

Каталитические центры гидролаз: структура и каталитический цикл

С.Д.Варфоломеев, И.А.Гариев, И.В.Упоров

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119992 Москва, Ленинские горы, факс (095)939–5417

Рассмотрено использование методов биоинформатики и баз данных для анализа белков, их классификации и нахождения активных центров ферментов. Проанализированы современные данные по структурам активных центров и механизмам действия гидролаз. Показано, что все известные гидролазы можно разделить на четыре группы по типу каталитических центров, различающихся механизмом активации воды. Обсуждены механизмы активации воды каталитическими группами активных центров гидролаз и представлены схемы каталитических циклов, характерных для классических типов активных центров гидролаз. На примере гликозилгидролаз и сериновых гидролаз продемонстрировано, что различные белки могут обладать одинаковым каталитическим центром и механизмом действия. Рассмотрена роль аспарагиновой кислоты и гистидина в активации молекул субстратов гидролаз, а также роль структурообразующих кислот — глицина, пролина и цистеина — в структурной организации активного центра.

Библиография — 195 ссылок.

Оглавление

I. Введение	67
II. Базы данных по последовательностям аминокислот и трехмерным структурам ферментов	68
III. Методы идентификации групп, составляющих каталитический центр	70
IV. Каталитически важные группы и структурообразующие аминокислоты активных центров ферментов	71
V. Классификация гидролаз по типам каталитических центров и механизмам катализа	72
VI. Гликозилгидролазы, целлюлазы	76
VII. Сериновые гидролазы. Автоматический поиск каталитической триады	77
VIII. Механизм активации субстратов активными центрами гидролаз	78
IX. Глицин, цистеин и пролин как структурообразующие аминокислоты	79
X. Скорости лимитирующих стадий — конформационных изменений и переноса протона	80

I. Введение

Наблюдающийся в последние десятилетия значительный прогресс в исследовании ферментов обусловлен, с одной стороны, глубоким фундаментальным интересом к ферментам как высокоэффективным катализаторам химических реакций, а с другой, — непрерывно расширяющимися областями применения ферментов при решении многочисленных практических задач.^{1–13}

С.Д.Варфоломеев. Доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой энзимологии Химического факультета МГУ.

Телефон: (095)939–3589, e-mail: sdvarf@enzyme.chem.msu.ru

Область научных интересов: физико-химическая биология, химическая физика биопроцессов, химическая энзимология.

И.А.Гариев. Аспирант той же кафедры. Телефон: (095)939–3407, e-mail: gariev@hotmail.com

Область научных интересов: биоинформатика, инженерная энзимология.

И.В.Упоров. Кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник той же кафедры. Телефон: (095)939–3407, e-mail: iuporov@rabbit.chem.msu.ru

Область научных интересов: компьютерное моделирование пространственной структуры биополимеров, биоинформатика.

Дата поступления 23 июля 2004 г.

За последние годы накоплен значительный объем информации о структуре ферментов, существенное развитие получили представления о принципах формирования активных центров ферментов и механизмах их действия. Гигантский объем информации об аминокислотных последовательностях и пространственном строении белковых молекул сконцентрирован в многочисленных компьютерных базах данных. Эта информация требует анализа, систематизации и интерпретации с позиций химии каталитических процессов. Данный обзор посвящен использованию методов биоинформатики и баз данных для анализа ферментов и нахождения в них активных центров.

В качестве объектов исследования выбраны гидролазы — ферменты, катализирующие гидролиз различных соединений. Этот выбор определяется рядом обстоятельств. Гидролазы составляют около трети всех известных в настоящее время ферментов (приблизительно 1100 из 3700 в классификаторе ферментов). Для многих гидролаз определены функциональные группы, входящие в активный центр фермента и осуществляющие каталитический цикл. Механизм действия всех гидролаз включает стадию активации воды с использованием ограниченного набора функциональных групп. Немаловажным и существенным для ферментативного катализа в целом является тот факт, что многие элементы структур активных центров гидролаз присутствуют в ферментах других классов.

II. Базы данных по последовательностям аминокислот и трехмерным структурам ферментов

К настоящему времени накоплен значительный объем информации по первичной и пространственной структуре биополимеров. Информация о последовательностях аминокислот в молекулах ферментов широко используется для их классификации (отнесения белков к тому или иному семейству[‡]), определения консервативных аминокислот и их позиций в семействах, изучения транслированных последовательностей белков, получаемых из расшифрованных геномов. Пространственная структура ферментов используется для изучения химических превращений, катализируемых ферментами, объяснения наблюдаемой субстратной специфичности, проведения направленного мутагенеза ферментов с целью придания им определенной функции.

Базы данных, содержащие аминокислотные последовательности или пространственные структуры белков, называют первичными. Вторичные базы данных содержат сгруппированные по тому или иному признаку элементы первичных баз данных, например, базы данных выравниваний аминокислотных последовательностей белков или иерархические базы данных белковых структур.

Одной из наиболее широко используемых первичных баз данных белковых последовательностей является Swiss-Prot/TrEMBL (EMBL — European Molecular Biology Laboratory),¹⁴ получившая дальнейшее развитие в виде базы данных UniProt.¹⁵ Некоммерческая база данных Swiss-Prot поддерживается рядом научных учреждений Европы (Швейцарским и Европейским Институтами биоинформатики) и США и доступна через ExPASy (Expert Protein Analysis System) — протеомный сервер Швейцарского Института биоинформатики (<http://www.expasy.org>). Размещенная здесь информация дублируется на серверах, расположенных во многих странах, что обеспечивает быстрый ответ на запросы пользователей.

На период написания этой статьи (июнь 2004 г.) в последней версии базы данных Swiss-Prot 43.5 содержались сведения о 153 017 аннотированных аминокислотных последовательностях (суммарной длиной 56 301 572 аминокислоты), извлеченные из 116 894 публикаций. Необходимо подчеркнуть, что эта база данных содержит только аннотированные последовательности, т.е. последовательности изученных белков (включая ферменты), для которых точно известна их функция. Дополнением к Swiss-Prot служит база данных TrEMBL, содержащая транслированные последовательности белков. Транслирование производится автоматически с нуклеотидных последовательностей, депонированных в базе данных нуклеотидных последовательностей EMBL Nucleotide Sequence Database.¹⁶ Для белковых последовательностей, размещенных в TrEMBL, известен только источник. Заключение об их предполагаемой функции делается на основании сходства с последовательностями изученных (аннотированных) белков. В последней версии базы данных TrEMBL содержалась информация о 1 062 416 последовательностях (суммарная длина — 332 514 237 аминокислот). Следует отметить почти десятикратную разницу между количеством белковых последовательностей в базе Swiss-Prot (аннотированных) и TrEMBL (транслированных). По мере изучения белки из базы данных TrEMBL переходят в Swiss-Prot, пополняя ряды последовательностей аннотированных белков. Количество последовательностей в Swiss-Prot/TrEMBL растет почти экспоненциально со временем.

Записи в базе данных Swiss-Prot/TrEMBL состоят из нескольких полей, содержание которых можно проиллюстрировать следующим примером. Аминокислотная последовательность форматдегидрогеназы из *Pseudomonas sp.*

штамм 101 имеет код доступа (primary accession number) P33160 (уникальный идентификатор этой последовательности в Swiss-Prot) и имя записи (entry name) FDH_PSESR (второй уникальный идентификатор этой последовательности, несущий определенную смысловую нагрузку: FDH происходит от английского Formate DeHydrogenase, а PSESR указывает на источник *Pseudomonas sp.*). Используя код доступа или имя записи, можно получить имеющуюся информацию об этой аминокислотной последовательности.[‡] Вслед за кодом доступа и именем записи (если такое присвоено) следуют хронологическая информация (дата поступления в базу данных, дата последней модификации, дата модификации аннотации); имя/имена белка (официальное, синонимы, номер в Классификации ферментов — Enzyme Classification, EC), происхождение и таксономические данные; ссылки на работы, в которых была опубликована данная последовательность или ее уточнения; комментарии, касающиеся катализируемой ферментом реакции; сведения о четвертичной структуре и информация о принадлежности к белковому семейству. Затем приводятся перекрестные ссылки на соответствующие записи в других базах данных для этой белковой последовательности. Для приведенной в качестве примера форматдегидрогеназы имеются ссылки на запись в банке данных белковых структур PDB (Protein Data Bank, идентификатор 2NAC) и две записи в базе данных белковых семейств Pfam (Protein families database).¹⁷ Отметим, что количество перекрестных ссылок варьируется для разных последовательностей и зависит от степени изученности белка. Вслед за перекрестными ссылками следует поле «Features», в котором на основании пространственной структуры белка (если она имеется) приводится информация о доменной структуре и элементах вторичной структуры, и, наконец, собственно аминокислотная последовательность.

Перечисленный выше набор полей не столь велик для подавляющего числа белковых последовательностей, входящих в Swiss-Prot (пространственные структуры получены отнюдь не для всех, даже хорошо изученных белков). Для белковых последовательностей из базы данных TrEMBL набор полей еще меньше: достоверными являются источник последовательности (ген), литературные ссылки и сама последовательность. Отметим, что доступ к базе данных Swiss-Prot/TrEMBL позволяет производить различные виды поиска, а пользовательский интерфейс тщательно продуман, что существенно облегчает работу.

Первичной базой данных о пространственной структуре биополимеров является Protein Data Bank (PDB)¹⁸ (<http://www.rcsb.org>). Этот банк данных поддерживается консорциумом Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, в который входят три исследовательских центра США. На июнь 2004 года в этом банке данных содержались сведения о 25 882 структурах биополимеров, установленных методами рентгеноструктурного анализа и многомерного ЯМР (из них 23 429 структур пептидов и вирусов).[§] Отметим, что рост числа структур, депонированных в PDB, носит экспоненциальный характер, так же как и рост объема банков первичных последовательностей. Однако в отличие от банков аминокислотных последовательностей, банк структур может содержать структуры одного и того же биополимера, полученные при различных условиях (например, pH), в комплексе с различными молекулами (например, с ингибиторами) и т.д. Некоторые структуры белков выглядят очень похожими. Если отбросить такие «похожие» структуры, то окажется,

[‡]Заметим, что для всех последовательностей из базы данных TrEMBL код доступа и имя записи совпадают, так как их функция неизвестна, и нет никаких оснований присваивать им имя, основанное на их функции или классификации.

[§]Под структурой биополимеров (в частности, белков) понимают набор декартовых координат тяжелых атомов (всех атомов, кроме атомов водорода), составляющих данный биополимер.

[†]Терминология у разных авторов может различаться.

что имеется около 5 000 структур, различающихся (в той или иной степени) способом укладки полипептидной цепи, причем количество новых типов укладки растет отнюдь не экспоненциально. Заметим, что различие в темпах роста банка первичных последовательностей и банка пространственных белковых структур делают актуальной задачу моделирования структуры белка по его последовательности. Методы моделирования развиваются быстро и интенсивно.¹⁹

Каждой структуре, депонированной в PDB, соответствует текстовый файл, основным содержанием которого являются координаты всех тяжелых атомов данной молекулы (эти координаты считываются программами молекулярной графики или используются как исходная информация при расчетах). Иногда белки имеют пространственные элементы (группы атомов), обладающие высокой лабильностью (часто таковыми являются неупорядоченные структуры на поверхности белковой глобулы, либо несколько ближайших к N-/C-концам аминокислотных остатков), для которых невозможно определить координаты, что приводит к появлению «разрывов» в полипептидных цепях или к отсутствию структурных данных о боковых цепях аминокислотных остатков.

Помимо координат атомов в PDB-файле содержатся ссылки на работы, в которых описана структура белка, подробности эксперимента и последующей обработки полученных результатов, аминокислотная последовательность и вторичная структура белка. Высокая точность определения пространственной структуры ферментов позволяет применять методы квантовой химии для моделирования актов ферментативного катализа.²⁰

Пользовательский интерфейс к базе PDB предоставляет возможность текстового поиска по различным полям. На наш взгляд, наиболее удобной для поиска объекта является база данных PDBsum (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/>), разработанная и поддерживаемая сотрудниками Европейского института биоинформатики.^{21–23} Эта база данных, являющаяся вторичной по нашей классификации, содержит ссылки на PDB-файлы, упорядоченные по тому или иному признаку. Например, можно быстро найти структуру белка, исходя из его ЕС номера, определить все структуры, в состав которых входит тот или иной лиганд или простетическая группа (например, гем или молекула NAD), получить список биомолекул, выделенных из того или иного организма. Из этой базы данных для каждого белка, помимо большого числа перекрестных ссылок, можно получить весьма наглядное представление о вторичной структуре с указанием консервативных аминокислот.

