



УДК 577.15.04

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСПАРТАТНЫХ ПРОТЕИНАЗ. I. ТЕОРИЯ И МЕТОД

© 1996 г. Е. М. Попов, И. В. Кашпаров, М. Е. Попов<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 15.11.95 г.

Проанализированы экспериментальные подходы к изучению ферментативных реакций и существующие концепции биокатализа, рассмотрены сформированные на их основе представления о стереохимических особенностях функционирования аспартатных протеиназ. Изложены основные положения общей теории биокатализа, которая, опираясь на теории структурной и структурно-функциональной организации молекул фермента и субстрата, позволяет количественно описать каталитический акт как непрерывный, спонтанно протекающий и взаимообусловленный на всех своих стадиях процесс.

*Ключевые слова:* механизм действия, аспартатные протеиназы, ферментативный катализ.

Настоящая статья открывает серию наших публикаций, посвященных теоретическому рассмотрению конформационных и химических аспектов механизма действия аспартатных протеиназ и количественному описанию их каталитических актов как спонтанно протекающих, взаимообусловленных на всех стадиях процессов. В статье проанализированы возможные подходы к исследованию ферментативного катализа и изложены теория и метод расчета фермент-субстратных взаимодействий, используемые нами в последующих публикациях.

Аспартатные (карбоксильные) протеиназы вместе с сериновыми, цистеиновыми и металлопротеиназами образуют группу эндопептидаз, входящую в состав амидгидролаз [1]. Они обнаруживаются в тканях животных (пепсин, катепсин, химозин, ренин и др.), растений (аспартатные протеиназы семян лотоса, гречихи, пшеницы и др.), в микроорганизмах (пенициллопепсин, эндотиапепсин, ризопуспепсин и др.) и ретровирусах (протеиназы вирусов иммунодефицита человека, саркомы Роуза и др.).

Значимость медико-биологического изучения этих ферментов связана с той ролью, которую некоторые из них играют в отношении контроля ряда процессов жизнедеятельности человека (ренин – в регуляции почечного кровотока и системного кровяного давления, катепсин D – в превращении белков и т.д.). Интерес к аспартатным протеиназам особенно возрос в последнее время в связи с обнаружением этих ферментов у ретровирусов, вызывающих в организме человека и животных такие заболевания, как СПИД, некоторые виды лейкозов, сарком и опухолей молочных желез

[2, 3]. Аспартатные протеиназы играют ключевую роль в жизненных циклах вирусных частиц [4], благодаря чему эти ферменты стали весьма привлекательными мишенями антивирусной терапии.

Представление о каталитических реакциях аспартатных протеиназ формируется на основе существующих концепций ферментативного катализа, рентгеноструктурного анализа ферментов, химических, термодинамических и кинетических исследований представителей этого семейства и соответствующих неферментативных реакций, катализируемых относительно простыми органическими соединениями. Долгое время заметное влияние оказывали также данные о других протеолитических ферментах, особенно сериновых и цистеиновых, изучение которых как в экспериментальном, так и в теоретическом отношении началось раньше, шло более быстрыми темпами и вплоть до конца 80-х годов опережало аналогичные исследования аспартатных протеиназ (подробнее см. в [1, 5]).

Однако после обнаружения аспартатных протеиназ у ретровирусов их изучение стало развиваться столь стремительно, что уже через несколько лет они стали одними из наиболее тщательно экспериментально исследованных ферментов. Самое большое внимание было уделено аспартатной протеиназе HIV-1, результаты исследования структуры и функции которой, по-видимому, в наиболее полной мере отражают возможности современной энзимологии.

### 1. Представление о механизме действия аспартатных протеиназ

Исследования аспартатных протеиназ доказали, что осуществляемый ими гидролиз пептидной связи относится к невалентному типу [1, 6–8].

<sup>#</sup> Автор для переписки (E-mail: popov@enzyme.siobc.ras.ru).

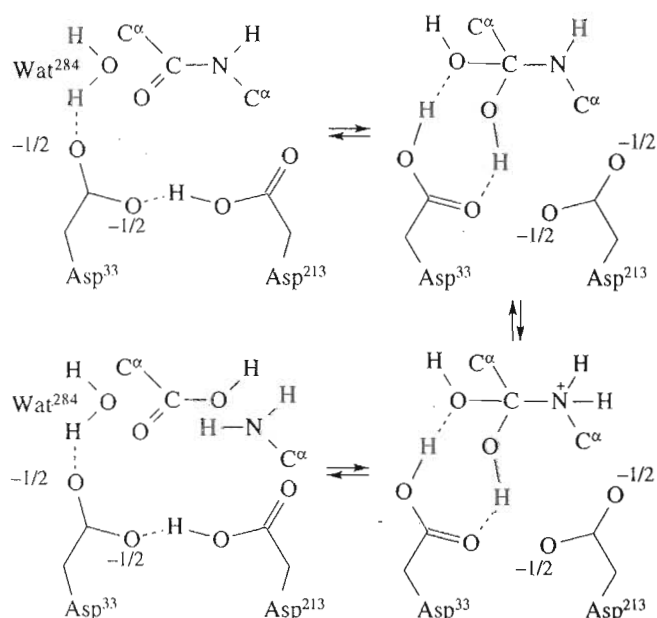


Рис. 1. Схема механизма катализа аспартатных протеиназ, предложенная М. Джеймсом и А. Силецки [9].

Что же касается конкретного механизма каталитической реакции, то единого мнения здесь нет. Отметим несколько предложенных гипотетических моделей ферментативного действия аспартатных протеиназ, при разработке которых был использован практически весь доступный на сегодняшний день экспериментальный материал, в том числе данные рентгеноструктурного анализа ферментов и их ингибиторных комплексов, полученных с удовлетворительным разрешением.

Первую стереохимическую модель предложил М. Джеймс и А. Силецки в 1985 г. [9], используя для этого кристаллографическую структуру пенициллопепсина, расшифрованную с разрешением 1.8 Å [9, 10]. О механизме действия аспартатных протеиназ и до этого был уже высказан целый ряд соображений, опирающихся на знание трехмерных структур ферментов [11–16]. Однако все они в той или иной степени имели незавершенный характер и не претендовали на последовательное описание всего процесса гидролиза пептидной связи, катализируемого аспартатными протеиназами.

В стереохимической модели продуктивного невалентного комплекса Михаэлиса, построенного Джеймсом и Силецки [9], важная роль принадлежит молекуле воды  $\text{Wat}^{284}$  (рис. 1). В активном центре пенициллопепсина, по мнению авторов, она занимает место, одновременно удобное и для образования с боковой цепью  $\text{Asp}^{33}$  эффективной водородной связи, что повышает ее нуклеофильность, и для атаки на атом карбонильного углерода гидролизуемой связи, что ведет к ослаблению последней. В этом же направлении действует

протонированная карбоксильная группа остатка  $\text{Asp}^{213}$ , поляризуемая посредством водородной связи карбонильную группу субстрата и выступающая, таким образом, в качестве электрофильного компонента системы.

Отмеченные три взаимодействия инициируют разрушение делокализованной  $\pi$ - $n$ -электронной системы расщепляемой пептидной связи, пирамидализацию атомов азота и карбонильного углерода, появление при последнем гем-гидроксильных групп и вовлечение одной из них в водородное связывание с протонированной карбоксильной группой  $\text{Asp}^{33}$ . Эти изменения приводят к образованию тетраэдрического промежуточного соединения. Возвращение неподеленной пары электронов к атому азота усиливает его склонность к протонизации, которая, согласно [9], может осуществляться двумя равновероятными способами. В одном из них предполагается инверсия конфигурации связей атома N, которая происходит путем поворота аминной группы субстрата на  $\sim 60^\circ$  вокруг связи C–N. В результате неподеленная электронная пара оказывается экспонированной в сторону растворителя и азот легко поддается протонизации, особенно у аспартатных протеиназ с сильнонокислым pH-оптимумом. Альтернативный способ включает переход протона к атому N от одной из гидроксильных групп тетраэдрического аддукта, находящегося в *син*-конфигурации по отношению к неподеленной электронной паре азота. Образовавшееся соединение неустойчиво и распадается на две части, одна из которых включает аминогруппу, а другая – карбоксильную группу (рис. 1).

Исходное предположение Джеймса и Силецки [9] о том, что нуклеофилом в каталитической реакции аспартатных протеиназ является молекула  $\text{Wat}^{284}$ , оспаривается К. Сугуной и сотр. [17], имеющих иное видение механизма действия ферментов. Сконструированная ими стереохимическая модель основана на кристаллографических данных о трехмерных структурах нативного ризоупспепсина [18] и его комплекса с октапептидным ингибитором, имеющим восстановленную пептидную связь, расщепляемую в случае субстрата.

