14366.
12. Lay K., Dave K.I., Wild J.R. // J. Biol. Chem. 1994. **269**. P. 16579.
13. Danilova I.G., Ryabov A. D., Varfolomeev S. D. // J. Mol. Cat. 1997. **118**. P. 161.
14. Sergeeva V.S., Efremenko E.N., Kazankov G.M., Gladilin A.K., Varfolomeyev S.D. // Biotechnol. Techniques. 1999. **13**. P. 479.
15. Omburo G.A., Kuo J.M., Mullins L.S., Raushel F.M. // J. Biol. Chem. 1992. **267**. P. 13278.
16. Burton P.H., Hall D.C., Josse J. // J. Biol. Chem. 1970. **245**. P. 4346.
17. Аваева С.М., Назарова Т.И. // Успехи биологической химии. 1985. **26**. С. 42.
18. Oganessyan Yu.V., Kurilova S.A., Vorobyova N.N., Nazarova T.I., Popov A.N., Lebedev A.A., Avaeva S.M., Harutyunyan E.H. // FEBS Lett. 1974. **348**. P. 301.
19. Арутюнян Э.Г., Оганесян В. Ю., Оганесян Н.Н., Терзян С.С., Попов А.Н., Рубинский С.В., Вайнштейн Б.К., Назарова Т.И., Курилова С.А., Воробьева Н.Н., Аваева С.М. // Кристаллография. 1996. **41**. С. 84.
20. Harutyunyan E.H., Oganessyan V.Yu., Oganessyan N.N., Avaeva S.M., Nazarova T.I., Vorobyova N.N., Kurilova S.A., Huler R. // Biochemistry. 1996. **35**. P. 7754.
21. Beese L.S., Steitz T.A. // EMBO J. 1991. **10**. P. 25.
22. Steitz T.A. // J. Biol. Chem. 1999. **274**. P. 17395.
23. Sam D., Perona G.G. // Biochemistry. 1999. **38**. P. 6576.
24. Baldwin G.S., Sessions R.B., Erskine S.G., Halford S.E. // J. Mol. Biol. 1999. **288**. P. 87.
25. Viadiu H., Aggarwal A.K. // Nature. Struct. Biol. 1998. **5**. P. 910.
26. Duggleby H.J., Tolley S.P., Hill C.P., Dodson E.J., Dodson G., Moody P.C. // Nature. 1995. **373**. P. 264.
27. Verschueren K.H., Seljee F., Rozenbom H.J., Kalk K.H., Dijkstra B.S. // Nature. 1993. **363**. P. 693.
28. Pearson M.A. Schaller R.A. Michel L.O. Karplus P.A. Hausinger R.P. // Biochemistry. 1998. **37**. P. 6214.
29. Holtz K.M., Kantorovitz B.R. // FEBS Letters. 1999. **462**. P. 7.
30. Дженкс В. // Катализ в химии и энзимологии. М., 1972.
31. Sergeeva V.S., Efremenko E.N., Kazankov G.M., Varfolomeyev S.D. // J. Mol. Cat. 2000. In press.

Поступила в редакцию 10.03.2000