Две базы данных — CATH (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath/>)^{24–25} и SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>)^{26–28} — содержат иерархическую классификацию белковых структур. В этих базах проведена кластеризация структурных доменов белков по укладке полипептидной цепи. Иерархическая природа этих баз данных проявляется в последовательном введении уровней сходства белковых структур. Так, в базе данных CATH структуры сначала объединяются в гомологичные суперсемейства (Homology), семейства — в топологии (Topology), топологии составляют архитектуры (Architecture), которые, в свою очередь, формируют классы (Class). Знание индекса структуры по классификации той или иной базы данных позволяет быстро найти структурных «соседей» и определить качественную степень сходства между различными белковыми структурами.

Одной из баз данных, соединяющей структурную информацию с информацией по последовательностям, является база HSSP (Homology-derived Secondary Structures of Proteins),²⁹ доступная по адресу <http://www.sander.ebi.ac.uk/hssp/>. Эта база содержит парные выравнивания между аминокислотной последовательностью белка, структура которого помещена в банк данных PDB, и последовательностями гомологов (степень идентичности 30% и выше) из банка

данных Swiss-Prot/TrEMBL. С помощью этой информации можно построить модель пространственной структуры белка методом гомологического моделирования.¹⁹ В базе данных HSSP приведены также данные о консервативности аминокислот в аминокислотной последовательности.

Единственной вторичной базой данных белковых последовательностей, которую мы хотели бы обсудить, является упомянутая выше база данных Pfam.¹⁷ Эта база данных содержит множественные выравнивания белковых последовательностей из базы Swiss-Prot/TrEMBL, объединенные в семейства по схожести их аминокислотной последовательности. Белковые семейства, содержащиеся в версии 14.0 этой базы данных (июнь 2004 г.), покрывали 95% известных белковых последовательностей. База данных Pfam доступна по адресу <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>. Множественное выравнивание белковых последовательностей позволило выделить в них домены, проявляющие наибольшее сходство между собой. Аминокислотная последовательность реального белка может состоять из нескольких доменов. Необходимо разделять структурные домены белков, имеющиеся в базах данных CATH или SCOP, и домены в аминокислотной последовательности. Первые выведены из схожести укладки пептидной цепи белков с известной пространственной структурой, вторые определены в результате множественного выравнивания большого числа белковых последовательностей. Часто оказывается, что границы структурных доменов и доменов аминокислотных последовательностей совпадают.

Множественное выравнивание в базе Pfam осуществляется с помощью программы HMMER (<http://hmm.wustl.edu/>), в основе которой лежит метод скрытых марковских моделей (Hidden Markovian Model).²⁹ Выравнивание последовательностей по методу HMM отличается чрезвычайной чувствительностью при установлении гомологии между последовательностями разнесенных в процессе эволюции белков. В основе метода лежит представление, что каждая позиция в последовательности определяется случайным марковским процессом, результатом которого является генерация той или иной аминокислоты. При таком подходе консервативные позиции генерируют только один тип аминокислоты, менее консервативные — два или три. Математически этот факт можно описать введением вероятностей генерации аминокислот во всех позициях. Кроме того, необходимо ввести вероятности перехода из одной позиции в другую, вероятности появления разрывов и т.д. Набор этих вероятностей наряду с архитектурой HMM составляет суть метода HMM для данного белкового семейства. Разработаны эффективные методы, позволяющие последовательными итерациями определить набор этих вероятностей. Отметим главное преимущество метода HMM перед традиционными методами выравниваний — стоимость (penalty) разрыва последовательности при выравнивании не является внешним параметром, а самосогласованно определяется в процессе построения HMM и может изменяться от позиции к позиции. Метод HMM успешно используется и для предсказания структуры и гипотетической функции белковых последовательностей при аннотации геномов.³⁰ Помимо параметров HMM база данных Pfam содержит само множественное выравнивание и соответствующую ему дендрограмму (филогенетическое дерево), схематическое представление пространственной структуры данного домена (если в семейство входит хотя бы один домен с известной пространственной структурой) и гистограмму вероятностей генерации аминокислот в каждой позиции белкового домена (чем больше высота столбца, тем более консервативна данная позиция). Эта информация является чрезвычайно ценной при планировании работ по направленному мутагенезу ферментов, так как позволяет быстро выделить наиболее значимые аминокислотные остатки для исследуемой последовательности.

Перечень приведенных выше баз данных белковых последовательностей и структур отнюдь не является полным. Мы указали и обсудили только те базы данных, которые, на наш взгляд, содержат достаточно важную информацию об аминокислотных последовательностях и пространственных структурах ферментов, причем эта информация представлена в удобной форме и чрезвычайно полезна на различных этапах исследований.

III. Методы идентификации групп, составляющих каталитический центр

Информация о том, что та или иная группа входит в состав каталитического центра и участвует в каталитическом процессе, складывается из различных (часто взаимодополняющих) источников. Существенную роль в развитии представлений о структуре активных центров играют методы химической модификации аминокислотных остатков, особенно если модификатор удастся включить в структуру субстрата или ингибитора и направить в активный центр фермента.^{4,11} Использование методов сайт-направленного мутагенеза с заменой одной или нескольких аминокислот в полипептидной цепи фермента дает возможность весьма надежно идентифицировать участников каталитического процесса. Этот методологический подход находит широкое применение.^{31–36} Создание и интенсивное развитие методов изучения пространственного строения белков обеспечило эту область энзимологии чрезвычайно богатой и надежной структурной информацией.^{37–40} Вместе с тем этой информации недостаточно для идентификации групп, входящих в состав активного центра. Необходимо выделить фрагмент, непосредственно участвующий в каталитическом процессе. Подходы к решению этой задачи обсуждаются ниже.

Благодаря расшифровке ДНК-последовательностей отдельных генов и целых геномов, количество белков, для которых была установлена аминокислотная последовательность, превышает 1 000 000. Однако данное разнообразие скорее кажущееся, так как у разных организмов часто встречаются похожие, произошедшие от одного эволюционного предка (гомологичные) белки. Их аминокислотные последовательности характеризуются высокой степенью идентичности. Что касается ферментов, то они имеют одинаковые каталитические центры, механизм действия, кофакторы и ингибиторы. Поэтому для классификации ферментов на основании анализа их первичной структуры и для их объединения в семейства гомологичных белков часто применяются методы биоинформатики. Следует отметить, что методы сравнения (выравнивание) аминокислотных последовательностей и нахождения степени идентичности хорошо разработаны и автоматизированы, поэтому данный подход позволяет работать с большими объемами данных в автоматическом режиме. Известны две базы данных, использующие данный подход для классификации гидролаз — MEROPS^{41–50} и CAZY.^{51–59}

В базе данных MEROPS^{41–50} (<http://merops.sanger.ac.uk/>) собраны сведения о пептидазах и их ингибиторах. Два фермента помещают в одно семейство, если степень идентичности их аминокислотных последовательностей превышает 30%. Семейства, в свою очередь, объединяют в кланы — группы семейств, гомологичность белков в которых не удается определить методами анализа аминокислотной последовательности, хотя косвенные признаки (такие как способ укладки полипептидной цепи и порядок следования остатков активного центра в аминокислотной последовательности) указывают на возможное родство данных белков. Кланы объединяют в классы по типу каталитического механизма. Так, известны сериновые, тирозовые, аспартильные и металл-зависимые протеазы; сериновые протеазы разбиваются на 10 кланов, которые, в свою очередь, делятся на 25 семейств, охватывающих 6 886 белков.

В базе данных CAZY^{51–59} (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) содержатся сведения о гликозидазах, гликозилтрансферазах и других ферментах, катализирующих создание и разрыв гликозидной связи. На основе анализа идентичности аминокислотных последовательностей все гликозидазы разбиты на 14 кланов, объединяющих 96 семейств.

Анализ идентичности аминокислотных последовательностей применялся и при создании базы данных Catalytic Site Atlas^{60,61} (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>), хотя и не с целью объединения ферментов в семейства гомологичных белков. Создатели базы выбрали около 300 хорошо изученных ферментов, для которых была установлена трехмерная структура. Для каждого фермента приведены данные об аминокислотных остатках, образующих активный центр, а также список белков, аминокислотная последовательность которых близка (с высокой степенью идентичности).[¶]

Биоинформационные методы анализа аминокислотных последовательностей и установления функции белка, рассмотренные выше, получили широкое распространение благодаря большому количеству исходных данных, полученных путем трансляции нуклеотидных последовательностей. Однако функциональные возможности белка определяются в первую очередь его трехмерной структурой, а не первичной. Хотя высокая степень идентичности аминокислотных последовательностей приводит к одинаковому пространственному строению активного центра ферментов, обратное утверждение в общем случае неверно. Так, каталитическая триада Ser–His–Asp встречается как у трипсина, так и у субтилизина. Эти белки имеют негомологичные последовательности аминокислотных остатков, разный порядок аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра, и разную укладку белковой глобулы. Трипсин млекопитающих и бактериальный субтилизин представляют собой пример конвергентной эволюции ферментов — случай, когда ферменты, стартовавшие от разных белков, в ходе эволюции приобрели одинаковое (по-видимому, наиболее оптимальное) строение каталитического центра. Анализ первичных аминокислотных последовательностей таких белков не позволяет установить сходство каталитических центров.

Методы анализа трехмерной (3D) структуры белков позволяют, в принципе, «справиться» с эволюционно неродственными белками, однако в настоящий момент они развиты гораздо хуже, чем методы анализа аминокислотной последовательности белка, и находятся на стадии разработки, а не на стадии широкого применения. Это связано, во-первых, со сложностью изучения систем и, во-вторых, с меньшим объемом исходных данных (белков, для которых известна трехмерная структура, гораздо меньше, чем белков, для которых известна первичная последовательность). Можно предположить, что в будущем методы анализа трехмерных структур белков приобретут большее значение, поскольку количество структур в базе данных PDB непрерывно растет, и точность предсказания 3D-структуры белка по его аминокислотной последовательности увеличивается. Обзор некоторых методов поиска функциональных центров с использованием структурных данных приведен в работе⁶³.

Метод, пригодный для классификации активных центров ферментов и центров связывания субстратов (лигандов или кофакторов) по трехмерной структуре белка предложен в работе⁶⁴. Учитывая, что у 70% ферментов активные центры расположены в наибольшей полости (cavity) белковой глобулы,⁶⁵ можно ограничиться теми аминокислотными остатками белка, которые образуют поверхность полости. Такие остатки могут быть найдены автоматически. В результате такого поиска можно получить физико-химический «портрет» полости — распределение в пространстве зарядов,

[¶] Поиск соответствующих белков был осуществлен методом BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).⁶²

расположение групп, способных быть донорами или акцепторами водородной связи, гидрофобных и гидрофильных участков поверхности. Используя представление полости в виде графа, где вершинами являются атомы, а ребрами — расстояния между ними, можно сравнить два белка независимо от их аминокислотной последовательности и найти наибольшие общие элементы с помощью алгоритма нахождения наибольшего общего подграфа. Таким путем были найдены центры связывания субстратов для субтилилина и трипсина, а также для изомеразы хориновой кислоты, полученной из разных источников, со степенью идентичности аминокислотных последовательностей < 20%, и центры связывания NADH в нескольких неродственных оксидоредуктазах.

Хотя данный метод применим для анализа центров связывания субстратов, однако он, по-видимому, непригоден для поиска самих каталитических центров. Это связано с тем, что, например, в сериновых гидролазах с каталитической триадой Ser–His–Asp на поверхности белковой глобулы находится только остаток серина, а остатки гистидина и аспарагиновой кислоты погружены вглубь белка.

