



УДК 577.152.342.042

© 1994 В. В. Мосолов

ИНГИБИТОРЫ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва*

Ключевые слова: ингибиторы; протеолитические ферменты.

Рассмотрены новые данные по механизму взаимодействия протеолитических ферментов с ингибиторами белковой природы. Наиболее распространен субстратоподобный механизм, которому следует большинство известных ингибиторов сериновых протеиназ. Другой механизм наблюдается в случае ингибирования тромбина гирудином и папаина цистатином из яичного белка и стефином В. Активационные пептиды, освобождающиеся в процессе активации зимогенов некоторых протеиназ, могут действовать как эффективные ингибиторы ферментов. Зимогены такого типа можно рассматривать как комплексы фермента с ингибитором, в которых компоненты связаны ковалентно.

По мере расширения наших знаний о протеолизе и особенно о его физиологических функциях [1—3] все большую актуальность приобретает изучение механизмов, контролирующих действие протеолитических ферментов. В последние годы показано существование сложных многоступенчатых систем регуляции, таких, например, как убиквитин- или кальцийзависимый протеолиз [4, 5]. Однако существует ряд основных, базовых механизмов регуляции, которые присущи всем протеолитическим системам и которые входят как составные элементы во все другие более сложные пути регуляции протеолиза. Один из таких элементарных механизмов связан с образованием протеолитических ферментов в форме неактивных предшественников — зимогенов, второй — с наличием в органах и тканях животных, а также у растений и микроорганизмов специфических веществ, действующих как ингибиторы протеолитических ферментов [1, 2, 6].

Отличительной чертой белковых веществ, действующих как ингибиторы протеиназ, является их способность к образованию с ферментами обратимых соединений (комплексов), характеризующихся низкими значениями констант диссоциации (K_i), лежащими в большинстве случаев в интервале 10^{-10} — 10^{-14} М [7]. При этом фермент полностью или частично утрачивает активность, которая восстанавливается при диссоциации комплекса. Если говорить о молекулярных механизмах, лежащих в основе образования комплексов ингибиторов с ферментами, то наиболее изучен в настоящее время так называемый субстратоподобный механизм [7]. Сущность этого механизма состоит в том, что ингибитор выступает как высокоспецифичный субстрат фермента-мишени, подвергающийся ограниченному, очень медленному протеолизу.

Для ингибиторов протеиназ, взаимодействующих по субстратоподобному механизму, характерны следующие отличительные признаки:

- 1) наличие определенным образом расположенной «чувствительной»

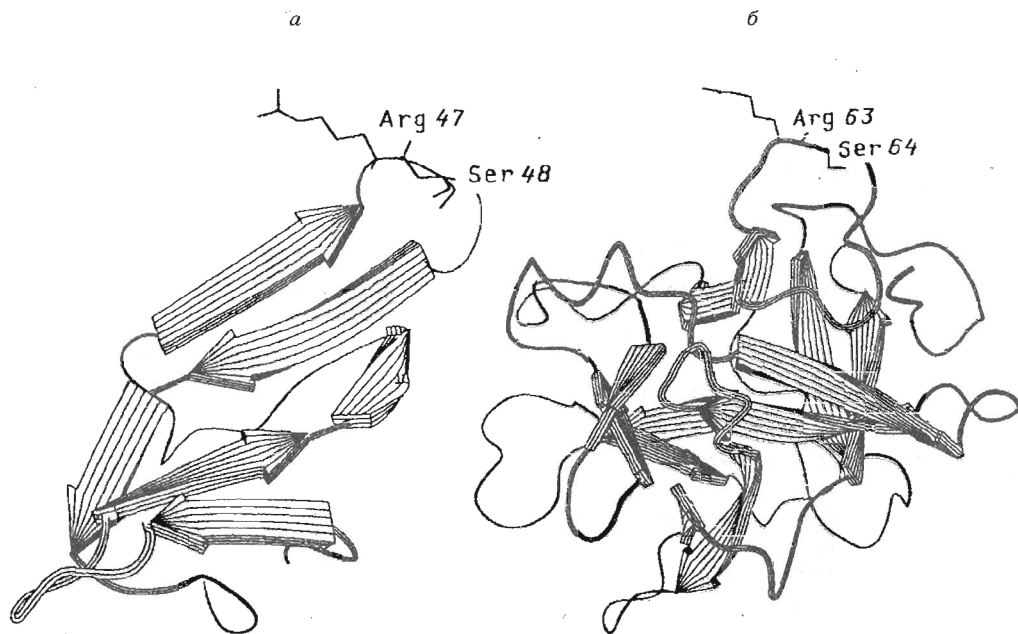


Рис. 1. Пространственная структура ингибиторов трипсина из семян маша (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) (а) и из эритроины (*Erythrina caffra*) (б). Остатки Arg—Ser соответствуют остаткам P_1 — P_1' реактивного центра [8]