В качестве нуклеофила авторы [17] выбрали молекулу воды  $\text{Wat}^{507}$  ( $\text{Wat}^{39}$  в нумерации пенициллопепсина), локализованную между двумя карбоксильными группами остатков  $\text{Asp}^{35}$  и  $\text{Asp}^{218}$  и образующую с ними три водородных связи (рис. 2). Предполагается, что молекула  $\text{Wat}^{507}$  не подвергнется вытеснению субстратом, поскольку при его сорбции гидролизуемая пептидная связь, испытывая стерические затруднения, принимает неплоскую, энергетически невыгодную конфигурацию. В этом положении субстрата карбонильный углерод расщепляемой связи оказывается против атакующего атома  $\text{Wat}^{507}$ , а кислород этой же группы располагается на оптимальном для водородной

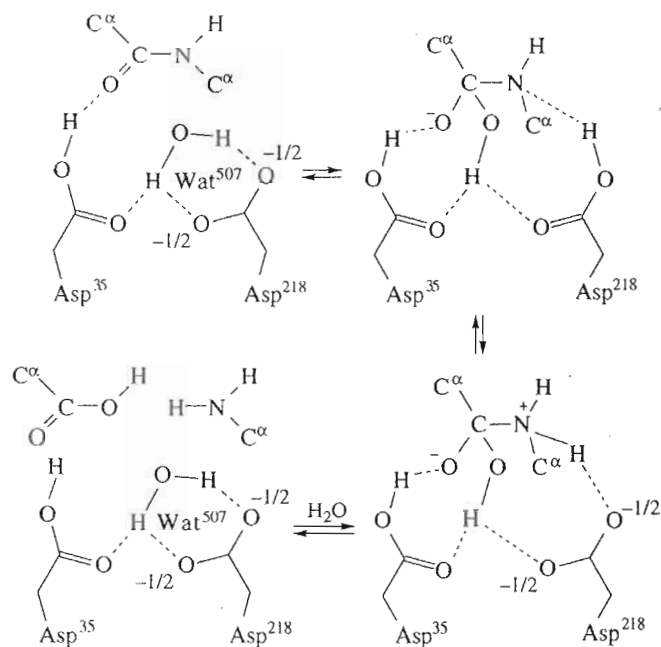


Рис. 2. Схема механизма катализа аспартатных протеиназ, предложенная К. Сугуной и сотр. [17].

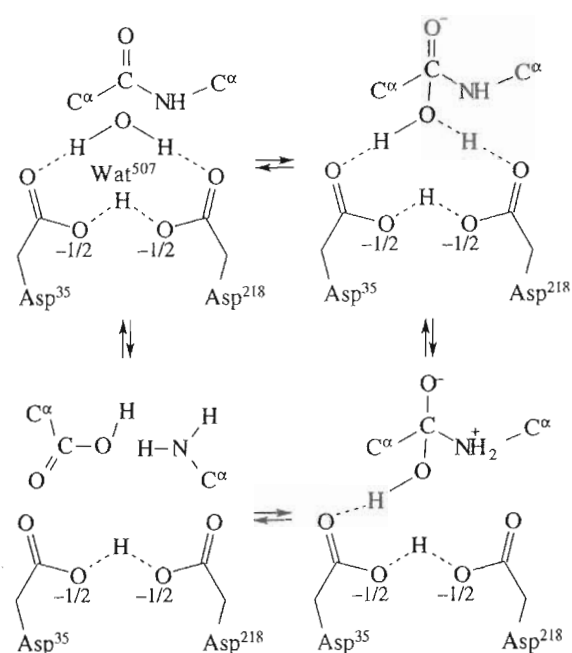


Рис. 3. Схема механизма катализа аспартатных протеиназ, предложенная Л. Перлом [19].

связи расстояний от карбоксильной группы боковой цепи Asp<sup>35</sup>. В результате образования тетраэдрического аддукта группа OH молекулы воды переходит к субстрату, а атом H – сначала к карбоксилату Asp<sup>218</sup>, а затем – к азоту. Реорганизация промежуточного соединения ведет к разрыву пептидной связи субстрата, десорбции продуктов реакции и восстановлению активного центра.

В схеме каталитической реакции аспартатных протеиназ, предложенной Л. Перлом [19], нуклеофилом, как и в только что рассмотренной схеме Сугуны и сотр. [17], является молекула воды Wat<sup>507</sup> (рис. 3). Новое в модельном описании Перла состоит в предположении равенства констант кислотности и, следовательно, электронной эквивалентности карбоксильных групп остатков Asp<sup>25</sup> и Asp<sup>218</sup>, имеющих обобщенный протон, и, вторых, во введении в качестве электрофильного компонента, дополнительно поляризующего карбонильный кислород расщепляемой связи, двух групп NH остатков Gly<sup>78</sup> и Asp<sup>79</sup> (нумерация ризо-пепсиона). Последние входят в нависающий над сорбированным субстратом подвижный β-структурный участок белковой цепи (так называемый флел). Действия нуклеофила и электрофила в согласии с предыдущими моделями механизма функционирования аспартатных протеиназ приводят к образованию неустойчивого промежуточного соединения, распадающегося на H<sub>2</sub>N- и -COOH-продукты реакции. И в этом случае, как и в рассмотренных выше, автор [19] следует концепции напряжения, т.е. постулирует возможность трансформации энергии фермент-субст-

ратных невалентных взаимодействий в энергию деформации пептидной связи, облегчающей ее гидролиз.

Модель механизма действия аспартатных протеиназ, предложенная М. Яскольски и сотр. [20], основана на трехмерной структуре ретровирусной HIV-1-протеиназы. В качестве нуклеофила и здесь выбирается молекула воды Wat<sup>507</sup> (нумерация пенициллопепсина), расположенная на равных расстояниях между боковыми цепями остатков Asp<sup>25</sup> и Asp<sup>125</sup> (рис. 4). Учитывая симметрию фермента, авторы поместили молекулу H<sub>2</sub>O вдоль оси второго порядка таким образом, что она может образовывать бифуркационную водородную связь с внутренними атомами кислорода карбоксильных групп аспарагиновой кислоты и внешним кислородом карбоксилата Asp<sup>25</sup>. Протон неионизированной боковой цепи Asp<sup>125</sup> образует водородную связь с атомом кислорода молекулы Wat<sup>507</sup>. Таким образом, согласно динамической модели Яскольски и сотр. [20], нативная HIV-1-протеиназа в равновесном состоянии обладает симметричной системой из пяти атомов кислорода, в поле которых мигрируют соответствующим образом атомы водорода.

Симметрия активного центра нарушается при взаимодействии фермента с субстратом. В результате нуклеофильной атаки одновременно деформируется карбонильная группа расщепляемой связи, изменяется гибридизация атомов углерода и азота ( $sp^2 \rightarrow sp^3$ ), возникает валентная связь C–OH и происходит протонизация азота.

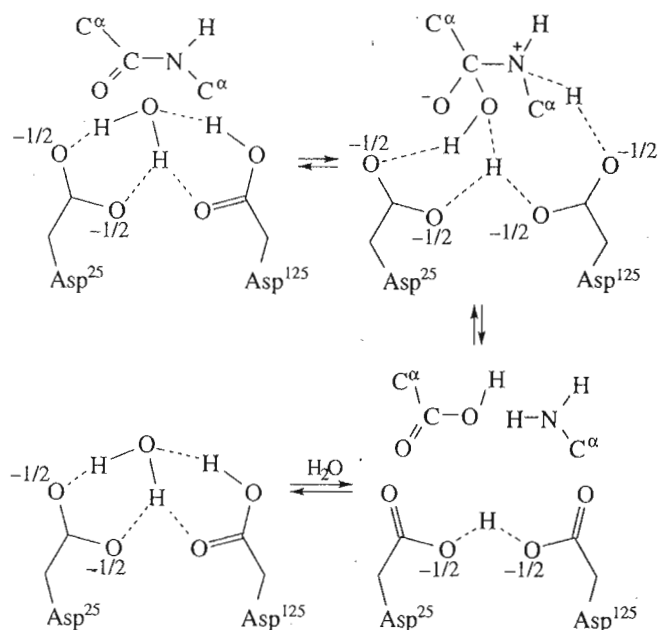


Рис. 4. Схема механизма катализа аспартатных протеиназ, предложенная М. Яскольски и сотр. [20].

Иными словами, фермент-субстратный комплекс проходит в одну стадию неустойчивое промежуточное состояние, которое завершается образованием продуктов реакции и возвращением фермента в исходное состояние.

Высказанные суждения о стереохимии аспартатных протеиназ различаются количеством предполагаемых элементарных стадий каталитического акта, расположением в активном центре молекул воды, осуществляющих нуклеофильную атаку на карбонильный углерод расщепляемой связи, и группами, поляризующими кислород этой же связи. Несмотря на эти существенные различия, они едины в следующих своих принципиальных положениях.

Во-первых, предполагается, что аспартатные протеиназы функционируют по принципу общего катализа и, следовательно, по ходу реакции не образуют с субстратами валентных промежуточных комплексов.

Во-вторых, утверждается, что для реализации каталитического действия протеиназ необходимо наличие в системе нуклеофила, акцептора и донора протона.

В-третьих, все модели исходят из предположения, что ферментативная реакция гидролиза пептидной связи аспартатными протеиназами включает стадию неустойчивого промежуточного соединения (тетраэдрического аддукта).

Эти положения были сформулированы и подтверждены экспериментально при изучении ферментативных и модельных неферментативных реакций еще до того, как был выполнен рентгеноструктурный анализ аспартатных протеиназ [1].

Ставшие известными трехмерные структуры ферментов и их комплексов с субстратоподобными ингибиторами дополнительно подтвердили ранее сделанные заключения и позволили визуализировать уже сложившиеся представления.

Общей у рассмотренных стереохимических моделей является также и трактовка побудительных мотивов биокатализа, сущность которого видится авторами в напряжении и деформации субстрата при его сорбции в активном центре в направлении переходного состояния, в индуцированном соответствии и принудительных конформационных изменениях фермента.

Таким образом, разработанные схемы ферментативного катализа примечательны в том отношении, что в них использован по существу один и тот же экспериментальный материал и, кроме того, они базируются на одних и тех же представлениях о природе биокатализа, давно ставших традиционными. На несовершенство полученных результатов указывает то обстоятельство, что в этих условиях и в рамках одного подхода была предложена не одна стереохимическая модель катализа, а четыре различные модели; впрочем, их могло быть и больше. Почему, например, не предположить, что ни одна из молекул кристаллизационной воды активного центра не участвует в каталитическом акте? В качестве же нуклеофила выступает молекула воды растворителя, которая встраивается в невалентный комплекс и оптимальным образом взаимодействует с остатками аспарагиновой кислоты и чувствительным местом субстрата. Рассмотренные стереохимические модели не образуют ряда, который бы мог свидетельствовать о качественном развитии знаний о механизме действия аспартатных протеиназ. Скорее их можно представить в виде букета различных точек зрения, отвечающих одному уровню понимания рассматриваемого явления и поэтому равноценных как в своей аргументации, так и в предсказательной силе. Естественен вопрос: что же привнесла нового в изучение каталитических реакций аспартатных протеиназ и других ферментов рентгеновская кристаллография белков?