Метод классификации белков по наличию кластеров из нескольких аминокислотных остатков, расположенных одинаковым образом в пространстве, предложен в работе⁶⁶ (метод геометрических инвариантов). Для каждого белка перебираются все возможные группы из нескольких аминокислотных остатков, для каждой группы вычисляются геометрические инварианты — те параметры, для вычисления которых используются координаты атомов, но которые не зависят от трансляций и поворотов системы отсчета (примеры геометрических инвариантов — расстояние между двумя атомами, объем тетраэдра, образованного четырьмя атомами). Каждой группе остатков соответствует одна точка в n -мерном пространстве (n — выбранное число инвариантов), а каждому белку — множество таких точек. Проведя указанную процедуру для всех белков, можно выделить области n -мерного пространства, в которых концентрируются точки, отвечающие разным белкам. Для всех этих белков характерно одинаковое расположение групп аминокислотных остатков в белковой структуре. Данный метод позволил обнаружить остатки активного центра для многих ферментов, включая цистеиновые протеазы, ксиланазы и β -лактамазы. Обсуждаемый метод хорош тем, что позволяет находить общие структурные элементы для разных белков автоматически, при этом не требуется предварительно устанавливать, какие элементы могут быть общими у исследуемых белков. Он позволяет находить общие элементы даже там, где их не предполагалось обнаружить.

В другом подходе на основе экспертных знаний и литературных данных задается желаемое расположение аминокислотных остатков или отдельных атомов в пространстве,[†] соответствующее, например, активному центру фермента, а программа поиска находит подходящие белки в структурной базе.

Впервые использовать шаблоны для классификации белков было предложено в работах^{67, 68} (graph-theoretic approach). Каждый аминокислотный остаток задается вектором, проведенным между двумя атомами, которые определяются типом аминокислотного остатка. Взаимное расположение двух векторов в пространстве определяется расстояниями между их началами, концами и центрами. Шаблоном является набор векторов и матрица троек расстояний между ними, заданный в виде графа, где каждому узлу графа соответствует вектор (аминокислотный остаток), а каждому ребру — элемент матрицы расстояний. Для поиска совпадений структуры белка по шаблону используется один из

алгоритмов нахождения изоморфизма графов. Данный метод реализован в программе ASSAM, с помощью которой удалось правильно найти каталитическую триаду Ser–His–Asp, цинк-связывающий сайт термолитина (и похожих ферментов) и множество других функциональных центров белков.

Очевидный путь усовершенствования данного метода — переход от представления аминокислотного остатка в виде вектора (что дает лишнюю степень осевой симметрии) к координатам отдельных атомов. Данный подход реализован в программах TESS и JESS.^{69–71} В качестве шаблона были использованы координаты атомов (из первичной базы данных PDB) тех аминокислотных остатков, для которых была установлена функциональная значимость. Этот путь привел к созданию базы данных PROCAT⁷⁰ (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PROCAT/>), содержащей данные об активных центрах в структурах белков.

В перечисленных выше методах использовались данные только о трехмерной структуре белков. Они как бы противопоставлялись методам, в основе которых лежат данные только о первичной структуре аминокислотной последовательности. В реальной исследовательской практике для определения функциональной значимости аминокислотного остатка используют оба подхода.

Метод эволюционных следов (Evolutionary Trace)⁷² состоит в нахождении выборки гомологичных белков (обычно автоматически, методом BLAST), в множественном выравнивании этих белков и, наконец, в построении дендрограммы (дерева) по данным выравнивания. Каждому конечному узлу дерева соответствует реальный белок, а каждому промежуточному узлу — некий гипотетический белок, называемый эволюционным предшественником, в последовательности которого известна только та часть аминокислотных остатков, которая одинакова у белков всех дочерних узлов. Таким образом, аминокислотные остатки исходного белка можно ранжировать от самых консервативных, которые одинаковы у всех гомологичных белков выборки, до самых переменных, которые отличаются у исходного белка и его ближайшего родственника. Количественной мерой консервативности является глубина узла в дендрограмме, на котором произошло расхождение. Выбрав остатки с определенной степенью консервативности, можно выделить кластеры тех остатков, которые, согласно структурным данным, находятся в контакте друг с другом. Существует корреляция между консервативными кластерами и функциональными сайтами белка. Метод позволяет правильно определить от 70 до 90% функциональных центров.

IV. Каталитически важные группы и структурообразующие аминокислоты активных центров ферментов

Ответ на вопрос, какие аминокислоты чаще всего образуют активные центры ферментов, был получен на основе сравнения последовательности аминокислот в белках, объединенных в одно крупное семейство^{11, 73, 74} Был проведен анализ результатов выравнивания последовательностей больших семейств ферментов, представленных в базе данных HSSP (<http://www.sander.embl-heidelberg.de/hssp/>).

Обычно выравнивание представляют в виде таблиц, полученных наложением последовательности белков на последовательность, взятую в виде базовой. Консервативные элементы последовательности выявляют визуальным сравнением. Очевидно, данный метод становится малоинформативным и в высшей степени неудовлетворительным, когда нужно сравнивать больше трех–пяти белков. Его можно автоматизировать, определяя количественно консервативность положения аминокислот в последовательности. Одним из количественных критериев консервативности положения каждой аминокислоты в последователь-

[†] Набор ограничений на типы аминокислотных остатков или атомов и на их взаимное расположение в пространстве обычно называется шаблоном (template), хотя терминология может отличаться у разных авторов.

ности аминокислот белка может служить статистический критерий в форме энтропии Шеннона.^{75–77} Заметим, что в теории информации энтропия Шеннона является одной из наиболее важных функций. Эта функция была введена как мера степени неопределенности, характеризующая то или иное событие, имеющее определенную вероятность. При этом информацию можно определить как меру количества неопределенности, которая уточняется после получения сообщения. Формально количество информации представляется разностью между информационными энтропиями до и после совершения опыта (получения сообщения). Информационная энтропия (энтропия Шеннона) является в высшей степени удобной функцией при сравнении родственных белков с различной последовательностью аминокислот. Процедура выравнивания последовательностей относительно какого-либо реперного белка заключается в расположении аминокислотных последовательностей одна над другой с фиксацией гомологичных участков и выявлением и элиминированием вставок. При сравнении большого числа белков можно с достаточной точностью рассчитать вероятность нахождения той или иной аминокислоты в каждой позиции последовательности белков. Эта вероятность определяется как относительная частота появления аминокислоты типа i в данной позиции j . Для каждой позиции в последовательности белка для всех 20 аминокислот может быть вычислена функция энтропии⁷⁵

$$H_j = - \sum_i p_i^j \log_2 p_i^j.$$

Важной особенностью этой функции является то, что она близка к нулю как для событий, происходящих с высокой вероятностью ($p_i^j \rightarrow 1$), так и для событий с низкой вероятностью ($p_i^j \rightarrow 0$). В результате вычисления энтропии Шеннона в последовательности белка могут быть обнаружены позиции, которые являются общими (абсолютно консервативными) для всего большого семейства белков. Это позиция, в которой вероятность появления данной аминокислоты близка к единице, в то время как всех остальных — близка к нулю. Высокие значения энтропии Шеннона характерны для аминокислот, позиции которых в последовательности аминокислот переменны, низкие — для аминокислот, позиции которых в последовательности аминокислот консервативны. В пределе при $p_i^j \rightarrow 1$ (абсолютная консервативность) $H_j \rightarrow 0$ (рис. 1).

С использованием критерия энтропии Шеннона были проанализированы суперсемейства белков, базовыми для которых являются трипсин/химотрипсин, субтилизин, липаза, цитохром С-оксидаза, пепсин/пепсиноген, енолаза, лактатдегидрогеназа, ДНКаза, аминоксил-гРНК-синтетаза и лизоцим.^{73,74} Исследуемая выборка семейств ферментов включает 2281 белок общей длиной в 249 252 аминокислотных остатка.

Анализ позволил выявить следующие закономерности.

1. При выравнивании последовательности аминокислот в ферментах аминокислоты, образующие каталитический активный центр, всегда проявляются как консервативные элементы.

2. При сравнении последовательностей аминокислот глицин и аспарагиновая кислота наиболее часто проявляют себя как абсолютно консервативные аминокислоты.

С нашей точки зрения, представляет интерес рассмотрение предельно консервативных аминокислот, для которых $H_j = 0$ (или близка к нулю). Несколько неожиданным результатом анализа явилось то, что наиболее часто в качестве консервативной аминокислоты выступает глицин. Второе место занимает аспарагиновая кислота, при этом в сумме глицин и аспарагиновая кислота составляют примерно треть от всех консервативных аминокислот.

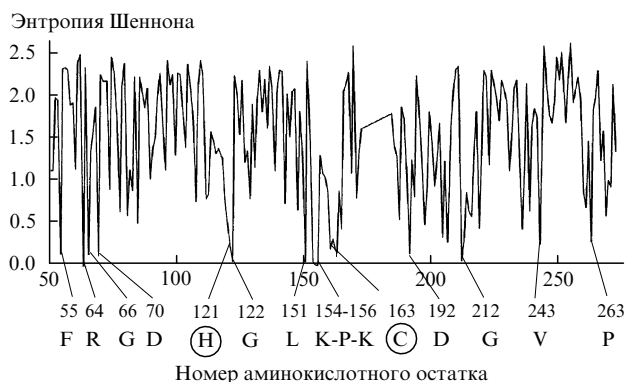


Рис. 1. Представление выравнивания семейства каспазы (HSSP код 1cr3) в форме энтропии Шеннона. Аминокислотные остатки активного центра обведены.

Распределение консервативных аминокислот, %

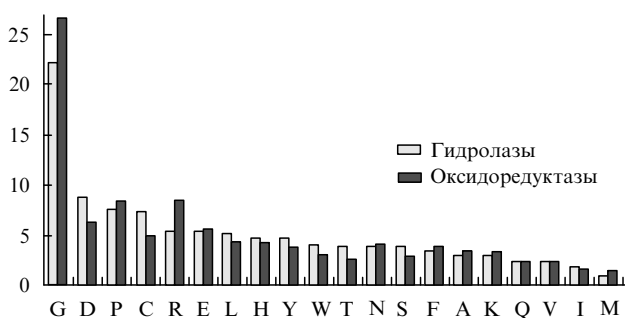


Рис. 2. Рейтинг консервативности аминокислот.

Был проведен рейтинг аминокислот по проявлению консервативности в изученных семействах. С этой целью для каждой аминокислоты была определена частота ее встречаемости как консервативного элемента ($H_j \approx 0$) с нормировкой на общее число консервативных позиций для всех аминокислот в исследованных семействах. Рейтинг консервативности аминокислот для двух классов ферментов — гидролаз и оксидоредуктаз — представлен на рис. 2. Несмотря на различие реакций, катализируемых этими ферментами, характер распределения консервативных аминокислот практически совпадает.

Видно, что глицин, аспарагиновая кислота, цистеин, пролин, аргинин и гистидин наиболее часто проявляют себя как консервативные аминокислоты в аминокислотных последовательностях ферментов, эти аминокислоты составляют ~60% всех консервативных позиций. Метионин и изолейцин практически никогда не бывают консервативными.

Наиболее консервативные аминокислоты логично разделить на две принципиально разные группы, а именно, на аминокислоты, участвующие в элементарных актах активации молекул субстрата в качестве кислот и оснований (аспарагиновая кислота, гистидин и аргинин), и аминокислоты, формирующие архитектуру активного центра (глицин, цистеин, пролин).

Ниже нами будет дано физико-химическое объяснение роли кислот и оснований, а также структурообразующих аминокислот (глицина, пролина, цистеина) в ферментативном катализе на примере гидролаз.

V. Классификация гидролаз по типам каталитических центров и механизмам катализа

При обсуждении структуры активных центров ферментов необходимо разграничить две структурные составляющие

активного центра — сорбционный подцентр, ответственный за связывание, фиксацию и ориентацию субстратов (свойства этого центра определяют специфичность фермента),^{1–3} и каталитический подцентр, осуществляющий химическое превращение молекул субстрата и использующий для этих целей общий кислотно-основной катализ.^{4–6}

По структуре и функциям гидролазы чрезвычайно многообразны. Помимо традиционных задач расщепления биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов) на составляющие мономеры, гидролазы играют выдающуюся роль в ряде принципиально важных процессов, таких как регуляция фибринолиза и тромболиза,^{78–80} апоптоз,^{81–83} передача сигнала в системах фосфорилирования–дефосфорилирования белков,^{84–88} рестрикция и модификация ДНК,^{89,90} устойчивость к антибиотикам,^{91,92} сортировка белков по принципу «нужен–не нужен»,^{93–95} проведение нервного импульса,⁹⁶ развитие канцерогенеза.⁹⁷ В рамках традиционной классификации ферментов, принятой Международным союзом биохимиков, гидролазы классифицируют по типу проводимой реакции (гидролиз) и специфичности фермента (структура используемого субстрата). В настоящее время несовершенство данной номенклатуры становится все более очевидным. С одной стороны, многие ферменты не обладают абсолютной специфичностью и, более того, проявляют несколько типов активности. С другой стороны, многие ферменты, характеризующиеся одной специфичностью и использующие один и тот же субстрат, принципиально различаются по первичной структуре, составу активного центра и укладке полипептидной цепи.