пептидной связи ($-P_1-P_1'-$), образующей так называемый реактивный центр;

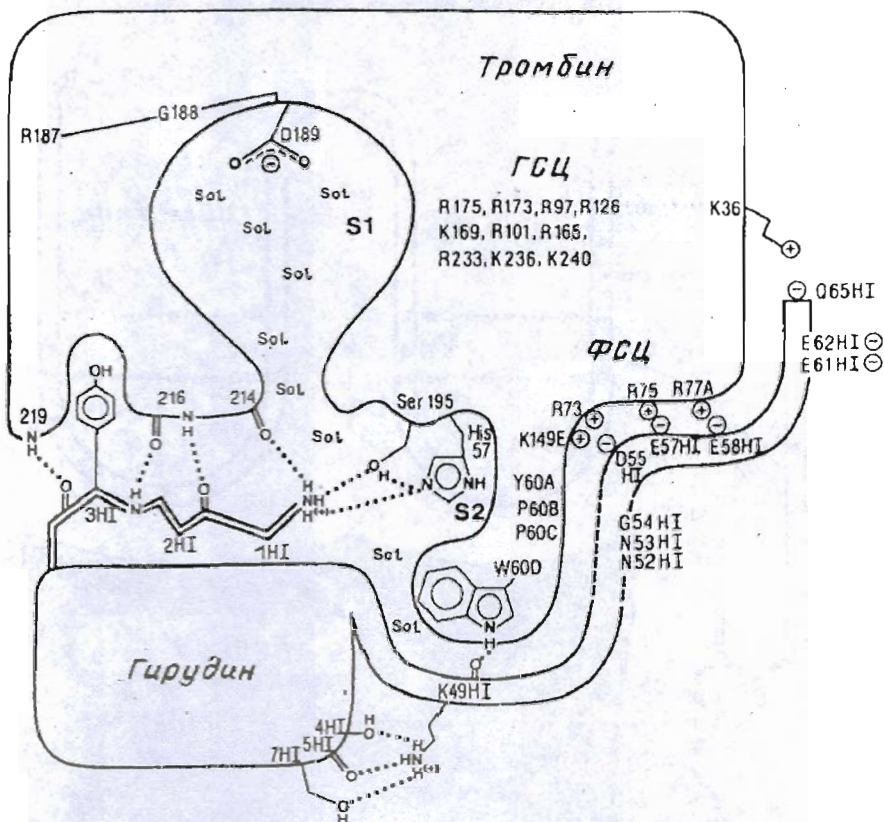
2) модификация или замена остатка P_1 в реактивном центре на другой аминокислотный остаток приводит к потере активности или к изменению специфичности;

3) взаимодействие с ферментом может сопровождаться расщеплением пептидной связи реактивного центра с образованием «модифицированного» ингибитора.

Кристаллографические исследования свободных ингибиторов и их комплексов с протеиназами позволили установить характерную структурную особенность, присущую ингибиторам, действующим по субстратоподобному механизму. Эта особенность заключается в наличии в их молекулах особым образом организованной «петли связывания», в которой располагается реактивный центр ингибитора [8]. Структура этой петли комплементарна области активного центра фермента-мишени и одинакова для всех ингибиторов, действующих на данную протеиназу или на различные протеиназы, имеющие сходное строение активного центра (рис. 1).