Прежде всего следует отметить, что данные рентгеноструктурного анализа позволили определить область активного центра фермента. Сделать это с такой же полнотой и степенью надежности каким-либо иным способом в настоящее время не представляется возможным. Далее, использование этого метода для расшифровки трехмерных структур нативного фермента и его комплексов с различными ингибиторами позволило выявить конформационные перестройки активного центра, которые могут иметь место в процессе каталитического акта. Эти данные также уникальны и чрезвычайно информативны. Велика роль рентгеноструктурного анализа и в исследовании специфичности фермент-субстратных взаимодействий и локализации областей связывания активного



центра с атакуемым местом субстрата и примыкающими к нему с обеих сторон остатками. Что же касается ориентации расщепляемой связи относительно каталитически активных остатков фермента, отвечающих продуктивному связыванию истинного субстрата, то этот вопрос остался нерешенным. Высказанные мнения, как видно на примере предложенных стереохимических моделей функционирования аспартатных протеиназ, могут подразделяться на менее или более правдоподобные, однако и те и другие имеют предположительный, гипотетический характер.

Рассмотренный материал об аспартатных протеиназах, как и обсужденный ранее материал о хитотрипсине, трипсине, лизоциме и карбоксипептидазе А в монографии [21], дает основание заключить, что появление уникальной количественной информации о пространственном строении ферментов и их комплексов не привело к концептуальному развитию энзимологии и переосмыслению существующих представлений о природе и побудительных мотивах биокатализа. Ставшие доступными рентгеноструктурные данные не вызвали принципиальных изменений в понимании явления биокатализа и не нашли строгого, доказательного объяснения в рамках сформулированных ранее концепций, равно как и наоборот – последние не получили на основе этих данных своей объективной трактовки. По-прежнему фундаментальные различия между простыми химическими реакциями в растворе и реакциями, катализируемыми ферментами, видятся в напряжении и деформации субстрата при его сорбции в активном центре в сторону переходного состояния, в индуцированном соответствии и принудительных конформационных изменениях фермента и т.д. Данные рентгеноструктурного анализа ферментов не изменили традиционную направленность энзимологических исследований “от функции к структуре” (см. ниже). В чем же причины отсутствия ощутимого прогресса в понимании природы ферментативного катализа?

Первая, самая главная причина касается пространственной организации белковых молекул, без знания принципов которой невозможно теоретическое развитие энзимологии. То, что это именно так, подтверждает как само многообразие существующих концепций, отражающих самые различные, иногда противоречащие друг другу, представления о конформационных свойствах белков, так и многовариантность в рамках одной концепции стереохимических моделей механизма конкретной каталитической реакции, что имеет место, например, в случае аспартатных протеиназ. Необходимые для количественного описания каталитического акта данные о конформационных возможностях фермента и субстрата, их потенции к изменению своих структур не могут быть получены непосредственно из эксперимента или эмпирическим путем, без привлечения теоретиче-

ских и расчетных методов, в конечном счете без количественной теории структурной организации белков. Такая теория и соответствующий метод были разработаны и апробированы довольно давно [22–25], однако все еще остаются не востребованными энзимологами.

Вторая причина заключается в некорректной оценке проблемной ситуации, выражающейся во взгляде на ферментативный катализ как на явление, в принципе аналогичное химическому катализу. Нельзя понять механизм ферментативного катализа на основе экспериментальных методов и теоретических подходов органической химии, формальной кинетики и равновесной термодинамики. Механизм каталитического акта фермента не поддается воспроизведению в искусственных условиях, и поэтому его сопоставление даже с механизмом конгруэнтной системы носит в значительной мере формальный характер, особенно в отношении стереохимии.

Третья причина отсутствия концептуального развития теоретической энзимологии за последние десятилетия связана с рядом ограничений самого рентгеноструктурного анализа. Несмотря на уникальность и ценность этого метода, получаемая с его помощью информация касается только статического состояния фермента и, следовательно, прямо не отвечает на вопрос о динамических конформационных и электронных характеристиках трехмерных структур, что представляет первостепенный интерес в изучении биокаталитического процесса. Выявление потенциальных возможностей объектов исследования и предсказание их поведения – прерогатива теоретического подхода. Кроме того, рентгеновский метод позволяет расшифровывать трехмерные структуры комплексов ферментов, но комплексов не с субстратами, а лишь с ингибиторами. Для фермента могут быть получены структурные данные даже о целой серии его ингибиторных комплексов, которые в той или иной мере (но всегда неявной) соответствуют химическим элементарным стадиям каталитического акта. Но в таком наборе все ингибиторы отличаются по своему химическому и пространственному строению как от истинного субстрата, так и друг от друга. Не зная продуктивной ориентации субстрата в активном центре, актуальных для катализа фермент-субстратных взаимодействий и обусловленных ими конформационных перестроек, очевидно, трудно составить достаточно полное и объективное представление о причинах спонтанного протекания каталитической реакции. Предпринимаемые здесь попытки представляют собой не что иное, как стремление воссоздать механизм каталитического акта, располагая структурными данными, одна часть которых отвечает реальному, исходному состоянию фермента, а другая, большая часть, – фермент-ингибиторным комплексам, которые в чем-то (в чем именно, неизвестно) отличаются от промежуточных

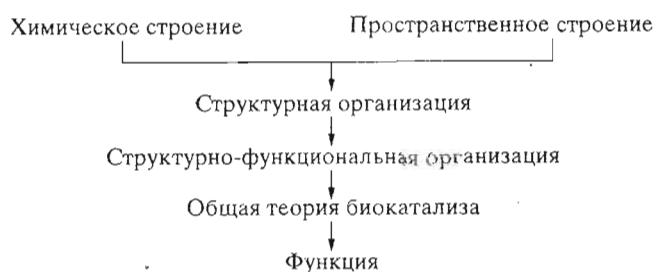
продуктивных комплексов истинного многостадийного процесса. В таких условиях сюжетов может быть очень много. И так, с появлением рентгеноструктурного анализа ферментов не произошел переход от многочисленных умозрительных представлений о ферментативном катализе к строгому количественному описанию этого явления.

Существующие концепции ферментативного катализа исходят из знания функции и предполагают на этой основе построение динамической структуры белковой молекулы, способной обеспечить ее реализацию. Такой метод исследования направлен от функции к структуре. Продуктивное расположение субстрата в активном центре предполагается на основании знания модельных принципов протекания ферментативной реакции, а также из постулированного характера ферментативной реакции и представлений о свойствах боковых цепей аминокислотных остатков, способных играть роль нуклеофила, электрофильного активатора, донора протона и т.д. Выбор модельной схемы катализа контролируется соображениями общего характера (концепции деформации, напряжения, индуцированного соответствия и т.д.), заменяющими собой действительное знание принципов структурной и функциональной организации нативных конформаций молекул. Таким образом, направленность биокаталитических исследований, следующих от функции к структуре, также не изменилась. Это не случайно, поскольку кристаллография ферментов дает представление главным образом лишь о морфологии биосистем молекулярного уровня, которая сама по себе не является конечной целью исследования, но совершенно необходима для последующего изучения структурной и структурно-функциональной организации биосистем. Поэтому ставшее известным благодаря рентгеноструктурному анализу пространственное строение молекул ферментов, не решив проблему биокатализа, сделало реальной постановку вопроса о количественном описании механизма ферментативной реакции; проблема создания общей теории биокатализа тем самым обрела форму подлинно научной проблемы.

## 2. Общая теория биологического катализа

Взаимоотношение между функцией фермента и его структурой передает представленная ниже схема. Связь между действием фермента и его аминокислотной последовательностью направлена от структуры к функции и при известной аминокислотной последовательности включает четыре промежуточных звена и, следовательно, требует последовательного решения четырех задач. Первая касается пространственного строения ферментов и решается экспериментально с помощью рентгеноструктурного анализа. Вторая задача посвящена изучению структурной организации и созданию теории, устанавливающей логическую

и количественную взаимосвязь между химическим и пространственным строением фермента и предсказывающей его конформационные и электронные свойства. Цель следующей задачи состоит в изучении физико-химических свойств ферментов и выявлении принципов их функционирования – в конечном счете в разработке теории структурно-функциональной организации ферментов (схема). Последняя задача заключается в создании общей теории биокатализа, учитывающей решения предшествующих задач, особенности ферментативного катализа, физико-химические основы этого явления и возможности современного естествознания.



Использованный в настоящей работе подход к изучению механизма каталитической реакции [21, 26] впервые исходит не из функции биокатализатора и соответствующих химических и кинетических характеристик процесса, а из строения и динамических конформационных и электронных свойств фермента и субстрата, т.е. из структурной организации взаимодействующих молекул [25]. Подход строго ориентирован в направлении от структуры к функции и в этом отношении является антитезой существующим подходам. Он включает общую теорию структурно-функциональной организации белковых молекул и соответствующий расчетный метод, позволяющий представить функцию фермента и механизм его каталитического действия как неизбежные следствия фермент-субстратных взаимодействий, как проявление тех возможностей, которые заложены в структурной организации молекул фермента и субстрата в их свободном состоянии. Что же представляют собой эти соединения до своего взаимодействия и образования невалентного комплекса?