Изучая литературные данные, посвященные механизмам действия различных гидролаз, можно сделать вывод, что, несмотря на большое разнообразие самих ферментов, существует небольшое количество принципиально разных каталитических центров.^{73,74,98}

Гидролазы различаются природой каталитических групп, активирующих молекулу воды в процессе гидролитического каталитического цикла. В принципе, эта информация заложена в пространственной структуре белка. Трудность заключается в однозначной идентификации каталитической группы и молекулы воды, подвергшейся активации. Активный центр может содержать несколько молекул воды, из которых только одна активируется в процессе катализа.

Сравнительный анализ состава активных центров гидролаз и механизмов активации воды позволил выявить четыре основных типа каталитических центров, непосредственно участвующих в активации воды.

1. Гидролазы с аспарагиновой или глутаминовой кислотой в активном центре (пепсин и ретровирусные пепсины, гликозидазы, дегалогеназы и эпексидгидролазы);

2. Гидролазы с остатком гистидина в активном центре (рибонуклеазы — панкреатическая рибонуклеаза и барназа, кислые фосфатазы, гидролазы с триадой Ser–His–Asp и ее изоморфными замещениями, тирозин-гидролазы);

3. Цинк-зависимые гидролазы, содержащие в активном центре один (карбоксипептидаза А) или два (щелочная фосфатаза, органофосфатгидролаза) иона цинка, используемых для активации воды и субстрата;

4. Магний-зависимые гидролазы (ферменты типа неорганической пирофосфатазы, арилсульфатазы).

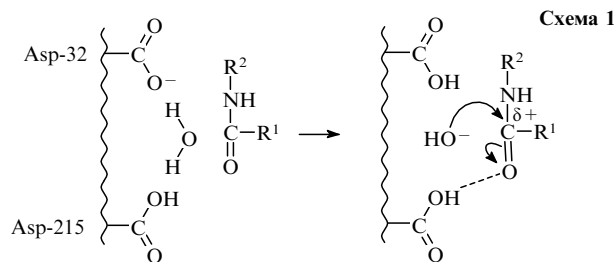
В силу большого числа и важности представляется целесообразным выделить отдельный подтип гидролаз, содержащих остаток серина, цистеина или треонина и цепь переноса протона, которая активирует гидроксильную или сульфгидрильную группу (подтип нуклеофил–имидазол–аспарагиновая (глутаминовая) кислота). Эти ферменты в процессе катализа образуют достаточно устойчивые идентифицированные промежуточные соединения ацилферментной природы.

Анализ механизмов каталитических реакций показывает, что аспарагиновая кислота и гистидин играют принци-

ально важную роль в большинстве типов каталитических центров. Механизмы катализа гидролазами приведены на схемах, которые хотя и являются достаточно приближенными и могут не отражать некоторых деталей механизмов реакций, однако включают главные стадии процессов — активацию воды и гидролиз субстрата.

1. Гидролазы с аспарагиновой или глутаминовой кислотой в активном центре

Гидролазы с аспарагиновой или глутаминовой кислотой в активном центре расщепляют сложноэфирные, амидные и гликозидные связи. Каталитический центр этих ферментов содержит две или более карбоксильных групп.^{4,6} Недиссоциированная карбоксильная группа выступает в качестве электрофила и принимает участие в активации субстрата как обобщенная кислота, а депротонированная группа — в качестве нуклеофила при активации молекулы воды.^{4,5} Обычно ферменты этой группы характеризуются максимумом активности при относительно низких значениях pH. Типичными представителями этой группы гидролаз являются пепсин (протеаза) и лизоцим (гликозидаза).^{99,100} В пепсине носителями карбоксильных групп являются Asp-32 и Asp-215, образующие водородную связь друг с другом и с молекулой воды, атакующей субстрат (пространственное расположение остатков Asp-32 и Asp-215 показано на рис. 3). При оптимальных значениях pH карбоксильная группа Asp-32 ионизирована, а карбоксильная группа Asp-215 находится в недиссоциированной форме. Процессы, происходящие в активном центре, представлены на схеме 1.^{99–103}



Протеаза вируса иммунодефицита человека (ретровирусный пепсин) имеет такой же механизм действия, но два остатка аспарагиновой кислоты (Asp-25) находятся в двух одинаковых субъединицах. Предполагается, что пищеварительный пепсин животных произошел от белка-предшественника, похожего на ретровирусный пепсин, путем дубликации и конкатенации генов. Впоследствии эволюция пепсина привела к изменению локальных окружений двух остатков аспарагиновой кислоты и улучшению его каталитических свойств.¹⁰⁴

Активный центр гликозидаз также содержит два остатка аспарагиновой (или глутаминовой) кислоты, которые распо-

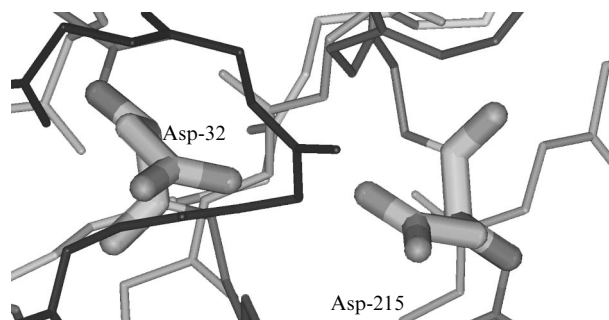
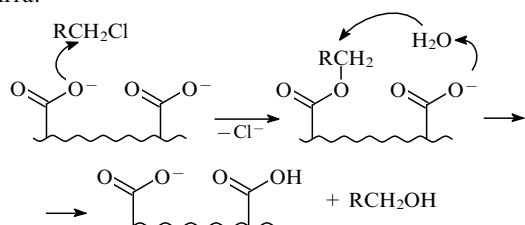


Рис. 3. Активный центр пепсина (PDB код 1flh). Выделены остатки активного центра.

лагаются по разные стороны от гидролизуемой связи. Одна из карбоксильных групп (неионизированная) активирует субстрат путем переноса протона и создает дефицит электронной плотности на углеродном атоме расщепляемой связи. Вторая карбоксильная группа может активировать молекулу воды (механизм с обращением конфигурации атома углерода) или напрямую атаковать субстрат с образованием интермедиата, который впоследствии разрушается молекулой воды (механизм с сохранением конфигурации).^{105, 106} По этому механизму действуют лизоцим^{107–109} и хитиназы.^{110, 111}

Сравнительно недавно были установлены трехмерные структуры дегалогеназ.^{112, 113} Интерес к этой группе ферментов вызван потенциальной возможностью их использования для разложения галогенсодержащих органических загрязнителей окружающей среды. Активный центр дегалогеназ также содержит две карбоксильные группы. Одна из них является нуклеофилом и атакует субстрат с элиминированием галогенид-иона и образованием ковалентного интермедиата. Вторая карбоксильная группа активирует молекулу воды, которая участвует в стадии дезалкилирования фермента.



2. Гидролазы с остатком гистидина в активном центре

Остатки гистидина в гидролазах либо участвуют в активации воды, либо непосредственно взаимодействуют с субстратами.

Согласно классическим представлениям, механизм каталитического расщепления фосфодиэфирных связей в рибонуклеиновой кислоте панкреатической рибонуклеазой А (см.¹¹⁴) обеспечивается согласованным взаимодействием имидазольных групп двух остатков гистидина (рис. 4). Имидазольная группа His-12 активирует 2-гидроксильную группу рибозы путем переноса протона на стадии образования 2,3-циклофосфатного промежуточного соединения, а имидазольная группа His-119 — молекулу воды, гидролизующую циклофосфат.

В активном центре барназы вместо His-12 находится остаток глутаминовой кислоты (Glu-73). Детальный механизм катализа барназой приведен в работах^{115, 116}.

В кислых фосфатазах¹¹⁷ гистидин является нуклеофилом, атакующим фосфорилированный субстрат, что приводит к образованию фосfogистидина и высвобождению незамещен-

ной молекулы субстрата (на следующей стадии фосфоэнзим гидролизруется водой).

Отметим, что в настоящий момент не известно ни одной гидролазы, механизм катализа которой включал бы образование замещенного гистидина с образованием связи азот гистидина — углерод субстрата. По-видимому, это связано с тем, что такая связь относительно стабильна, и ее разрыв был бы лимитирующей стадией в каталитическом цикле.

3. Гидролазы с нуклеофильным остатком серина, цистеина или треонина

Типичными представителями этого типа ферментов являются сериновые протеазы — химотрипсин и трипсин — и цистеиновая протеаза — папаин. Механизм катализа этими ферментами включает ацилирование гидроксильной или тиольной группы фермента с образованием интермедиата (ацилфермента) и его последующим гидролизом.^{4, 118, 119} Так как гидроксильная группа является слабым нуклеофилом, все ферменты этого типа имеют аминокислотные остатки, необходимые для ее активации и депротонирования (цепь переноса протона). Эти же остатки активируют молекулу воды на стадии дезацилирования фермента.

Гидролазы с каталитической триадой Ser-His-Asp являются, по-видимому, наиболее изученными ферментами. К их числу относятся протеазы (трипсин, химотрипсин, эластаза, субтилизин, карбоксипептидаза Y и многие другие),^{4, 120–123} липазы^{92, 124} и ацетилхолинэстераза¹²⁵ (в которой вместо остатка аспарагиновой кислоты находится остаток глутаминовой кислоты). Активный центр химотрипсина содержит остатки Ser-195, His-57 и Asp-102 (рис. 5). Механизм катализа химотрипсином представлен на схеме 2.

Известны многочисленные изоморфные замены аминокислотного состава триады, детально этот вопрос обсуждается в работе¹²⁶. Так, тиоловые гидролазы содержат остаток цистеина вместо остатка серина. Так как тиольная группа — более сильный нуклеофил, чем гидроксильная группа, то в этом случае может использоваться более короткая цепь переноса протона, чем в сериновых гидролазах. Например, многие тиоловые протеазы, гомологичные трипсиновым протеазам, вместо остатка аспарагиновой кислоты, поляризующей имидазольное кольцо гистидина, содержат остаток аспарагина, который образует водородную связь с гистидиновым остатком. Известны примеры ферментов, которые не используют для активации тиольной группы остаток гистидина.¹²⁷

Можно выделить отдельный класс ферментов, аминокислотная группа которых выступает в качестве акцептора протона¹²⁸ при активации гидроксильной группы. Это может быть незаряженная аминогруппа боковой цепи лизина (β-лактамазы¹²⁹ и аспарагиназы¹³⁰). В N-концевых гидролазах, к которым относятся компоненты протеосом¹³¹ и пенициллинацилазы,¹³² N-концевой аминокислотой является серин, треонин или цистеин, и свободная аминокислота основной

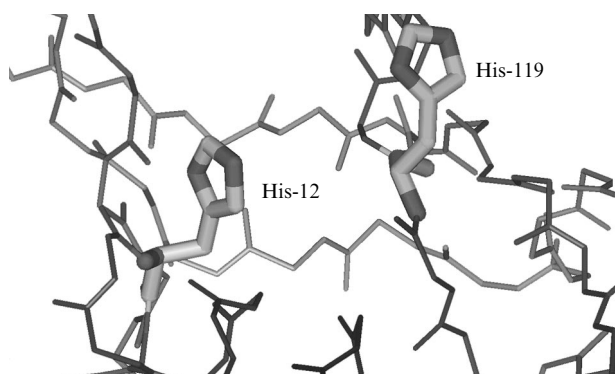


Рис. 4. Активный центр панкреатической рибонуклеазы (PDB код 1a5q).