При образовании комплекса с ферментом «петля связывания» располагается в активном центре фермента подобно молекуле субстрата. Боковая цепь остатка P_1 реактивного центра ингибитора локализуется в субцентре S_1 активного центра протеиназы. При этом возникают многочисленные вторичные взаимодействия, характерные для соединения фермента с субстратом. Однако в отличие от гибкого пептидного субстрата «петля связывания» ингибитора имеет жесткую структуру. Структурная жесткость поддерживается как ковалентными связями (дисульфидные мостики), так и нековалентными взаимодействиями между аминокислотными остатками, образующими петлю, и остальной частью молекулы ингибитора. Эта жесткость, по-видимому, явля-

Строение комплекса гирудина с тромбином



Три N-концевых остатка ингибитора (1HI, 2HI и 3HI) образуют параллельную β -структуру с участком тромбина, включающим остатки Ser214-...-Gly219. Карбоксильный конец гирудина связан многочисленными солевыми мостиками с «вторичным центром связывания фибриногена». Карман первичной специфичности фермента (S1) заполнен молекулами растворителя (Sol) [9, 10]. ФСЦ — центр связывания фибриногена, ГЦЦ — центр связывания гепарина

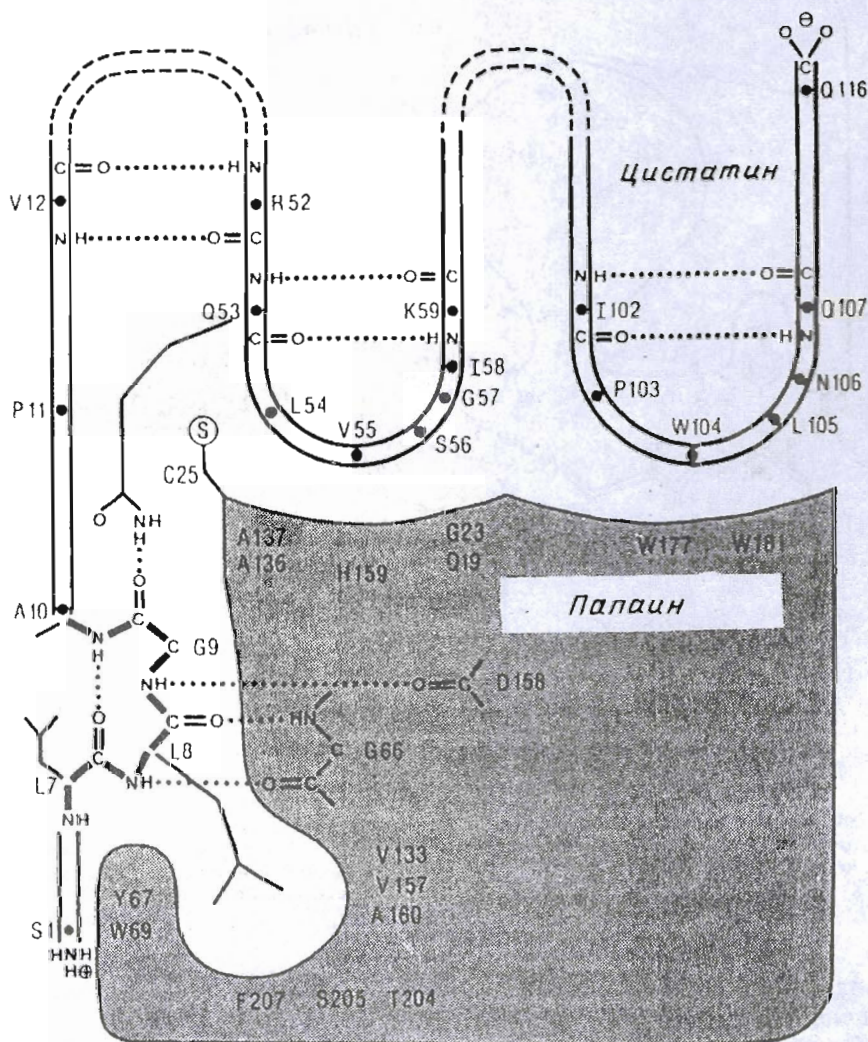
ется одной из причин, препятствующих расщеплению пептидной связи в реактивном центре ингибитора.

Субстратоподобному механизму следует подавляющее большинство известных в настоящее время ингибиторов сериновых протеиназ. В связи с этим его часто называют стандартным. Однако исследования последних лет показали, что могут существовать и другие механизмы взаимодействия ингибиторов с протеиназами. В 1990 г. были опубликованы результаты кристаллографических исследований комплекса тромбина с гирудином, специфическим ингибитором тромбина из слюнных желез медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* [9, 10] (схема 1).

Молекула гирудина содержит 65 аминокислотных остатков и состоит из двух частей: N-концевого домена, имеющего глобулярную структуру, и вытянутого C-концевого «хвоста». Основные контакты с тромбином (в составе комплекса) осуществляются при участии трех N-концевых аминокислотных остатков гирудина: Val-Val-Тур-....