На рис. 5 приведена конформационная карта  $\phi$ - $\psi$  метиламида N-ацетил-L-аланина, воспроизводящая потенциальную поверхность свободного элементарного звена основной цепи белковой молекулы ( $-\text{CONH}-\text{C}^{\alpha}\text{HR}-\text{CONH}-$ ; R – боковая цепь одной из стандартных аминокислот, кроме глицина и пролина). На карту нанесены конформационные точки всех остатков (за исключением Gly и Pro) пепсина, ризопуслепсина, эндотиапепсина и аспаргатной протеиназы HIV-1. Как видно из рисунка, конформационные состояния аминокислотных остатков в четырех аспаргатных протеиназах занимают на карте свободного монопептида только низкоэнергетические области.



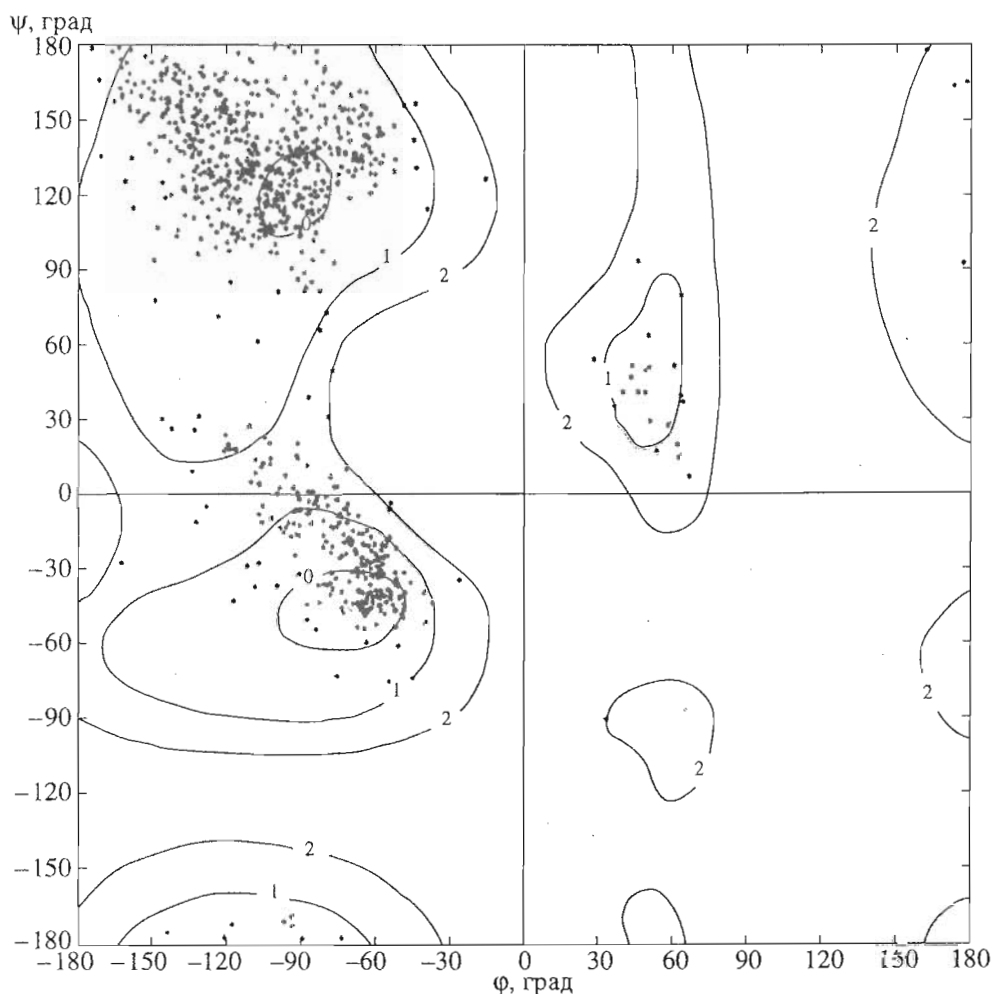


Рис. 5. Конформационная карта метиламида N-ацетил-L-аланина и экспериментальные конформационные точки аминокислотных остатков пепсина, ризопуспепсина, эндотиапепсина и HIV-протеиназы (за исключением Pro и Gly). Контуры ограничивают области с энергией 0.1 и 2 ккал/моль.

Подавляющее большинство остатков попадает в области, окаймленные контуром в 1 ккал, и все без исключения остатки — в области, окаймленные контуром в 2 ккал [25]. Такое же расположение у этих ферментов имеют остатки Gly на карте  $\phi$ - $\psi$  молекулы метиламида N-ацетилглицина и остатка Pro на кривой потенциальной поверхности  $U(\psi)$  метиламида N-ацетил-L-пролина.

Таким образом, конформационные возможности аминокислотных остатков аспартатных протеиназ полностью определяются взаимодействиями валентно не связанных атомов в пределах участка  $-\text{CONH}-\text{C}^{\alpha}\text{HR}-\text{CONH}-$ , т.е. ближними взаимодействиями. Несмотря на наличие средних и дальних взаимодействий между остатками, обуславливающих образование трехмерных структур, в молекулах аспартатных протеиназ (как и в молекулах других белков [25]) не реализуются состояния остатков с повышенной энергией ближних взаимодействий. Более того, распределение конформационных точек остатков на картах  $\phi$ - $\psi$

молекул метиламидов N-ацетил- $\alpha$ -аминокислот находится в хорошем соответствии со случайным распределением состояний несвязанных "монопептидов" по величинам свободной энергии. Из этого факта следует важный для последующего рассмотрения вывод. Он касается одного из принципов структурной организации белков, который утверждает, что в нативной конформации фермента имеется практически полная гармония (согласованность) между всеми межмолекулярными взаимодействиями [25, 27]. Этот же факт свидетельствует о несостоятельности всех концепций ферментативного катализа, в которых постулируется наличие в нативной конформации фермента или какой-либо ее части напряжений и принудительных деформаций.

Что касается субстратов (в нашем случае это сравнительно короткие пептиды), то, согласно теории структурной организации олигопептидов [25, 28, 29], их пространственное строение описывается ограниченным набором низкоэнергетических

структур, в которых, как и в белках, имеет место согласованность всех внутри- и межстаточных невалентных взаимодействий. Отсутствие у олигопептидов полной структурной детерминации обусловлено малым энергетическим вкладом средних и дальних взаимодействий. Следовательно, до возникновения специфических контактов и образования продуктивного невалентного комплекса молекулы фермента и субстрата находятся в равновесном состоянии и совершают в растворе беспорядочные перемещения. Фермент имеет высокоорганизованную трехмерную структуру, а субстрат, обладающий значительно большей внутренней конформационной свободой, представлен набором обратимых флуктуирующих пространственных форм.

Рассмотрим теперь вопрос о том, что представляет собой явление биологического катализа с термодинамической точки зрения. Прежде всего следует отметить самопроизвольный характер каталитической реакции, начинающейся со случайных контактов между ферментом и субстратом. По мере своего протекания она должна, согласно второму началу термодинамики, сопровождаться уменьшением свободной энергии Гиббса,  $\Delta G$  ( $P, T = \text{const}$ ), связанной с изменениями энтальпии ( $\Delta H$ ) и энтропии ( $\Delta S$ ) фундаментальным соотношением  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Свободная энергия, энтальпия и энтропия – функции состояния, и, следовательно, их изменения не зависят от конкретного механизма процесса, а определяются только конечными и начальными состояниями системы. Важно подчеркнуть справедливость и обратного заключения – знание величин  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  перехода из одного состояния системы в другое ничего не говорит о пути этого перехода.

Процессы, протекающие самопроизвольно в изолированных макроскопических системах, связаны с беспорядочным движением микроскопических составляющих. Они могут быть разделены на две группы явлений, принципиально различающихся по своей природе, механизму действия и последствиям.

Первую группу составляют явления, в которых хаотизация как системы в целом, так и каждой ее отдельной части (фазы, компонента) непрерывно возрастает по мере развития процесса. Движение системы к равновесному состоянию сводится к переходу всех микрочастиц от менее вероятных состояний к более вероятным, т.е. к монотонному возрастанию энтропии всех составных частей системы во всех возможных отношениях. Отклонения от этой тенденции (флуктуации) малы и, главное, обратимы, а поэтому практически не оказывают влияния на ход самого процесса; обычно ими пренебрегают. К этой группе явлений относятся растворение, диффузия, теплопроводность, осмос и катализ многих химических реакций. Все они статистичны по своей природе, обра-

тими и могут быть представлены путем непрерывной деформации равновесных состояний. Описывающие их поведение закономерности не зависят от строения микрочастиц. Явления этой группы можно считать естественными объектами исследования равновесной термодинамики и статистической физики и использовать для их феноменологического описания и статистической трактовки модели идеального газа и идеального раствора.

Вторую группу образуют явления, которые также протекают самопроизвольно и без нарушения второго начала термодинамики. Однако в отличие от равновесных процессов, где все части системы хаотизируются и вносят положительный вклад в общее увеличение энтропии, процессы данной группы сопровождаются диспропорционированием энтропии – уменьшением ее в одной части системы и ростом в другой. Такой феномен возможен только при наличии в системе наряду с обратимыми флуктуациями также необратимых, или, следуя терминологии И. Пригожина [30], бифуркационных, флуктуаций. Бифуркации играют решающую роль в скачкообразном изменении свойств и детерминации механизма спонтанного процесса – его инициации, развития и завершении, в конечном счете в создании новых, упорядоченных структур, названных Пригожиным диссипативными структурами. Примерами таких стационарных состояний вдали от положения равновесия являются конвекция жидкости с образованием ячеек Бернара, лазерное когерентное излучение, химическая реакция Белоусова–Жаботинского и периодический процесс “хищник–жертва” в экологии. Непременными условиями возникновения диссипативных структур можно считать следующие:

1) система должна обмениваться с окружающей средой веществом и/или энергией, т.е. быть открытой;

2) динамические уравнения системы нелинейны, не работают соотношения взаимности Онсагера, принцип локального равновесия и принцип минимума производства энтропии Пригожина. Следовательно, процесс нельзя рассматривать на основе линейной неравновесной термодинамики;

3) отклонение системы от равновесного состояния не может быть представлено путем непрерывной деформации последнего, т.е. отнесено к той же термодинамической ветви. Значения градиентов соответствующих термодинамических параметров (температуры, давления, концентрации) превышают критические величины;

4) организация упорядоченной макроскопической структуры – результат как случайного, так и детерминистического (кооперативного, согласованного) взаимодействия микроскопических составляющих системы.