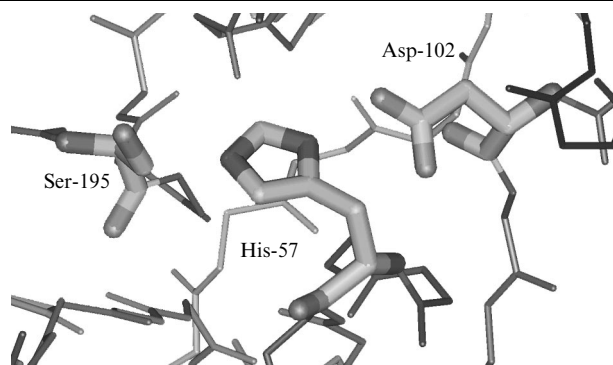
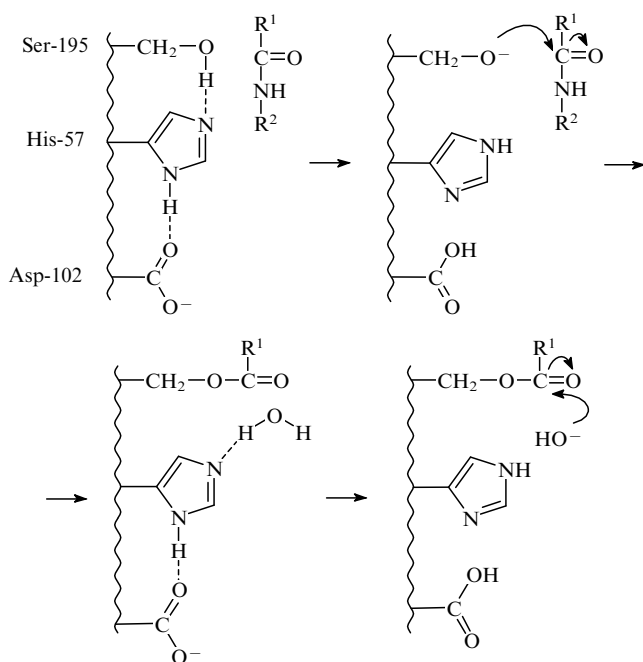


Рис. 5. Активный центр трипсина (PDB код 1fmq).

Схема 2



белковой цепи активирует гидроксильную или тиольную группу этой же аминокислоты.

4. Цинк(никель, кобальт)-зависимые гидролазы

Гидролазы этого типа содержат один или несколько ионов цинка (которые могут быть заменены без потери активности на ионы кобальта или никеля). Ионы металла в активных центрах ферментов могут выполнять две основные функции:^{4, 133, 134} электрофильного агента, активирующего атакуемый реакционный центр субстрата, и электрофильного активатора воды — генератора гидроксильных ионов.

Ферменты типа карбоксипептидазы А, термолизина и ботулинического токсина¹³⁵ содержат один ион цинка в активном центре, лигандами которого могут быть остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, гистидина или цистеина. Комплекс иона металла в структуре активных центров этих ферментов выступает в роли электрофильного агента, активирующего атакуемый реакционный центр субстрата. Активация атакующей молекулы воды осуществляется

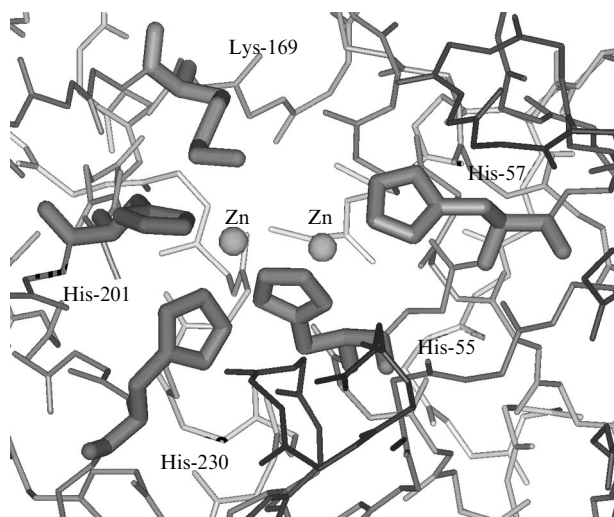
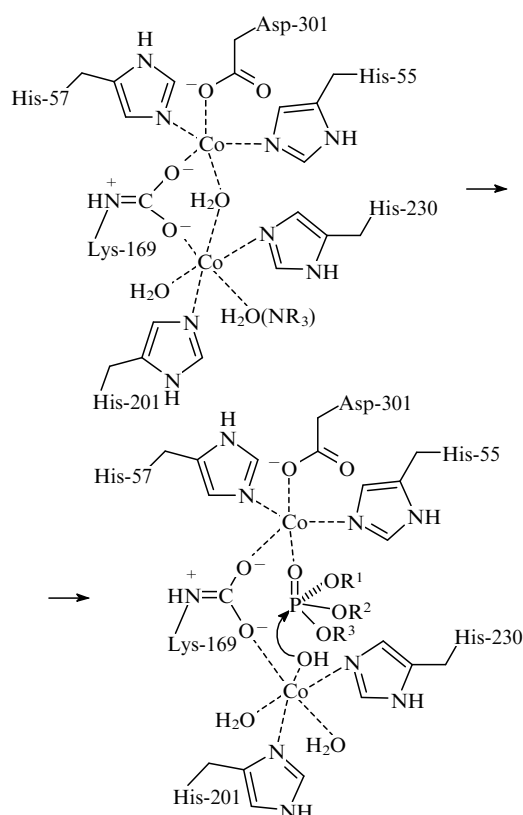


Рис. 6. Активный центр органофосфатгидролазы (PDB код 1dpm).

депротонированной карбоксильной группой глутаминовой кислоты, не входящей в координационную сферу иона цинка.

Ферменты типа щелочной фосфатазы,^{136–138} уреазы,¹³⁹ металл-зависимой β -лактамазы⁹² или органофосфатгидролазы^{140, 141} содержат в активном центре два иона цинка, образующие с белком комплексы однотипной структуры (рис. 6). В качестве лигандов ионов металлов могут выступать остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, гистидина или цистеина, а также *N*-карбоксилированного лизина. Как правило, один из ионов цинка активирует субстрат, вызывая на атакуемых атомах дефицит электронной плотности, а второй активирует молекулу воды или (в случае щелочной фосфатазы) гидроксильную группу серина. Для органофосфатгидролазы^{140–144} (фермента, катализирующего гидролиз фосфорорганических пестицидов, а также боевых отравляющих веществ типа зарина, зомана и Vx) механизм каталитического действия¹⁴⁵ может быть представлен схемой 3.

Схема 3



5. Магний(марганец)-зависимые гидролазы

Гидролазы этого типа содержат в каталитическом центре ионы магния или двухвалентного марганца.^{146, 147} Комплекс металла в активном центре гидролаз, как и в случае цинк-зависимых ферментов, ведет себя как сильный электрофильный агент, активируя субстрат (или молекулу воды) путем индуцирования на реакционном центре дефицита электронной плотности. Наиболее отчетливо такое поведение ионов металлов прослеживается при анализе структуры и механизма катализа неорганической пирофосфатазой.^{148–153} Субстрат фиксируется в активном центре фермента за счет ионных взаимодействий с положительно заряженными группами белка Lys-103, Arg-78, Lys-56. Основные каталитические события разыгрываются с участием двух ионов металла (Mg^{2+} или Mn^{2+}).¹⁵⁴ Лигандами ионов высокоаффинного центра комплексообразования Mg^{2+} (или Mn^{2+}) являются карбоксильные группы остатков Asp-65, Asp-70 и Asp-102, а также три молекулы воды. Низкоаффинный центр образован ионом металла, молекулами воды и карбоксильной группой

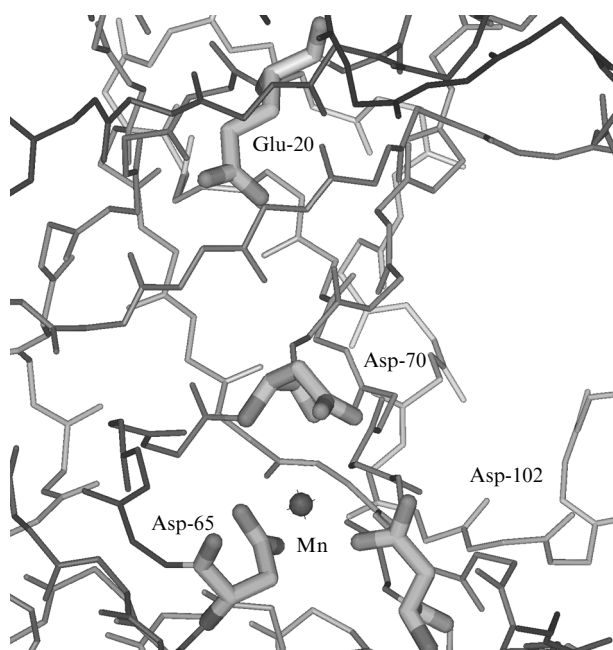
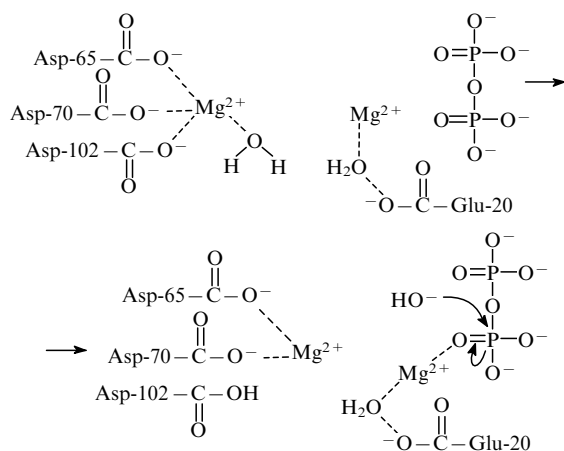


Рис. 7. Активный центр неорганической пирофосфатазы (PDB код 1ipw).

остатка Glu-20 (рис. 7). Можно предположить, что высоко-аффинный центр выполняет функцию электрофильного активатора воды (генератора гидроксил-ионов), а низко-аффинный — электрофильного активатора субстрата.



Приведенные примеры демонстрируют роль аспарагиновой кислоты и гистидина в механизме действия ферментов. Основным принципом функционирования активных центров ферментов является согласованное действие нуклеофильных и электрофильных компонентов активного центра.

Интересно проследить переход от ферментов, катализирующих гидролиз отдельных связей, к ферментам, катализирующим образование этих связей. Известно, что активный центр экзонуклеаз, катализирующих гидролиз ДНК,^{155–159} представляет собой комплекс ионов магния с карбоксильными группами аспарагиновой и глутаминовой кислот и напоминает активный центр пирофосфатазы. Активный центр ДНК-полимеразы, катализирующей синтез ДНК, в большой степени гомологичен активному центру этой нуклеазы.^{155–159} В ДНК-полимеразе происходит активация реакционного центра и нуклеофила теми же функциональными группами, однако, вместо активации воды путем акцентирования протона в ДНК-полимеразе активируется гидроксильная группа сахара. Нуклеофильная атака по реакционному центру фосфатной группы обеспечивает рост цепи ДНК.

Необходимо отметить, что структурные элементы, составляющие активные центры гидролаз, обнаружены и в активных центрах других классов ферментов. Так, цепь переноса протона, включающую пару имидазол–карбоксильная группа аспарагиновой кислоты, часто идентифицируют в активных центрах оксидоредуктаз. Пара имидазол–карбоксильная группа в пероксидазах и белковом окружении гема играет роль обобщенного нуклеофильного агента, активирующего ион железа гема.^{160–162} В активных центрах дегидрогеназ можно идентифицировать этот же структурный элемент системы переноса протона — комплекс имидазола с карбоксильной группой.^{163–165}

VI. Гликозилгидролазы, целлюлазы

Разнообразие структур и способов укладки полипептидной цепи при сохранении основного механизма активации воды и структуры каталитического центра можно проиллюстрировать на примере 1,4-β-гликозилгидролаз и целлюлаз. В этих ферментах в каталитическом акте участвуют две карбоксильные группы, согласованно расщепляющие 1,4-β-гликозидные связи.^{106, 166} По аналогичному механизму действуют ксиланазы, хитиназы и лизоцим.^{107–111} Целлюлазы — мультидоменные белки, содержащие каталитический и целлюлозосвязывающий домены. Эти ферменты представлены большим набором структур.¹⁶⁷ По типу укладки полипептидной цепи их объединяют в 15 кланов, содержащих > 90 структурных семейств.^{167–173} Интересно отметить, что, в отличие от 1,4-β-гликозидаз, α-глюкозидазы представлены всего лишь тремя семействами.^{167, 174} Широкое разнообразие структур каталитических доменов гликозилгидролаз, в частности целлюлаз, обусловлено особенностями первичных последовательностей и укладки полипептидной цепи. В базе данных CAZY дана наиболее полная структурная классификация гликозилгидролаз. Однако структура каталитического центра всего этого набора различающихся по первичной последовательности и вторичной структуре белков весьма однообразна. Активацию молекулы воды и гидролитический каталитический цикл осуществляют две согласованно действующие карбоксильные группы.