Остаток Val1 занимает в активном центре тромбина субсайт S_2 и вступает в контакт с His57, а его атом азота образует водородную связь с Ser195 (O γ). Боковое кольцо Тур3 располагается в гидрофоб-

Строение комплекса цистатина из белка куриных яиц с папаином [14]



ной полости молекулы тромбина. В свою очередь С-концевой сегмент гирудина вступает во взаимодействие с анионным центром связывания фибриногена, при этом образуются 10 ионных пар и 23 водородные связи.

Множественные взаимодействия определяют высокое сродство гирудина к тромбину ($K_i 10^{-14}$ М) и высокую специфичность связывания. Однако главное отличие гирудина от ингибиторов, действующих по классическому субстратоподобному механизму, состоит в том, что при образовании комплекса карман первичной специфичности фермента (S_i) не участвует во взаимодействии. Он остается свободным и заполнен молекулами растворителя. Недавно были получены данные, показывающие, что ингибитор фактора X_a , выделенный из пиявки *Haementeria officinalis*, по всей вероятности, взаимодействует с ферментом по сходному механизму [11].

Приведенные выше данные относятся к ингибиторам сериновых протеиназ. Сведения относительно молекулярных механизмов взаимодействия с фермен-

Фермент	Активационный пептид (число остатков)	K_i , М	Ссылка
Пепсин (куриный)	42	$1 \cdot 10^{-8}$	[18]
Катепсин D	46	$3 \cdot 10^{-8}$	[18]
Папаин	107	—	[19]
Катепсин В	62	$0,4 \cdot 10^{-9}$	[20]
Субтилизин Е	77	$5,4 \cdot 10^{-7}$	[21]
α -Литическая протеиназа	166	$0,1 \cdot 10^{-9}$	[22]
Карбоксипептидаза А	94	$1,9 \cdot 10^{-9}$	[23]

тами ингибиторов протеиназ других классов до недавнего времени отсутствовали. Впервые в 1988—1990 гг. была исследована пространственная структура двух ингибиторов цистеиновых протеиназ, относящихся к суперсемейству цистатинов, — цистатина из яичного белка и стефина В из тканей человека, а также структура комплексов этих ингибиторов с папаином [12, 13].

Отличительная черта пространственной структуры цистатинов — наличие протяженной центральной α -спирали, около которой располагаются пять тяжелой антипараллельной β -структуры. Клинообразная часть молекулы комплементарна щели активного центра папаина, и на ее поверхности располагаются остатки, вступающие в непосредственный контакт с ферментом [14]. Взаимодействие с ферментом осуществляется при активном участии N-концевой последовательности ингибитора, а именно той ее части, которая начинается с консервативного для всех цистатинов остатка Gly9. Основной вклад вносят остатки Leu7 и в особенности Leu8 (схема 2).

Боковая цепь Leu8 располагается в субсайте S_2 фермента. Как известно, именно субсайт S_2 в значительной степени определяет субстратную специфичность папаина [15]. Как показали опыты с укороченными на N-конце формами цистатинов, удаление остатков Leu7 и Leu8 приводит к сильному (на три порядка) снижению сродства ингибитора к папаину. Принципиальное отличие от ингибиторов сериновых протеиназ, действующих по субстратоподобному механизму, заключается в том, что пептидная связь Gly9-Ala10 располагается на значительном удалении от остатка Cys25 активного центра фермента и по этой причине ее гидролиз в составе комплекса становится невозможным. Это согласуется и с тем фактом, что цистатины способны образовывать устойчивые комплексы не только с карбоксиметилированным папаином, но и с папаином, SH-группа активного центра которого блокирована специфическим ингибитором E-64 с его объемной боковой цепью. Другая особенность цистатинов — наличие дополнительного, «вторичного» центра связывания, включающего две петли, расположенные на поверхности молекулы ингибитора. Существенную роль играет одна из них, содержащая консервативную для большинства цистатинов последовательность QVVAG (в случае цистатина из яичного белка она имеет вид QLVSG) [14].