Бифуркационные флуктуации, как и обратимые флуктуации, возникают совершенно случайно,



однако они не пропадают бесследно, как последнее, а вызывают определенную реакцию, которая заключается в пространственной или временной (или той и другой одновременно) упорядоченности части системы за счет дезорганизации другой. Ход спонтанного движения в этом случае определяется не случайными движениями микроскопических частиц, хотя ими он вызван и благодаря им остается случайно-поисковым, а молекулярной структурной организацией частиц, которая диктует необратимость флуктуаций, их вид и последовательность реализации. Таким образом, бифуркационные флуктуации, спонтанно выделяющиеся из сплошного спектра случайных отклонений и эволюционирующие при неравновесном процессе вдали от равновесия, предстают и как выразители индивидуальных свойств микроскопических частиц и их взаимодействий, и как накопители, усилители и интеграторы этих свойств, и тем самым как преобразователи и трансформаторы их в качественно новые макроскопические свойства диссипативной структуры [31]. При самопроизвольном процессе формообразования белковой глобулы благодаря бифуркациям возникает высокоорганизованная физиологически активная трехмерная структура [21, 22]; при самопроизвольном процессе ферментативного катализа – еще более высокоорганизованный невалентный комплекс Михаэлиса. В обоих случаях происходит спонтанная трансформация тепловой энергии необратимых флуктуаций в целенаправленную механическую работу построения структуры и энергии стереоспецифических взаимодействий, в ферментативных реакциях переходящую в химическую и конформационную энергию. И там и там процесс является статистико-детерминистическим, требующим для своей интерпретации знания молекулярных свойств объектов, принимающих в нем участие.

Таким образом, вопрос о том, что может послужить фундаментальной основой для общей теории биокатализа, решается однозначно. Такой основой может быть только нелинейная неравновесная термодинамика (физика Пригожина) [30]. В этом случае изучение фермент-субстратных взаимодействий есть не что иное, как поиск обратимых, бифуркационных флуктуаций, ведущих, если говорить о первой стадии ферментативной реакции, к образованию комплекса Михаэлиса. К ним, безусловно, будут принадлежать те флуктуации субстрата и фермента, комбинация которых отвечает, с одной стороны, ненапряженным структурам молекул в свободном, равновесном состоянии, а с другой – максимальному числу стабилизирующих контактов между ними в ассоциированном состоянии. В этом заключена связь основополагающих принципов структурной организации белков и нелинейной неравновесной термодинамики.

Итак, выше рассмотрены два вопроса, решение которых имеет принципиальное значение для

создания общей теории биокатализа и соответствующего метода расчета механизма ферментативной реакции. Один вопрос касается молекулярной структурной организации вступающих в реакцию фермента и субстрата, а второй – нелинейного неравновесного характера фермент-субстратных взаимодействий. Следующий, не менее важный вопрос, без решения которого также невозможно создание теории и метода расчета биокаталитического акта, связан с конкретным представлением о фермент-субстратных взаимодействиях и подходом к их количественной оценке.

Ферментативный катализ – одно из наиболее сложных физико-химических явлений живой природы, в котором выражается взаимообусловленность конформационных и электронных (физических и химических) аспектов межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий. Их совместное изучение, строго говоря, должно базироваться на квантовой механике молекул, поскольку только в этом случае они могут в принципе рассматриваться одновременно. Однако квантово-механические методы не позволяют и вряд ли позволяют в обозримом будущем анализировать системы, состоящие из столь большого числа (многих сотен) взаимодействующих атомов. Выход из положения может заключаться в разделении и последовательном изучении чередующихся конформационных и электронных стадий каталитического акта.

В какой мере предположение о независимом рассмотрении конформационных и электронных эффектов каталитической реакции является достаточно строгим и эффективным? Сразу можно сказать, что это предположение неприемлемо для всех существующих концепций ферментативного катализа, согласно которым необходимым условием протекания процесса, его движущей силой считается напряженность и отклонение молекул от равновесной геометрии. В релаксационной концепции Ю.И. Хургина с соавт. [32], как и концепции Л.А. Блюменфельда [33], неравновесность предполагается уже у нативного фермента. В концепции напряжения и деформации Г. Эйринга и др. [34] и концепции индуцированного соответствия Д. Кошланда [35], а также всех многочисленных их вариантах неравновесность возникает у субстрата или фермента (или, согласно В. Дженксу [36], у того и другого одновременно) в процессе образования невалентного комплекса. Можно ли здесь представить конформационные изменения, которые не сопровождались бы существенным перераспределением электронной плотности в валентной схеме? Как, например, описать, следуя концепции “дыбы” или принципу “лилипотов”, начальную стадию каталитического акта гидролиза пептидной связи протеолитическим ферментом без происходящих в одно и то же время конформационной перестройки и глубоких электронных преобразований этой связи (скручивание на  $\sim 90^\circ$ , растяжение до длины ординарной связи и

пирамидализация азота). Очевидно, такое невозможно. М.В. Волькенштейн [37] ввел даже специальное понятие конформона, желая тем самым подчеркнуть неразрывность конформационно-электронных изменений в процессе ферментативной реакции.

В одновременности действий стерического и химического факторов суть всех существующих концепций, и поэтому их в принципе нельзя анализировать порознь. Но, поскольку совместный количественный учет таких факторов практически неосуществим, даже при справедливости самой идеи напряжения и деформации (как и идеи изначальной неравновесности фермента) предложенные концепции не в состоянии поднять уровень развития теоретической энзимологии выше феноменологических описаний и умозрительных построений, что и подтверждается практикой многих десятилетий.

В рассматриваемой теории биокатализа предполагается, что по ходу ферментативной реакции конформационные и электронные изменения чередуются и совершаются раздельно [21]. Это делает возможным анализировать электронное состояние химических связей независимо от конформационных перестроек молекул фермента и субстрата (и наоборот). Иными словами, для всех химических стадий элементарного каталитического акта допускается справедливость принципа Франка–Кондона, а для всех промежуточных конформационных стадий – Борна–Оппенгеймера.

Сделанное предположение отнюдь не отрицает наличия самой конформационно-электронной взаимообусловленности, иначе каталитический процесс был бы просто невыносим. Допускается лишь возможность независимого, последовательного рассмотрения конформационных и электронных задач вдоль координаты каталитической реакции. При этом ожидается, что решение каждой предшествующей задачи окажется необходимым и достаточным для решения последующей. В какой мере ожидания оказались оправданными, будет рассмотрено позднее, а сейчас обратим внимание на отсутствие достаточно веских аргументов для заведомо негативного отношения к высказанной мысли о возможности независимого рассмотрения конформационных и электронных аспектов биокатализа.

Обнадеживает огромный положительный опыт молекулярной спектроскопии, где все теоретические подходы к интерпретации электронных, колебательных и вращательных спектров основываются на раздельном рассмотрении движений электронов и атомов (принцип Франка–Кондона). Оправдал себя и классический подход к теоретическому конформационному анализу, базирующемуся на молекулярной механической модели А.И. Китайгородского [38]. Результаты многолетнего использования этой модели для пептидов и белков [25] свидетельствуют о возможности

проведения расчетов сложных молекул в предположении неизменности химических связей (принцип Борна–Оппенгеймера). Невалентные взаимодействия атомов нативных фермента и субстрата, приводящие к образованию комплекса Михаэлиса, также осуществляются на расстояниях, при которых трудно ожидать заметного перераспределения электронной плотности на химических связях.

Независимое рассмотрение конформационных и электронных эффектов ферментативного катализа не противоречит теории структурной организации белковых молекул [25], согласно которой, как уже отмечалось, фермент в исходном состоянии представляет собой ненапряженную, согласованную в отношении всех внутримолекулярных взаимодействий равновесную систему. Если и субстрат находится в равновесном состоянии, что очевидно, то процесс образования комплекса Михаэлиса, протекающий спонтанно и, следовательно, с понижением, несмотря на уменьшение энтропии, свободной энергии Гиббса, не может сопровождаться высокоэнергетическими, принудительными деформациями обеих молекул. Поэтому чрезвычайно маловероятно такое перераспределение электронной плотности, которое существенно изменило бы у ассоциированных молекул фермента и субстрата значение длин связей и валентных углов.

Таким образом, предполагается, что сближенность в комплексе Михаэлиса на невалентные расстояния атомных групп фермента и субстрата, склонных к химическим взаимодействиям, не должна заметным образом затрагивать их электронное строение. Лишь после завершения соответствующих конформационных перестроек и создания стерических условий, необходимых для реализации потенциала функциональных групп к химическим взаимодействиям, в системе может возникнуть электронная неравновесность. Если это так, то инициация и последующее протекание как физических (конформационных), так и химических (электронных) стадий катализа никак не должны быть связаны с получением дополнительной энергии активации и преодолением энергетического барьера. Эти понятия в своей классической трактовке здесь теряют какой-либо смысл.