Ферменты, содержащие в активных центрах две карбоксильные группы в качестве согласованно действующих электрофильного и нуклеофильного агентов, очень широко распространены в природе. На рис. 8 приведены данные по выравниванию и вычислению энтропии Шеннона пепсина. Видно, что в качестве консервативных аминокислот выступают Asp-32 и Asp-215. С участием двух карбоксильных групп «работают» и другие протеазы, а также пептидазы, лизоцимы, хитиназы и многие другие гидролазы, т.е. набор

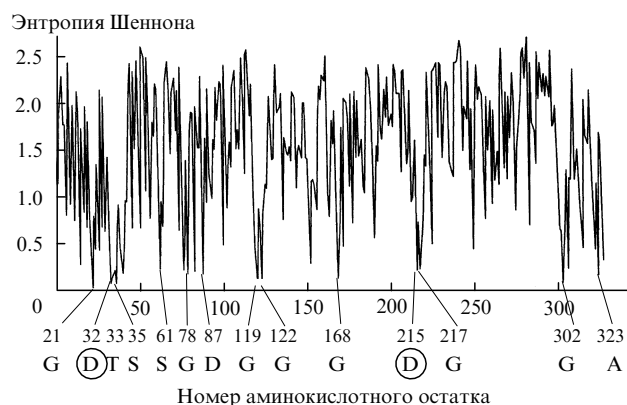


Рис. 8. Представление выравнивания семейства пепсина (HSSP код 1ps0) в форме энтропии Шеннона. Аминокислотные остатки активного центра обведены.

структур практически бесконечен. Однако все эти белковые молекулы построены таким образом, что обеспечивается пространственное сближение и согласованное действие двух карбоксильных групп каталитического центра. Эти данные наглядно иллюстрируют структурный парадокс ферментативного катализа — большое разнообразие белковых структур обеспечивает формирование и сборку весьма ограниченного числа уникальных каталитических центров.^{91, 175, 176}

VII. Сериновые гидролазы. Автоматический поиск каталитической триады

Мы провели автоматический поиск структур каталитических центров гидролаз на основе анализа первичных последовательностей в рамках «выравниваний» и вычисления энтропии Шеннона с использованием шаблона трехмерных структур каталитически значимых остатков. Из четырех классических типов структур активных центров гидролаз наименьшие трудности представляет задача идентификации каталитических групп Zn(Co)- и Mg(Mn)-зависимых ферментов. Локализация иона металла и его окружения с высокой степенью надежности позволяет идентифицировать участников каталитического процесса. Наибольшую трудность вызвала идентификация каталитических центров у гидролаз с карбоксильными группами в активном центре. В силу ограниченного числа ферментов с таким каталитическим центром и отсутствия дополнительных критериев, характеризующих активный центр и отличающих его от других возможных потенциальных структур, применение автоматического метода привело к выявлению большого числа ложных примеров. Возможно, в будущем введение дополнительных ограничений на возможные структуры позволит решить эту задачу с большим успехом. Наиболее адекватные результаты получены при анализе структур белков, содержащих каталитическую триаду серин — гистидин — карбоксильная группа.

Сериновые гидролазы с каталитической триадой Ser–His–Asp — наиболее изученная и представительная группа гидролаз. Каталитический центр этого типа был впервые обнаружен в панкреатическом бычьем α -химотрипсине (см. обзор¹⁷⁷). Затем точно такой же каталитический центр был найден в бактериальном субтилизине — белке, который не гомологичен химотрипсину. Данная триада была обнаружена также в липазах, и похожая триада (Ser–His–Glu) — в ацетилхолинэстеразах. Позже появились новые семейства гидролаз (эстеразы из коры головного мозга, белки вирусных оболочек и др.), неомологичные известным ранее, в каталитическом центре которых находились те же самые остатки с таким же пространственным расположением.¹²⁶ Субстратами могут быть разнообразные физиологически активные вещества, например кокаин¹⁷⁸ или фактор активации тромбоцитов.¹⁷⁹

Сериновые гидролазы образуют с такими субстратами ковалентный интермедиат, в котором гидроксильная группа остатка серина в активном центре ацилирована кислотной частью субстрата (интермедиат типа ацилфермента). В активном центре всех ферментов этого типа триада Ser–His–Asp располагается в пространстве схожим образом, несмотря на различную укладку полипептидной цепи.

Для идентификации каталитически важных групп был применен разработанный нами метод, в котором для оценки консервативности остатков, собранных в базе данных HSSP, используются попарные выравнивания и энтропии Шеннона, а также данные о координатах отдельных атомов для проведения поиска в структурных базах данных белков.

По данным о расположении остатков в химотрипсине и субтилизине (типичное расположение остатков изображено на рис. 9) был задан шаблон каталитической триады (ограничения на искомые аминокислотные остатки приведены в табл. 1) и проведен поиск на множестве неомологичных

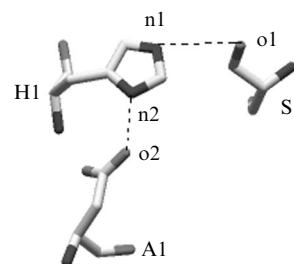


Рис. 9. Типичное расположение остатков каталитической триады. Названия аминокислотных остатков даны заглавными буквами, отдельных атомов — строчными. Пунктирными линиями обозначены расстояния между атомами, на которые были наложены ограничения при поиске (см. пояснения в тексте).

гидролаз из банка данных PDB. Было найдено более 100 структур, имеющих требуемое расположение каталитически важных функциональных групп, с уникальными первичными последовательностями.

Следующим шагом было использование базы данных SCOP, систематизирующей белки по типу укладки полипептидной цепи (см. выше). Для каждого найденного из базы данных SCOP белка извлекались данные об укладке каталитического домена. На рис. 10 изображены два верхних уровня получившейся иерархии. В скобках приведены идентификатор данного типа укладки цепи и его название в базе SCOP. В табл. 2 приведены ферменты, характерные для каждой из групп. Оказалось, что все сериновые гидролазы с триадой Ser–His–Asp(Glu) являются либо белками, построенными только из β -листов (как химотрипсин), либо белками из нерегулярно чередующихся α -спиралей и β -листов (например, субтилизин). До сих пор не известна ни одна гидролаза этого типа, построенная только из α -спиралей. Учитывая, что разным первичным последовательностям соответствуют разные пространственные типы укладки пептидной цепи, можно разбить гидролазы на семейства по этому критерию. Выбирая разный уровень детализации укладки, можно разбить гидролазы на семейства с разным

Таблица 1. Критерии поиска триад Ser–His–Asp по структурам белков.

Тип ограничения	Параметр ^a	Допустимые значения, аминокислоты, атомы
Консервативность аминокислотного остатка	Значение энтропии Шеннона	< 0.9
Ограничение на тип аминокислотного остатка	Остаток S1	Ser
	Остаток H1	His
	Остаток A1	Asp или Glu
Ограничение на тип атома	Атом o1	Атом OG ^b остатка S1
	Атом n1	Атом NE2 ^b остатка H1
	Атом n2	Атом ND1 ^b остатка H1
	Атом o2	Атом OD1, OD2, OE1 или OE2 ^b остатка A1
Ограничение на расстояние между атомами	Расстояние между атомами o1 и n1	$\leq 4 \text{ \AA}$
	Расстояние между атомами n2 и o2	$\leq 3.4 \text{ \AA}$
Ограничение на допустимые углы между тремя атомами	Угол, образованный атомами o1, n1, n2	$100^\circ - 180^\circ$
	Угол, образованный атомами n1, n2, o2	$125^\circ - 180^\circ$

^a Обозначения атомов и остатков совпадают с использованными на рис. 9. ^b Названия атомов соответствуют номенклатуре Protein Data Bank.



Рис. 10. Классификация белковых структур базы данных SCOP.

уровнем похожести. Используя данные рис. 10, можно заключить, что все гидролазы Ser–His–Asp делятся на 2 клана, причем клан белков, построенных из β-листов, состоит из одного семейства, а клан α,β-белков — из 5 различных семейств. Семейства отличаются не только укладкой цепи, но и порядком чередования остатков активного центра в первичной последовательности (см. табл. 2).

Следует отметить, что эти результаты были получены в автоматическом режиме по результатам поиска в структурной базе данных белков PDB и подтверждены независимыми литературными данными. Таким образом, подход, связанный с использованием на этапе отбора информации автоматических методов биоинформатики и баз данных, позволяет обрабатывать огромный объем доступной информации.

Таблица 2. Порядок расположения аминокислотных остатков каталитического центра и типичные представители семейств сериновых гидролаз с каталитической триадой Ser–His–Asp, сгруппированных по типу укладки пептидной цепи.

Тип укладки полипептидной цепи	Триады ^a	Типичные представители данного класса
Трипсиноподобные (b.47)	His–Asp–Ser	α-Триптаза, вирусные протеазы, коллагеназа, компонент системы комплемента, плазминоген, протеаза тучных клеток, протромбины, стрептогизин, трипсин, факторы коагуляции крови, химотрипсин, эластаза
Кротоназоподобные (c.14)	Ser–His–Asp	АТФ-зависимая Clp-протеаза
Флаводоксиназоподобные (c.23)	Ser–Asp–His	Ацил-КоА-тиоэстераза, фактор активации тромбоцитов
Метилэстераза CheB (c.40)	Ser–His–Asp	Гидролаза метилового эфира остатка глутаминовой кислоты
Субтилизиноподобные (c.41)	Asp–His–Ser	Кексин, субтилизин, фурин
α,β-Гидролазы (c.69)	Ser–Asp(Glu)–His	Ацетилхолинэстераза, липаза, эстераза кокаина

^a Порядок расположения остатков каталитического центра в первичной белковой последовательности

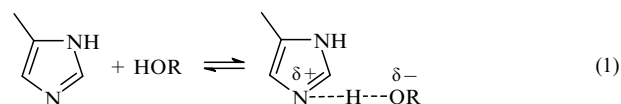
VIII. Механизм активации субстратов активными центрами гидролаз

Кислоты и основания, входящие в активные центры, играют принципиально важную роль в ферментативном катализе, активируя исходные субстраты. Аспарагиновая кислота и гистидин чаще других остатков участвуют в процессах активации молекул в ферментативном каталитическом цикле. Очевидно, что каталитическая функция аспарагиновой кислоты и гистидина в активных центрах ферментов связана с их кислотно-основными свойствами.^{4, 5, 11}

В недиссоциированной форме карбоксильная группа аспарагиновой кислоты является донором протона (это ярко выраженный электрофильный агент), в депротонированной форме — акцептором протона (нуклеофильным агентом) — донором электронной плотности для соответствующего реакционного центра. Имидазольная группа гистидина — ярко выраженный нуклеофильный агент, способный донировать неподеленную электронную пару атома азота.

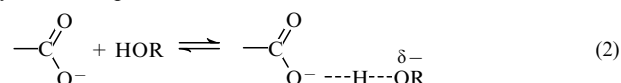
Можно представить несколько схем активации субстратов остатками гистидина и аспарагиновой кислоты (основные реакции, протекающие на каталитическом центре).

1. Нуклеофильная активация субстрата имидазольной группой

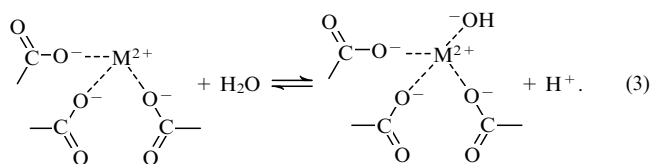


В этом случае на реакционном центре индуцируется отрицательный заряд.