Приведенные выше результаты, полученные при изучении взаимодействия гирудина с тромбином, а также цистатинов с папаином, свидетельствуют о том, что оба механизма имеют определенные черты сходства: наличие дополнительных контактов, не затрагивающих область активного центра фермента; важный вклад N-концевых последовательностей ингибитора в образование стабильного комплекса. В связи с этим следует отметить, что, по последним данным, в образовании комплекса тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP-1 с ферментами

равное $0,4 \cdot 10^{-9}$ М при рН 6,0, возрастает более чем на порядок при снижении рН до 4,0 [20]. Сильная зависимость ингибиторной активности от рН может иметь в данном случае принципиальное значение. Действительно, если прокатепсин В подвергнется преждевременной активации в процессе внутриклеточного транспорта из цистерн эндоплазматического ретикулула в лизосомы, его активность будет нейтрализоваться активационным пептидом-ингибитором до тех пор, пока фермент не поступит в лизосомы с их низким значением рН [25]. Недавно появилось сообщение о получении рекомбинантного белка, аминокислотная последовательность которого имела 40%-ную степень подобия с пропоследовательностью катепсина L. Белок действовал как эффективный ингибитор ряда цистеиновых протеиназ, включая папаин и катепсины L и H. Значение K_i для катепсина L составляло 22 нМ [26].

Наиболее подробно изучено взаимодействие активационного пептида с ферментом в случае свиной карбоксипептидазы А. Активационный пептид, содержащий 94 аминокислотных остатка, освобождается при триптическом гидролизе в молекуле зимогена пептидной связи Arg94-Ala95. В связи с тем что пептид является сильным ингибитором карбоксипептидазы, кинетика освобождения ферментативной активности в процессе активации прокарбоксипептидазы А трипсином носит сложный характер и в значительной степени определяется скоростью протеолитической деградациии активационного пептида [27].

Для понимания молекулярного механизма ингибирующего действия пептида активации карбоксипептидазы А важное значение имела расшифровка пространственной структуры прокарбоксипептидазы В [28]. Молекула зимогена состоит из двух доменов: нижнего, большого, соответствующего собственно ферменту, и меньшего, активационного, расположенного сверху (рис. 2а). Последний, в свою очередь, состоит из глобулярной части и соединяющего пептида. На рис. 2б представлено наложение пространственной структуры карбоксипептидазы А и ферментативного домена прокарбоксипептидазы В. Поскольку обе структуры практически идентичны, можно сделать следующие допущения: а) структура и расположение пептидов активации одинаковы для карбоксипептидаз А и В; б) активация зимогена не сопровождается сколько-нибудь существенной перестройкой ферментативного домена. Как видно из рис. 2а, глобулярная часть активационного домена закрывает углубление на поверхности фермента, в котором располагается его активный центр. Несмотря на многочисленные взаимодействия, способ связывания домена активации отличается от способа связывания субстрата, и в первую очередь тем, что отсутствуют взаимодействия с субсайтами S_1 и S_1' .

Известно, что процесс активации зимогенов протеолитических ферментов связан с расщеплением единственной пептидной связи, расположенной в N-концевой части молекулы по отношению к активному центру фермента. При этом в принципе возможны две последовательности событий [1]:

- а) протеолиз индуцирует конформационные изменения, приводящие к завершению формирования активного центра фермента,
- б) в результате протеолиза происходит демаскирование уже полностью сформированного активного центра.

Примером зимогенов, активация которых следует первому пути, могут служить трипсиноген и химотрипсиноген. В этом случае освобождающиеся в процессе активации пептиды имеют малые размеры и не обладают собственной активностью [2].

Во втором варианте освобождающиеся пептиды активации имеют значительные размеры (таблица) и во многих случаях способны подавлять активность соответствующей протеиназы. Таким образом, зимогены второго типа можно рассматривать как одну из форм соединения фермента с ингибитором, в котором ингибитор связан с ферментом ковалентно. В дальнейшем, когда эта связь расщепляется в процессе активации, ингибиторный домен может оставаться соединен-