В невалентных взаимодействиях субстрата с активным центром фермента участвуют обычно сотни атомов, а в электронных, чисто химических взаимодействиях, – как правило, не более десятка. При последовательном рассмотрении конформационных и электронных аспектов ферментативной реакции анализ первых может строиться на классической основе с использованием полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов, а исследование вторых – квантово-механической основе с помощью методов квантовой химии. Этого нельзя будет сделать, если возникающая в невалентных комплексах электронная неравновесность – следствие принудительных деформаций и стерических напряжений.



Не вызывает сомнений, что многостадийный каталитический процесс осуществляется за счет взаимообусловленных конформационных и электронных изменений фермента и субстрата. Синхронные и строго упорядоченные конформационные перестройки обеих молекул обеспечивают сближенность соответствующих атомных групп в соответствующем месте и соответствующей взаимной ориентации, предопределяющей развитие последующей химической стадии. Поэтому можно полагать, что ключ к пониманию специфики конкретного механизма ферментативного катализа заключается не столько в электронных, сколько в конформационных особенностях процесса. Поэтому количественное изучение всех стерических эффектов вдоль координаты реакции может привести к пониманию всей работы фермента как биологической машины. Полученные представления легко дополняются результатами квантово-механических расчетов, что в конечном счете позволяет количественно описать все стадии каталитического акта фермента как спонтанно протекающего процесса.

Итак, изложенная выше общая теория биокатализа исходит, во-первых, из представления о структурной организации белковых молекул, в основе которой лежит принцип согласованности внутримолекулярных взаимодействий валентно не связанных атомов, во-вторых, из специфических особенностей ферментативных реакций как нелинейных неравновесных процессов, в-третьих, из предположения о возможности независимого рассмотрения конформационных и электронных стадий каталитического акта фермента.

### 3. Расчет невалентных фермент-субстратных взаимодействий

Апробация теории биокатализа была проведена путем априорных, в направлении от структуры к функции, расчетов конформационных стадий ферментативных реакций  $\alpha$ -химотрипсина [26] и  $\beta$ -трипсина [39] – сериновых протеиназ, наиболее детально изученных ферментов, послуживших “пробными камнями” почти для всех концепций биокатализа, а также карбоксипептидазы А [40–42], расщепляющей пептидную связь С-концевого остатка аминокислотной последовательности. Здесь мы сможем лишь кратко остановиться на некоторых общих результатах исследования  $\alpha$ -химотрипсина, касающихся образования комплекса Михаэлиса – события, предопределяющего ход любой ферментативной реакции (подробнее см. [21]).

Исследование конформационных возможностей субстрата в потенциальном поле фермента – по существу не что иное, как поиск тех конформационных состояний двух молекул, которые могут возникнуть только благодаря необратимым вращательным флуктуациям, фиксирующим невалентный комплекс. При беспорядочно-поисковом

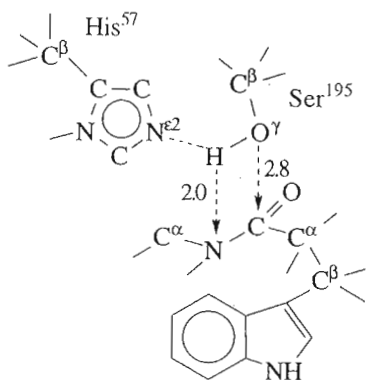
механизме спонтанного формирования комплекса подобные бифуркационные флуктуации наверняка будут иметь место, если они приводят к таким конформационным изменениям субстрата и некоторых аминокислотных остатков фермента, которые отвечают, с одной стороны, низкоэнергетическим пространственным формам каждого из них в свободном состоянии, а с другой – максимальному числу стабилизирующих контактов между ними в ассоциированном состоянии. Эти два обстоятельства объясняют причину необратимости бифуркационных флуктуаций, их отличие от множества обратимых флуктуаций.

Продолжительность сборки невалентного комплекса Михаэлиса определяется временем перебора всех возможных конформационных флуктуаций. Учитывая сравнительно небольшое число вращательных переменных участка субстрата, взаимодействующего с активным центром фермента, можно утверждать, что случайное появление нужной комбинации за достаточно короткое время ( $< 10^{-4} - 10^{-6}$  с) гарантировано.

Расчет помог установить последовательность конкретных необратимых флуктуаций, а тем самым и механизм образования комплекса Михаэлиса. Каталитический акт  $\alpha$ -химотрипсина начинается с проникновения боковой цепи ароматического остатка субстрата ( $P_1$ ) в гидрофобную полость ( $S_1$ ) активного центра фермента. Устройство полости таково, что она посредством эффективных стабилизирующих взаимодействий практически однозначно детерминирует положение попавшей в сферу ее влияния боковой цепи субстрата. Расположенная при входе в полость боковая цепь остатка Met<sup>192</sup>, обладающая значительной конформационной свободой в нативном ферменте, изменяет свое положение. Теперь она уже не обращена в сторону растворителя, а, совершив поворот приблизительно на  $120^\circ$  вокруг связи  $C^\alpha - C^\beta$ , прикрывает собой находящуюся в полости боковую цепь остатка  $P_1$  субстрата от контактов с водой. Вхождение в гидрофобный карман какой-либо другой части субстрата не вызывает возникновения бифуркационных флуктуаций, т.е. является обратимым и, следовательно, бесперспективным в отношении развития процесса.

Попадание ароматической боковой цепи  $P_1$  в полость  $S_1$  однозначно предопределяет положение в активном центре атакуемой группы субстрата. Участок  $P_1 - P_3$  образует  $\beta$ -структуру с фрагментом Ser<sup>214</sup>-Gly<sup>216</sup>  $\alpha$ -химотрипсина. Остатки субстрата со стороны С-конца вытесняют молекулу кристаллизационной воды, которая до этого посредством водородной связи фиксировала боковую цепь остатка Ser<sup>195</sup> в нативном положении. Освободившись, последняя приобретает практически неограниченную свободу в интервале  $\sim 200^\circ$  по углу  $\chi$ . Ее новое положение будет теперь полностью определяться стабилизирующим взаимодействием с





**Рис. 6.** Расположение расщепляемой группы субстрата и боковых цепей Ser<sup>195</sup> и His<sup>57</sup> в невалентном комплексе  $\alpha$ -химотрипсина. Межатомные расстояния приведены в ангстремах.

расщепляемой пептидной группой сорбированного субстрата. Вопреки всем ранее высказанным предположениям поворот и последующая фиксация боковой цепи, как показал расчет [26], осуществляется не за счет невыгодных контактов и деформаций, а, напротив, за счет стабилизирующих и согласованных друг с другом взаимодействий.

Боковая цепь остатка His<sup>57</sup> при сорбции субстрата приобретает возможность (только за счет стабилизирующих взаимодействий) подстраиваться к новому окружению. Возникающее при этом взаимное расположение расщепляемой группы субстрата и боковых цепей остатков Ser<sup>195</sup> и His<sup>57</sup> представлено на рис. 6. Оно рассчитано с помощью априорного теоретического конформационного анализа [26]. Получить такую же информацию о невалентном комплексе фермента с истинным субстратом экспериментальным путем из-за краткости существования комплекса пока не представляется возможным. Из рис. 6 видно, что атом O $\gamma$  остатка Ser<sup>195</sup> в невалентном комплексе находится на расстоянии 2.8 Å против карбонильного углерода расщепляемой связи, а протон гидроксильной группы O $\gamma$ H, не нарушая водородной связи с атомом N $\epsilon^2$  остатка His<sup>57</sup>, а, напротив, несколько улучшая ее (расстояние O $\gamma$ -H...N $\epsilon^2$  в нативной структуре составляет 2.1 Å, а в невалентном комплексе – 1.8 Å), располагается на расстоянии 2.0 Å над атомом азота расщепляемой группы. При этом плоскость пептидной группы субстрата оказывается приблизительно перпендикулярной плоскости, образуемой связью N-C(O) и атомом O $\gamma$ . Такое взаимное расположение остатков Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup> и расщепляемой группы возникло автоматически и только за счет невалентных стабилизирующих взаимодействий между субстратом и  $\alpha$ -химотрипсином.

При поиске энергетически наиболее выгодного положения субстрата в активном центре не было сделано никакого предположения о химической

стороне фермент-субстратных взаимодействий, как и о геометрической модели невалентного комплекса. Представленная на рис. 6 структура была получена в результате исследования конформационных возможностей взаимодействующих молекул, т.е. полностью априорно. Использованный полужемпирический метод атом-атомных потенциалов, однако, исключает автоматический переход возникших в комплексе Михаэлиса невалентных взаимодействий в валентные, химические взаимодействия лиганда с ферментом. Найденное конформационное состояние оптимально или равновесно только с точки зрения принятых во внимание невалентных взаимодействий атомов. Истинный же комплекс Михаэлиса неравновесен в отношении химических взаимодействий, о чем свидетельствует его дальнейшее самопроизвольное развитие.