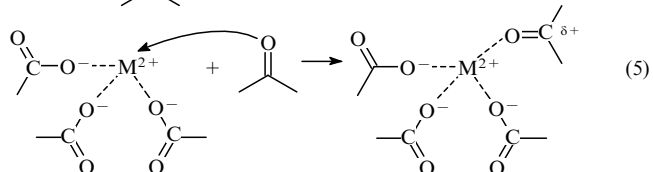
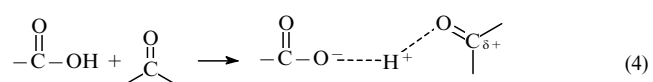
2. Нуклеофильная активация субстрата карбоксильной группой аспарагиновой кислоты



3. Электрофильная активация воды. Ионы металлов (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), находящиеся в активных центрах ферментов в виде комплексов с карбоксильными группами аспарагиновой или глутаминовой кислоты, могут участвовать в каталитическом цикле и как кислоты, и как основания. Ион металла может заместить протон в молекуле воды, индуцируя достаточно реакционноспособный и подвижный ион гидроксид:

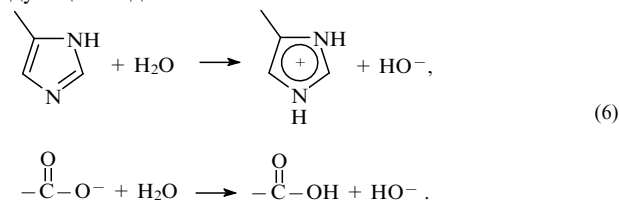


4. Электрофильная активация реакционного центра. Электрофильная активация реакционного центра в субстрате (например карбонильной группы) может проходить как под действием карбоксильной группы, так и под действием иона металла.



Эти реакции увеличивают дефицит электронной плотности на реакционном центре.

Для гидролитических реакций стадии активации воды при нуклеофильном катализе могут быть представлены в следующем виде:



Реакционная способность молекулы воды возрастает в 10^7 раз при ее переходе в гидроксил-ион.⁵ Если допустить, что электрофильная активация реакционного центра, протекающая по механизмам (4) и (5), также в 10^6 – 10^7 раз увеличивает его реакционную способность, можно в первом приближении объяснить высокую эффективность ферментативного катализа и его способность в 10^{13} – 10^{14} раз увеличивать скорость реакции. Предположение, что кислоты и основания в катализе могут действовать согласованно, было высказано на основе ряда независимых экспериментальных работ.^{5, 180, 181}

Вопрос о степени переноса заряда в процессах активации, протекающих по схемам (1)–(6), в переходном состоянии ферментативных реакций остается открытым.¹⁸² Однако очевидно, что в реакционных центрах происходит активация хорошо ориентированных и зафиксированных друг относительно друга молекул. Принципиально важно, что кислоты и основания каталитического центра образуют друг с другом систему водородных связей. Это открывает уникальные возможности для переноса протона. Кислоты и основания могут взаимодействовать в системах с водородными связями гораздо быстрее, чем в растворе. Примером, иллюстрирующим такого рода возможность, является исследованный Эйгеном¹⁸³ процесс взаимодействия гидроксил-иона и протона в системе структурированных водородными связями молекул воды в кристалле льда. Оказалось, что скорости взаимодействия гидроксильного иона и иона водорода на 3–4 порядка превышают диффузионно-контролируемые процессы. Фактически перенос протона и нейтрализация зарядов может происходить в рамках одного колебания с частотой 10^{14} с⁻¹. Структурирование реагентов и компонентов каталитического центра системой водородных связей является неотъемлемой характеристикой ферментативного катализа.¹⁸⁴

Для выяснения механизма действия каталитического центра того или иного фермента необходимо в первую очередь идентифицировать кислоты и основания (электрофильные и нуклеофильные агенты), составляющие каталитический центр. Механизмы активации, представленные схемами (1)–(6), позволяют объяснить эффективность большинства известных ферментативных реакций. Мы описали один из алгоритмов идентификации активных групп каталитического центра. Если известна последовательность аминокислот в белке, можно методами биоинформатики найти группу белков (ферментов), гомологичных данному белку. Процедура выравнивания и расчет энтропии Шеннона позволяют обнаружить позиции консервативных аминокислот. Последние с высокой степенью вероятности представляют собой каталитически важные остатки, обеспечивающие активацию субстратов и тем самым задающие механизмы каталитического действия.

IX. Глицин, цистеин и пролин как структурообразующие аминокислоты

Как показывает сравнение последовательностей аминокислот в гомологичных семействах, принципиально важными элементами активного центра ферментов являются консервативные остатки глицина, цистеина и пролина. Роль глицина в формировании и функционировании активных

центров не столь очевидна, как роль аспарагиновой кислоты. Ясно, что консервативные остатки глицина не играют заметной роли в химических актах активации молекул в каталитическом цикле. Тем не менее эта аминокислота в структуре белка весьма важна,^{73, 74, 185–190} что следует из результатов ее сайт-специфической замены на любую другую аминокислоту. Как правило, такая замена приводит к полной потере или существенному снижению активности фермента.¹⁸⁸

При изучении субстратной специфичности функционального домена дегидрогеназ галогенорганических кислот¹⁹¹ было показано, что мутация консервативного остатка Gly, расположенного между аминокислотными остатками каталитического центра, на Pro, Val или Ala приводит к драматичному уменьшению каталитической активности. Структурные исследования мутантов продемонстрировали кардинальную перестройку конформации боковых цепей остатков, формирующих каталитический центр. Был сделан вывод о критичности присутствия Gly для придания гибкости полипептидной цепи при укладке в области активного центра. Роль консервативных остатков Gly в функционировании грамицидин-S-синтазы была изучена в работе¹⁹². Показано, что единичные мутации трех консервативных остатков Gly на Glu или Asp приводят к потере валинаденилатной активности этого фермента.

По-видимому, консервативные остатки глицина принципиально важны по следующим причинам. Во-первых, являясь уникальной аминокислотой с наиболее энергетически облегченным вращением вокруг связей C–N и C–C полипептидной цепи, глицин может играть роль узловой точки, обеспечивающей возможности изменения направления укладки полипептидной цепи при сборке белковой глобулы. Таким образом, наличие консервативных остатков глицина позволяет объяснить структурный парадокс ферментативного катализа, который заключается в том, что одинаковые активные центры «собираются» из совершенно различных полипептидных цепей. Общим для этих цепей является наличие консервативных остатков глицина и факторов стабилизации «собранный» структуры, например дисульфидных связей.

Существенное влияние консервативных остатков глицина на формирование структуры активных центров ферментов выявлено в компьютерных расчетах.⁷⁴ Методом компьютерного моделирования были изучены изменения конформации аминокислотных остатков активного центра гидролаз, принадлежащих разным типам. Для каждого из представителей семейства гидролаз проводились две серии расчетов. В первой серии все консервативные Gly заменяли на Ala и определяли вызванные этой заменой изменения конформации цепи в области активного центра. Во второй серии проводили аналогичные расчеты, только заменяли неконсервативные остатки Gly на Ala. В качестве меры искажения геометрии активного центра ферментов использовали среднеквадратичное отклонение координат атомов остатков активного центра (в расчете на один атом) в структуре, рассчитанной после проведения замен, от координат в активном центре исходного фермента при пространственном совмещении этих структур. Оказалось, что для всех изученных типов гидролаз замена консервативных Gly на Ala приводит к более существенным искажениям геометрии активного центра ферментов, чем замена большего количества неконсервативных Gly. Это свидетельствует о повышенной «чувствительности» геометрии активного центра ферментов к наличию остатков Gly в консервативных позициях.

Во-вторых, консервативные остатки глицина могут играть роль конформационных «шарниров», обеспечивающих конформационную подвижность каталитических групп. Подтверждением этому может служить тот факт, что во многих случаях вблизи каталитически активных групп были обнаружены консервативные остатки глицина. Например, для гидролаз из различных семейств консервативными

являются следующие мотивы: Asp-215-X-Gly-217 (пепсин); Asp-170-X-X-Gly-173 (термолизин); Asp-32-X-Gly-34, His-63-Gly-64, Gly-219-X-Ser-221 (субтилизин); Gly-173-X-Ser-177 (трипсин); His-76-Gly-77, Ser-153-X-Gly-155, Gly-175-X-Asp-177, Gly-X-Ser-X-Gly (липазы).¹⁹³ Аминокислоты Asp, Ser и His в указанных ферментах входят в структуры активных центров.

Превращение исходного субстрата в конечные продукты при ферментативном катализе сопровождается образованием большого числа интермедиатов с отличной от исходного субстрата структурой. Остатки глицина активного центра могут играть роль «релаксирующих» элементов, конформационно подстраивая активный центр для следующего элементарного акта.

Существенную роль в формировании архитектуры активного центра играют также цистеин и пролин (четвертая и третья позиции в рейтинге консервативности аминокислот). Пролин, как известно, является уникальной аминокислотой, разворачивающей полипептидную цепь.

Роль остатков цистеина заключается, по-видимому, в «фиксации» необходимой конфигурации активного центра, складывающейся из различных, часто очень удаленных друг от друга участков полипептидной цепи, за счет образования химической связи в виде дисульфидного мостика. Для многих ферментов этот процесс завершает формирование архитектуры активного центра.

X. Скорости лимитирующих стадий — конформационных изменений и переноса протона

Интересно проанализировать и сопоставить численные значения констант скоростей k_{cat} лимитирующих и известных элементарных стадий каталитического процесса с участием ферментов. В настоящее время собран обширный материал о величинах V_{max} , K_m (константа Михаэлиса) и k_{cat} .

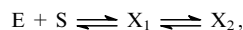
На рис. 11 приведены кривые плотности распределения ферментов по величинам k_{cat} , K_m и k_{cat}/K_m , а также по константам скоростей элементарных стадий k_1 , k_{-1} , k_{conf} (см.¹¹). По форме полученные кривые близки к нормальному логарифмическому распределению.

Величины k_{cat} лежат в диапазоне $10^1 - 10^4 \text{ с}^{-1}$. В природе наиболее широко распространены ферменты, лимитирующая стадия реакций с которыми имеет порядок 10^2 с^{-1} . Аналогичный вид имеет распределение ферментов по величине K_m . Диапазоны изменений этого параметра — от 10^{-2} до $10^{-7} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$. Плотность распределения имеет максимум при $K_m \approx 10^{-4} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$. Параметр k_{cat}/K_m для различных ферментов лежит в диапазоне $10^1 - 10^{10} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$; наиболее распространены ферменты с $k_{\text{cat}}/K_m = 10^6 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Эти значения характеризуют лимитирующую стадию процесса превращения субстрата на активном центре фермента. Существующий энергетический барьер $10 -$

17 ккал $\cdot \text{моль}^{-1}$ обусловлен, по-видимому, рядом физико-химических эффектов. Остальные стадии протекают быстрее.

Существенными стадиями каталитического цикла являются структурные изомеризации. Если конформационные изменения затрагивают активный центр фермента, то это находит отражение в кинетике ферментативной реакции. Во многих случаях связывание фермента с субстратом (или ингибитором) протекает по двухстадийному механизму:



где E — фермент, S — субстрат, X_1 — первичный комплекс, X_2 — фермент-субстратный (или фермент-ингибиторный) комплекс.

Поскольку при образовании фермент-субстратных (или фермент-ингибиторных) комплексов не происходит образования ковалентной связи, то вторая стадия реакции представляет собой конформационное превращение первичного комплекса X_1 . Этот факт является, по-видимому, одним из наиболее строгих доказательств существования конформационных изменений активного центра фермента, сопровождающих ферментативный катализ.¹¹

Конформационные изменения $X_1 \rightleftharpoons X_2$ во многих случаях протекают быстрее ($10^{-3} - 10^{-4} \text{ с}^{-1}$), чем лимитирующая стадия катализа.

В настоящее время известны константы скоростей многих конформационных изменений белков, сопровождающих каталитические превращения. На основе этих данных можно провести статистический анализ и выявить «типичные» характеристики процесса. На рис. 11,а приведена кривая плотности распределения констант скорости конформационных изменений (k_{conf}). Максимум плотности распределения лежит в области 10^3 с^{-1} . Видно, что кривая плотности распределения k_{conf} весьма близка к кривой распределения констант скоростей лимитирующих стадий. Можно предположить, что в некоторых случаях скорость конформационных изменений определяет скорость ферментативных реакций.

Однако в большинстве случаев конформационные изменения протекают быстрее и предшествуют скоростью определяющей стадии. Роль конформационных изменений в катализе ферментами очевидна. Ферментативные реакции протекают по достаточно сложным механизмам с перераспределением большого числа связей. Такого рода процессы не могут протекать в одну элементарную стадию. Механизмы действия ферментов включают образование и превращение большого числа интермедиатов. Фермент обеспечивает прохождение реакции по пути наименьших энергетических и энтропийных затрат. Механизм действия фермента можно сравнить с работой станка с программным управлением, действующим на молекулярном уровне, при этом конформационные изменения обеспечивают выполнение этой программы.