ным в нековалентном комплексе с ферментом. Требуется дополнительные воздействия, такие, как изменение pH или протеолитическая деградация ингибиторной последовательности, чтобы получить фермент в полностью активном состоянии. Указанная последовательность событий обеспечивает как бы двойной контроль в процессе активации зимогенов и, по-видимому, является важным приспособлением, предотвращающим преждевременное освобождение протеолитической активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neurath H., Walsh K. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. № 11. P. 3825—3832.
2. Neurath H. // Science. 1984. V. 224. P. 350—357.
3. Локишина Л. А., Былинкина В. С. // Успехи соврем. биологии. 1990. № 109. № 2. С. 219—237.
4. Hershko A. // Trends Biochem. Sci. 1991. V. 16. № 7. P. 265—268.
5. Murachi T. // Biochem. Int. 1989. V. 18. № 2. P. 263—294.
6. Мосолов В. В., Валуева Т. А. // Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. / Ред. Кретович В. Л. Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН. М. 1993: 207 с.
7. Laskowski M., Jr., Kato I. // Ann. Rev. Biochem. 1980. V. 49. P. 593—626.
8. Bode W., Huber R. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. № 2. P. 433—451.
9. Rydel T. J., Ravichandran K. G., Tulinsky A., Bode W., Huber R., Roitsch C., Fenton J. W. II. // Science. 1990. V. 249. P. 277—280.
10. Grütter M. G., Priestle J. P., Rahuel J., Grossenbacher H., Bode W., Hofsteenge J., Stone S. R. // EMBO J. 1990. V. 9. № 8. P. 2361—2365.
11. Dunwiddie C. T., Nepper M. P., Nutt E. M., Waxman L., Smith D. E., Hofmann K. J., Lumma P. K., Garsky V. M., Vlasuk G. P. // Biochemistry. 1992. V. 31. № 48. P. 12126—12131.
12. Bode W., Engh R., Musil D., Thiele U., Huber R., Karshikov A., Brzin J., Kos J., Turk V. // EMBO J. 1988. V. 7. № 8. P. 2593—2599.
13. Stubbs M. T., Laber B., Bode W., Huber R., Jerala R., Lenarcic B., Turk V. // EMBO J. 1990. V. 9. № 6. P. 1939—1947.
14. Turk V., Bode W. // FEBS Lett. 1991. V. 285. № 2. P. 213—219.
15. Berger A., Schechter I. // Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B. 1970. V. 257. P. 249—264.
16. Murphy G., Houbrechts A., Cockett M. I., Williamson R. A., O'Shea M., Docherty A. J. P. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 33. P. 8097—8102.
17. Herriott R. M. // J. Gen. Physiol. 1941. V. 24. P. 325—338.
18. Fusek M., Mareš M., Vágner J., Voburka Z., Baudyš M. // FEBS Lett. 1991. V. 287. № 1, 2. P. 160—162.
19. Vernet T., Khouri H. E., Laflamme P., Tessier D. C., Musil R., Gour-Salin B. J., Storer A. C., Thomas D. Y. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 32. P. 21451—21457.
20. Fox T., DeMiguel E., Mort J. S., Storer A. C. // Biochemistry. 1992. V. 31. № 50. P. 12571—12576.
21. Ohta Y., Hojo H., Aimoto S., Kobayashi T., Zhu X., Jordan F., Inouye M. // Mol. Microbiol. 1991. V. 5. № 6. P. 1507—1510.
22. Baker D., Sohl J. L., Agard D. A. // Nature. 1992. V. 356. P. 263—265.
23. San Segundo B., Martínez M. C., Vilanova M., Cuchillo C. M., Avilés F. X. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 707. № 1. P. 74—80.
24. Rees D. C., Lipscomb W. N. // J. Mol. Biol. 1982. V. 160. № 3. P. 475—498.
25. Nishimura Y., Kato K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 148. № 1. P. 254—259.
26. Delaria K., Fiorentino L., Wallace L., Kamarck M., Tamburini P., Brownell E., Muller D. // 9th Int. ICOP conference. Williamsburg. 1992. Abstr. P. 59.
27. Vendrell J., Cuchillo C. M., Avilés F. X. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 12. P. 6949—6953.
28. Coll M., Guash A., Avilés F. X., Huber R. // EMBO J. 1991. V. 10. № 1. P. 1—9.

Поступила в редакцию
8.VII.1993

PROTEIN INHIBITORS OF PROTEOLYTIC ENZYMES

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

New data on the mechanism of interaction between proteolytic enzymes and protein inhibitors are presented. Most of known serine proteinase inhibitors bind to proteolytic enzymes through a substrate-like mechanism. A different mechanism is observed in the case of the inhibition of thrombin by hirudin and of papain by cystatin (from egg white) and stephin B. Protopeptides released during activation of some proteinase zymogens may act as efficient enzyme inhibitors. Such zymogens can be considered as covalently bound enzyme-inhibitor complexes.