В чем же причина валентной неравновесности оптимальной по невалентным взаимодействиям конформации фермент-субстратного комплекса? Почему пептидная связь P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' субстрата оказывается дестабилизированной ферментом в результате возникших в комплексе Михаэлиса невалентных межмолекулярных взаимодействий? Иными словами, в чем сущность невалентного фермент-субстратного комплекса как молекулярного преобразователя энергии невалентных взаимодействий в химическую энергию? Однозначные ответы на поставленные вопросы должны последовать из решения квантово-химической задачи. Хотя этого пока не сделано, тем не менее описанный подход не должен оставлять сомнений в возможности получения такого решения. После этапа конформационного анализа квантово-химический расчет следующей за образованием комплекса Михаэлиса стадии реакции сводится к рассмотрению модельной системы из весьма ограниченного набора атомов и с впервые ставшей известной геометрией. Впрочем, в данном случае убедиться в том, что рассчитанный комплекс предрасположен к гидролизу пептидной связи через реакцию ацилирования с промежуточным тетраэдрическим аддуктом, нетрудно, руководствуясь общими соображениями. О продуктивности комплекса именно в этой реакции свидетельствует прежде всего ориентация боковой цепи остатка Ser<sup>195</sup>. В найденном комплексе она занимает положение, необходимое, с одной стороны, для нуклеофильной атаки атома O $\gamma$  на карбонильный углерод субстрата, а с другой – для взаимодействия протона сериновой гидроксильной группы с амидным азотом гидролизуемой связи. Решающее значение имеет то обстоятельство, что рассчитанная взаимная ориентация атакуемого места субстрата и активных групп фермента представляет собой замкнутую в химическом отношении полифункциональную систему, образование которой невероятно в отсутствие фермента. В образовавшемся

цикле сближенных и эффективно взаимодействующих атомных групп реализуется ряд взаимообусловленных реакций, протекающих в комплексе Михаэлиса по существу как мономолекулярная реакция. В самом деле, взаимодействие неподеленных пар электронов атома  $O\gamma$  с  $\pi$ -электронами атома  $C(O)$ , способствуя депротонизации  $\gamma$ -гидроксильной группы остатка  $Ser^{195}$ , одновременно ослабляет взаимодействие неподеленной пары электронов аминной группы с  $\pi$ -системой карбонильной группы расщепляемой связи  $N-C(O)$  и ведет к ее разрыхлению. Параллельно возрастает основность аминной группы, что облегчает ее протонирование и, в свою очередь, также способствует ослаблению связи  $N-C(O)$  и повышению эффективности взаимодействия атомов  $O\gamma(195)$  и  $C(O)$ . Усиление связи между ними дестабилизирует  $\pi$ -систему карбонильной группы субстрата. В этом же направлении действуют водородные связи между группой  $C(O)$  расщепляемой связи и группами  $NH$  основных цепей остатков  $Ser^{195}$  и  $Gly^{193}$ .

Такое же благоприятное для ацилирования фермента влияние оказывают в другой части полифункциональной системы водородные связи атомов  $O^{\delta 1}$  и  $O^{\delta 2}$  карбоксильной группы остатка  $Asp^{102}$  соответственно с группами  $NH$  основных цепей остатков  $His^{57}$  и  $Ala^{55}$  и с группами  $N^{\delta H}(57)$  и  $O^{\delta H}(214)$ . Перечисленные атомные группировки вовлечены в единую, согласованную в отношении своих внутренних связей систему. Ее назначение состоит в трансформации невалентных взаимодействий в цепь сопряженных химических превращений: депротонирование атома  $O\gamma(195)$ , образование связи  $O\gamma-C(O)$ , ослабление связи  $N-C(O)$ , переход от двойной к одинарной связи  $C-O$  и от  $sp^2$ - к  $sp^3$ -гибридизации атомов  $N$  и  $C(O)$ . Невалентный комплекс Михаэлиса превращается в тетраэдрическое промежуточное соединение.

Таким образом, в образовавшейся за счет невалентных фермент-субстратных взаимодействий полифункциональной системе весь цикл химических реакций работает по принципу автокатализа – каждая реакция облегчает (более того, делает неизбежным) протекание всех остальных. Нужные для ацилирования реагенты оказываются не просто пространственно сближенными, но и соответствующим образом ориентированными. Описанный комплекс сопряженных реакций, ведущий к образованию тетраэдрического аддукта, не требует никакой “энергии активации” и преодоления “потенциального барьера”. Нет никаких физических оснований для введения подобных понятий равновесной термодинамики в описание механизма нелинейного неравновесного и, следовательно, детерминированного процесса.

Рассчитанная полифункциональная фермент-субстратная система уникальна и не может быть воспроизведена искусственным, т.е. нефермента-

тивным, образом. В обычных химических реакциях маловероятна одновременная встреча трех атомных групп, принадлежащих трем разным молекулам. Еще менее вероятна ситуация, когда при такой встрече каждая группа правильно ориентирована по отношению к двум другим. Совершенно нереальна ситуация, чтобы три группы были не только ориентированы нужным для реакции образом, но и специфически взаимодействовали с окружением, повышающим реакционную способность всех составных частей системы.

Из сказанного следует вывод принципиально порядка – образовавшаяся фермент-субстратная система не имеет аналогий в органической химии и химическом катализе и требует самостоятельного рассмотрения.

#### 4. Структурно-функциональная организация ферментов

Применение теории биокатализа и метода априорного расчета конформационных аспектов механизма каталитического акта к действию  $\alpha$ -химотрипсина,  $\beta$ -трипсина и карбоксипептидазы А [21] позволило выявить особенности их структурно-функциональной организации, имеющие, по-видимому, общий характер. Обнаруженная связь между молекулярной структурной организацией и физико-химическими функциональными свойствами ферментов находит свое отражение в следующих положениях.

1. Активный центр нативного фермента расположен, во-первых, к сорбции специфического субстрата в конформации, которая в свободном состоянии молекулы является ненапряженной, и, во-вторых, к вполне определенным собственным конформационным изменениям, необходимым для последующих взаимодействий.

2. Невалентные фермент-субстратные взаимодействия и образование комплекса Михаэлиса не приводят ни в молекуле субстрата, ни в молекуле фермента к возникновению стерических напряжений и принудительных деформаций. Имеющие место на этой стадии катализа конформационные изменения происходят исключительно благодаря взаимодействиям стабилизирующего характера, а не за счет неблагоприятных контактов между атомами фермента и субстрата.

3. В комплексе Михаэлиса (а при многостадийной ферментативной реакции и в промежуточных невалентных комплексах) каталитически активные группы фермента и чувствительное место субстрата образуют замкнутую полифункциональную систему, предрасположенную к соответствующей химической реакции (у сериновых протеиназ к реакции ацилирования в одной стадии каталитического акта и дезацилирования – в другой). В такой системе реализуется цепь взаимообусловленных, последовательно катализирующих друг



друга реакций, инициация и протекание которых не требуют энергии активации. Роль комплекса Михаэлиса заключается в создании именно такой автокаталитической замкнутой системы, а не в приведении субстрата к напряженной структуре, близкой к геометрии переходного состояния, и каталитически активных групп к напряженным конформациям, обладающим повышенной реакционной способностью. Ускорение ферментативной реакции происходит благодаря тому, что в такой полифункциональной системе реакции третьего, четвертого и даже более высокого порядка сводятся по существу к мономолекулярной реакции, не встречающейся на своем пути потенциальных барьеров.

4. После создания комплекса Михаэлиса, как и других промежуточных невалентных комплексов, необходимая дополнительная сближенность между функциональными группами замкнутой системы для их химических взаимодействий может осуществляться за счет броуновского движения и синфазных нормальных колебаний макромолекулярного образования.

5. Самые низкоэнергетические конформационные состояния комплексов на всех стадиях каталитического акта соответствуют продуктивной взаимной ориентации реагирующих атомных групп фермента и субстрата, т.е. такому их взаимному расположению, которое в максимальной степени предрасположено к целенаправленным химическим взаимодействиям между ними. Непродуктивные конформации фермент-субстратных комплексов энергетически значительно менее предпочтительны, и их реализация маловероятна. Переход между всеми химически нестабильными промежуточными состояниями сопровождается незначительными и не вызывающими стерических напряжений конформационными изменениями.

Итак, фермент выполняет свою функцию, не прибегая к созданию у чувствительного места субстрата и каталитических групп активного центра особой реакционной способности путем их принудительной деформации. Каталитический акт фермента представляет собой энергетически ненапряженный процесс. Эффективность и строгая избирательность биологического катализа осуществляются не за счет создания особых высокоэнергетических электронно-конформационных состояний фермента и субстрата, как это декларируется во всех существующих концепциях [43]. Исключительность этого спонтанного природного явления, совершающегося безошибочно и в мягких условиях, заключается, напротив, в чрезвычайной простоте и естественной гармонии выработанных эволюцией взаимоотношений между ферментом и соответствующим субстратом на всех стадиях каталитической реакции.

Создание теорий структурной и структурно-функциональной организации ферментов, теории

биокаatalиза и разработка соответствующих расчетных методов позволяет говорить о становлении теоретической энзимологии, призванной заменить существующий чисто эмпирический подход к исследованию ферментативного катализа в направлении от функции к структуре. Наличие необходимых апробированных теорий и методов делает реальным широкое использование подхода от структуры к функции для изучения механизмов самых разнообразных ферментативных реакций и целенаправленного поиска высокоспецифических ингибиторов.

Для проведения исследований такого плана должны быть известны трехмерная структура нативного фермента и химическое строение молекулы субстрата и ингибитора. Желательно знать трехмерную структуру фермент-ингибиторного комплекса. Цели исследования заключаются, во-первых, в количественном описании с использованием отмеченного экспериментального материала конформационных и электронных стадий каталитического акта как непрерывного, совершающегося спонтанно автоматического процесса и, во-вторых, в конструировании серии ингибиторов, обладающих наперед заданными свойствами. При изучении ферментативного катализа в равной мере представляют интерес как причины протекания каталитического акта и его механизм, так и причины ингибирования процесса. Работа по реализации этих целей может быть разделена на четыре следующих друг за другом этапа:  $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$ .

На этапе *A* изучается структурная организация молекул фермента, субстрата и ингибитора до начала их взаимодействий. В подходе от структуры к функции этот этап представляется крайне важным, так как ферментативная реакция, согласно рассмотренной выше теории биокаatalиза, есть не что иное, как раскрытие тех потенциальных возможностей, которые заключены в нативных структурах молекул. В современных расчетах по ферментативному катализу, направленных, как отмечалось, от функции к структуре, подобные исследования не проводятся. Структурная организация фермента и взаимодействующих с ним лигандов специально, т.е. независимо от функции, не изучается. Представление о них стараются подстроить под тот или иной предполагаемый механизм каталитической реакции, опираясь на общепринятое или субъективное, собственное мнение и имеющийся экспериментальный материал, как правило недостаточный и неоднозначно трактуемый. В этом причина большого числа самых разнообразных как дополняющих, так и исключающих друг друга концепций ферментативного катализа. Исследование этапа *A* включает, во-первых, теоретический конформационный анализ субстрата и ингибитора и определение наборов предпочтительных по энергии конформационных состояний молекул и, во-вторых, изучение



конформационных возможностей остатков активного центра в потенциальном поле нативного фермента, выявление взаимозависимости конформационно-электронного состояния каждого остатка от состояний других остатков и присутствующих в активном центре молекул воды, ионов металла и т.п., оценку роли водородных связей, дисперсионных и электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации фермента.

Если известна нативная структура фермент-ингибиторного комплекса, то этап В следует начать с изучения именно его. Помимо того что результаты этой работы безусловно окажутся весьма ценными в последующем изучении фермент-субстратных взаимодействий, а также будут иметь большой самостоятельный интерес, они представят весьма редкую возможность сделать широкое сопоставление независимо полученных данных теории и эксперимента. Современное состояние расчетных методов конформационного анализа позволяет встраивать ингибитор в активный центр фермента, опираясь на знание пространственного строения нативного белка и не прибегая ни к каким иным расчетным данным. Очевидно, что при совпадении априорно рассчитанной геометрии субстратоподобного ингибитора и активного центра фермента с кристаллографической структурой фермент-ингибиторного комплекса не должно возникнуть больших сомнений в достоверности результатов аналогичной работы с субстратом, которые не могут столь же однозначным образом быть подтверждены экспериментально.

В рассчитанной трехмерной структуре невалентного комплекса Михаэлиса чувствительное место субстрата и функциональные боковые цепи остатков активного центра фермента будут иметь продуктивные ориентации и образовывать полифункциональную циклическую систему, равновесную в отношении валентных и неравновесную в отношении химических взаимодействий атомов. Ответы на вопросы, что собой представляет конформация субстрата в комплексе Михаэлиса, каковы мотивы конформационной перестройки активного центра при его сорбции, в чем заключается предрасположенность полифункциональной системы к изменению валентного состояния субстрата и др., можно получить из анализа и сопоставлений результатов исследования на этапах А и В.

Следующий шаг в изучении ферментативной реакции (этап С) основывается на результатах исследования ее первой невалентной стадии и состоит в выборе квантово-химической модели фермент-субстратного комплекса. Расчет модели приведет к новому состоянию комплекса, равновесному в отношении химических и неравновесному в отношении невалентных взаимодействий. Далее все повторяется до образования продуктов реакции и возвращения фермента в исходное нативное состояние. Итогом проведенного на этапе

С исследования является априорно рассчитанный с помощью классического и полуэмпирического квантово-химического методов механизм каталитической действия фермента в виде непрерывной реакции, состоящей из альтернирующих конформационных и электронных стадий фермент-субстратных взаимодействий.

Исследования этапа D направлены на решение практических задач. Ставшие известными после работ на этапах А, В и С причины ингибирования и нормального протекания ферментативного каталитического акта открывают широкие перспективы перед прикладной энзимологией. После детального изучения механизма ферментативной реакции и обретенной благодаря этому способности предвидеть до синтеза и биологических испытаний последствия тех или иных изменений в структурах субстрата и фермента работы в этой области могут проводиться не методом "проб и ошибок", как в настоящее время, а целенаправленно.

Существует множество различных видов прикладных энзиматических исследований. Но, пожалуй, самый распространенный из них и практически наиболее значимый касается поиска высокоспецифических ингибиторов. Приведем лишь один пример. Так, для многих миллионов больных и инфицированных вирусом, вызывающим СПИД, в буквальном смысле слова вопросы жизни и смерти является получение энзимологами ингибиторов такой высочайшей избирательности, которая сделала бы невозможным функционирование аспартатной протеиназы HIV-1 и не затронула при этом белки клетки-хозяина. Вероятность синтеза таких терапевтических препаратов при существующем уровне энзимологии и использовании метода "проб и ошибок" чрезвычайно мала. Решение подобных задач возможно, если известны специфика структурной и структурно-функциональной организации молекулы HIV-1-протеиназы, ее активного димера и механизм функционирования фермента. Но и это не все. Необходимо еще использовать предложенный сравнительно недавно метод, позволяющий решать так называемые обратные структурные задачи [25, 28, 44], которые заключаются в конструировании химического строения ингибитора и модификации активного центра фермента по заранее заданным пространственным формам и степеням конформационной свободы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991.
2. Mitsuya H., Yarchoan R., Broder S. // Science. 1989. V. 249. P. 1533–1542.
3. Tomasselli A.G., Hove W.F., Sawyer T.K. et al. // Chimicaoggi. 1991. May. P. 6–27.
4. Kohl N.E., Emini E.A., Schleif W.A., Davis L.J., Heimbach J.C., Dixon R.A., Scolnick E.M., Sigal I.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 4686–4690.

5. Попов Е.М., Кашпаров И.В., Попов М.Е. // Успехи биол. химии. 1994. Т. 4. С. 40–82.
6. Antonov V.K. // Adv. Exp. Med. Biol. 1977. V. 95. P. 179–198.
7. Antonov V.K., Ginodman L.M., Kapitannikov Yu.V., Rumsh L.D. // FEBS Lett. 1978. V. 88. P. 87–90.
8. Антонов В.К., Явашев Л.П., Волкова Л.И., Садовская В.Л., Гинодман Л.М. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. С. 1427–1429.
9. James M.N.G., Sielecki A. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3701–3713.
10. James M.N.G., Sielecki A.R. // J. Mol. Biol. 1983. V. 163. P. 229–361.
11. Bott R., Subramanian E., Davies D. // Biochemistry. 1982. V. 28. P. 6956–6962.
12. James M.N.G. // Can J. Biochem. 1980. V. 58. P. 251–271.
13. James M.N.G., Hsu I.N., Delbaere L.T.J. // Nature. 1977. V. 267. P. 808–813.
14. Blundell T.L., Jones H.B., Rhan G. // Proc. FEBS Meet. 1980. V. 60. P. 281–288.
15. Андреева Н.С., Гуцина А.Е., Федоров А.А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259. С. 1284–1290.
16. Foltmann B. // Essays Biochem. 1981. V. 17. P. 52–84.
17. Suguna K., Padlan E.A., Smith C.M., Carlson W.D., Davies D.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7009–7013.
18. Suguna K., Bott R.R., Padlan E.A., Subramanian E., Sheriff S., Cohen G.H., Davies D.R. // J. Mol. Biol. 1987. V. 196. P. 877–900.
19. Pearl L. // FEBS Lett. 1987. V. 214. P. 8–12.
20. Jaskolski M., Tomasselli A.G., Sawyer T.K., Staples D.G., Henrikson R.L., Schneider J., Kent S.B., Wlodawer A. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 1600–1609.
21. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
22. Popov E.M. // Intern. J. Quant. Chem. 1979. V. 16. P. 707–737.
23. Попов Е.М., Годжаев Н.М., Исмаилова Л.И. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 776–816.
24. Завальный А.А., Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. С. 129–141.
25. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989.
26. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. С. 5–41.
27. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1975. Т. 9. С. 578–593.
28. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 1107–1138.
29. Попов Е.М. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 1229–1243.
30. Пригожин И. От существующего к возникающему. М.: Мир, 1985.
31. Попов Е.М. // Природа. 1993. № 6. С. 59–67.
32. Хургин Ю.И., Чернавский Д.С., Шноль С.Э. // Молекуляр. биология. 1967. Т. 1. С. 419–424.
33. Блюменфельд Л.А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1974.
34. Eyring H., Lamry R., Spikes J. Mechanisms of Enzyme Action. Baltimore: J. Hopkins Univ. Press, 1954.
35. Koshland D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1958. V. 44. P. 81–99.
36. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972.
37. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика. М.: Наука, 1975.
38. Китайгородский А.И. // Докл. АН СССР. 1959. Т. 124. С. 124–129.
39. Попов Е.М., Годжаев Н.М., Алиев Р.Э. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. С. 367–387.
40. Липкинд Г.М., Паслен В.В. // Молекуляр. биология. 1980. Т. 14. С. 928–938.
41. Паслен В.В., Липкинд Г.М. // Молекуляр. биология. 1980. Т. 14. С. 1142–1150.
42. Паслен В.В., Липкинд Г.М. // Молекуляр. биология. 1981. Т. 15. С. 408–423.
43. Белки и пептиды. Т. 1 / Ред. В.Т. Иванов, В.М. Липкин. М.: Наука, 1995. С. 10–72.
44. Попов Е.М. // Успехи химии. 1994. Т. 63. С. 1004–1026.

## Mechanism of Action of Aspartic Proteases.

### I. Theory and Method

E. M. Popov, I. V. Kashparov, and M. E. Popov<sup>1</sup>

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

**Abstract**—Starting from experimental results and contemporary theories of biocatalysis, stereochemistry of aspartic protease functioning was discussed. A general theory of biocatalysis was suggested, which is based on the structural and functional organization of enzyme and substrate molecules and allow a quantitative description of a catalytic act as a continuous, spontaneous, and self-controlled process.

*Key words:* aspartic proteases, mechanism of action, enzymic catalysis.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: popov@enzyme.siobc.ras.ru.