В терминах химической кинетики это означает, что за счет конформационных изменений в исходном состоянии обра-

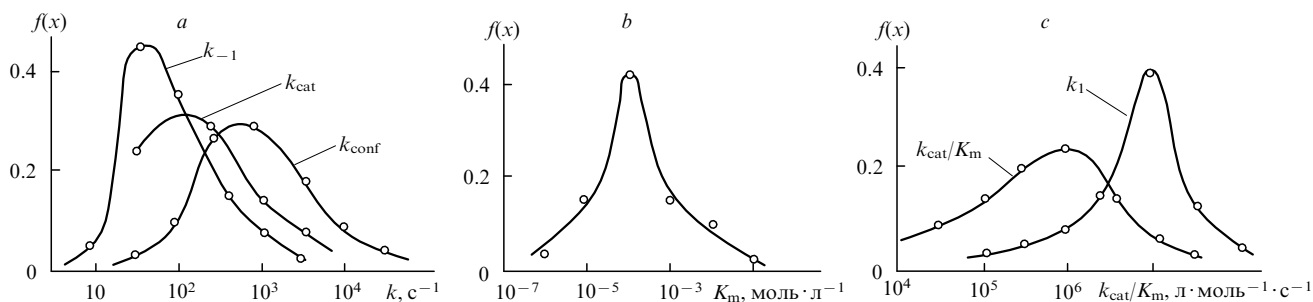


Рис. 11. Распределение ферментов по величинам k_{cat} (а), K_m (б) и k_{cat}/K_m (с).

а — константа скорости первого порядка, б — константа Михаэлиса, с — константа скорости второго порядка.

зуется структура, близкая к переходному состоянию. Конформационные изменения «продвигают» реагенты по пути реакции. Образование конформера, приближенного по структуре к переходному состоянию или продукту реакции, способно заметно уменьшить потенциальный барьер реакции. Уменьшение барьера тем больше, чем ближе структура конформера к переходному состоянию или продукту реакции.

Вторым процессом, ограничивающим скорость ферментативной реакции, является перенос протона. Как следует из сказанного выше, характерной особенностью ферментативных реакций является их кислотно-основной характер.

Благодаря классическим работам Эйгена^{194, 195} механизм взаимодействия протона с основаниями и иона гидроксила с кислотами в настоящее время достаточно хорошо понят. Основной вывод — данные реакции не зависят от основности или кислотности реагентов, а представляют собой процессы, контролируемые диффузией ($k \approx 10^{10} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$). Соответственно, константы скорости обратных реакций определяются величиной константы равновесия. В ряде случаев стадии переноса протона могут быть лимитирующими стадиями ферментативного процесса.

Поскольку каталитически активная группа в процессе реакции претерпевает как протонирование, так и депротонирование, реакции переноса протона ставят определенные ограничения на эффективность кислотно-основного катализа. Происходящие при этом процессы можно записать в виде:



Поскольку обратные стадии этих реакций контролируются диффузией реагентов, константы скорости прямых реакций можно представить в виде $10^{10} K_a \text{ с}^{-1}$ и $10^{10} (K_w/K_a) \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ (K_a — константа кислотной диссоциации BH^+ , K_w — константа ионизации воды). Константа скорости всего процесса имеет максимальное значение, равное примерно 10^3 с^{-1} при $K_a \approx 10^{-1} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$. Действительно, если $K_a < 10^{-7} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$, константа скорости диссоциации кислоты BH^+ (реакция 7a) становится меньше 10^3 с^{-1} , если $K_a > 10^{-7} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$, константа скорости гидролиза основания (реакция 7b) становится меньше 10^3 с^{-1} . Таким образом, максимальная константа скорости кислотно-основного катализа с участием воды равна 10^3 с^{-1} . Этот вывод может быть использован для объяснения максимальных скоростей ферментативного катализа. Значение 10^3 с^{-1} является характерным для числа оборотов многих ферментов (см. рис. 11, a). Кроме того, оптимальное значение $pK_a \approx 7$, необходимое для эффективного катализа, соответствует pK_a имидазольной группы остатка гистидина.

Анализ структур активных центров ферментов показывает, что во многих случаях имидазольная группа гистидина участвует в каталитическом акте в виде комплекса с более сильным нуклеофилом (протонное «сопряжение») — депротонированной карбоксильной группой аспарагиновой или глутаминовой кислоты. Кинетическая роль такого сопряжения достаточно очевидна. Перенос протона от протонированного имидазола на карбоксильную группу в последней стадии каталитического цикла позволяет регенерировать свойства каталитического центра за время, лежащее в микросекундном диапазоне. Действительно, константа скорости реакции $\text{R}-\text{COOH} \rightarrow \text{R}-\text{COO}^- + \text{H}^+$ равна 10^6 с^{-1} .

Таким образом, ферментативный катализ иллюстрирует предельные возможности каталитических ускорений, которые могут быть реализованы для реакции в растворе.

Эволюция биокатализа, по-видимому, достаточно долго искала (методом проб и ошибок) наиболее эффективные структуры. Закрепив их на генетическом уровне, биосистемы научились использовать эти структуры для формирования различных активных центров, и не только гидролазного типа.

Литература

1. И.В.Березин, К.Мартинек. *Основы физической химии ферментативного катализа*. Высшая школа, Москва, 1977
2. С.Д.Варфоломеев, С.В.Зайцев. *Кинетические методы в биохимических исследованиях*. Изд-во МГУ, Москва, 1982
3. А.А.Клосов. *Успехи биологического катализа*. Изд-во МГУ, Москва, 1979
4. В.К.Антонов. *Химия протеолиза*. Наука, Москва, 1991
5. В.П.Дженкс. *Катализ в химии и энзимологии*. Мир, Москва, 1972
6. М.Диксон, Э.Уэбб. *Ферменты*. Мир, Москва, 1982
7. *Perspectives in Bioremediation Technologies for Environment Protection*. (Eds J.R.Wild, S.D.Varfolomeev, A.Scozzafava). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; Boston; London, 1997
8. *Enzymes in Action. Green Solutions for Chemical Problems*. (Eds. B.Zwanenburg, M.Mikolajczyk, P.Kielbasinski). Kluwer Academic Publishers, New York, 2001
9. K.Faber. *Biotransformation in Organic Chemistry*. (3rd Ed.). Springer, Heidelberg, 1997
10. U.T.Bounscheuer, R.J.Kazlauskas. *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio and Stereoselective Biotransformations*. Wiley, Weinheim, 1999
11. С.Д.Варфоломеев. *Химическая энзимология*. Академия, Москва, 2004
12. D.A.Kraut, K.S.Carroll, D.Herschlag. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 517 (2003)
13. J.Jeffery. *EXS*, **73**, 79 (1995)
14. B.Boeckmann, A.Bairoch, R.Apweiler, M.-C.Blatter, A.Estreicher, E.Gasteiger, M.J.Martin, K.Michoud, C.O'Donovan, I.Phan, S.Pilbout, M.Schneider. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 365 (2003)
15. R.Apweiler, A.Bairoch, C.H.Wu, W.C.Barker, B.Boeckmann, S.Ferro, E.Gasteiger, H.Huang, R.Lopez, M.Magrane, M.J.Martin, D.A.Natale, C.O'Donovan, N.Redaschi, L.S.Yeh. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 115 (2004)
16. T.Kulikova, P.Aldebert, N.Althorpe, W.Baker, K.Bates, P.Browne, A.van den Broek, G.Cochrane, K.Duggan, R.Eberhardt, N.Faruque, M.Garcia-Pastor, N.Harte, C.Kanz, R.Leinonen, Q.Lin, V.Lombard, R.Lopez, R.Mancuso, M.McHale, F.Nardone, V.Silventoinen, P.Stoehr, G.Stoesser, M.A.Tuli, K.Tzouvara, R.Vaughan, D.Wu, W.Zhu, R.Apweiler. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 27 (2004)
17. A.Bateman, L.Coin, R.Durbin, R.D.Finn, V.Hollich, S.Griffiths-Jones, A.Khanna, M.Marshall, S.Moxon, E.L.Sonnhammer, D.J.Studholme, C.Yeats, S.R.Eddy. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 138 (2004)
18. H.M.Berman, J.Westbrook, Z.Feng, G.Gilliland, T.N.Bhat, H.Weissig, I.N.Shindyalov, P.E.Bourne. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235 (2000)
19. D.Baker, A.Sali. *Science*, **294**, 93 (2001)
20. M.Garcia-Viloca, J.Gao, M.Karplus, D.G.Truhlar. *Science*, **303**, 186 (2004)
21. R.A.Laskowski, E.G.Hutchinson, A.D.Michie, A.C.Wallace, M.L.Jones, J.M.Thornton. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 488 (1997)
22. N.M.Luscombe, R.A.Laskowski, D.R.Westhead, D.Milburn, S.Jones, M.Karmirantzou, J.M.Thornton. *Acta Crystallogr., Sect. D*, **54**, 1132 (1998)
23. R.A.Laskowski. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 221 (2001)
24. C.A.Orengo, A.D.Michie, S.Jones, D.T.Jones, M.B.Swindells, J.M.Thornton. *Structure*, **5**, 1093 (1997)
25. F.M.G.Pearl, D.Lee, J.E.Bray, I.Sillitoe, A.E.Todd, A.P.Harrison, J.M.Thornton, C.A.Orengo. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 277 (2000)
26. A.G.Murzin, S.E.Brenner, T.Hubbard, C.Chothia. *J. Mol. Biol.*, **247**, 536 (1995)
27. L.L.Conte, S.E.Brenner, T.J.P.Hubbard, C.Chothia, A.G.Murzin. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 264 (2002)
28. A.Andreeva, D.Howorth, S.E.Brenner, T.J.P.Hubbard, C.Chothia, A.G.Murzin. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 226 (2004)
29. R.Durbin, S.Eddy, A.Krogh, G.Mitchison. *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*. Cambridge University Press, Cambridge, 1998
30. J.Goug, K.Karplus, R.Hughey, C.Chothia. *J. Mol. Biol.*, **313**, 903 (2001)
31. J.E.Butler-Ransohoff, S.E.Rokita, D.A.Kendall, J.A.Banson, K.S.Carano, E.T.Kaiser, A.R.Matlin. *J. Org. Chem.*, **57**, 142 (1992)
32. B.Stec, M.J.Hehir, C.Brennan, M.Nolte, E.R.Kantrowitz. *J. Mol. Biol.*, **277**, 647 (1998)

33. R.Han, J.E.Coleman. *Biochemistry*, **34**, 4238 (1995)
34. J.E.Butler-Ransohoff, D.A.Kendall, E.T.Kaiser. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4276 (1988)
35. A.Chaidaroglou, D.J.Brezinski, S.A.Middleton, E.R.Kantrowitz. *Biochemistry*, **27**, 8338 (1988)
36. A.Matagne, J.M.Frere. *Biochim. Biophys. Acta*, **1246**, 109 (1995)
37. J.D.Otvos, J.R.Alger, J.E.Coleman, I.M.Armitage. *J. Biol. Chem.*, **254**, 1778 (1979)
38. P.Gettins, J.E.Coleman. *J. Biol. Chem.*, **258**, 408 (1983)
39. P.Gettins, J.E.Coleman. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4991 (1984)
40. P.Gettins, M.Metzler, J.E.Coleman. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2875 (1985)
41. N.D.Rawlings, D.P.Tolle, A.J.Barrett. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 160 (2004)
42. N.D.Rawlings, A.J.Barrett. *Biochem. J.*, **290**, 205 (1993)
43. N.D.Rawlings, A.J.Barrett. *Methods Enzymol.*, **244**, 19 (1994)
44. N.D.Rawlings, A.J.Barrett. *Methods Enzymol.*, **244**, 461 (1994)
45. N.D.Rawlings, A.J.Barrett. *Methods Enzymol.*, **248**, 105 (1995)
46. N.D.Rawlings, A.J.Barrett. *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 247 (1995)
47. N.D.Rawlings, A.J.Barrett. In *Proteolysis in Cell Functions*. (Eds V.K.Hopsu-Havu, M.Jarvinen, H.Kirschke). IOS Press, Amsterdam, 1997. P. 13
48. A.J.Barrett, N.D.Rawlings, J.F.Woessner. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, 1998
49. J.-M.Chen, N.D.Rawlings, A.J.Barrett. *FEBS Lett.*, **441**, 361 (1998)
50. A.J.Barrett, N.D.Rawlings, E.A.O'Brien. *J. Struct. Biol.*, **134**, 95 (2001)
51. P.M.Coutinho, B.Henrissat. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. (Eds H.J.Gilbert, G.Davies, B.Henrissat, B.Svensson). Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999. P. 3
52. P.M.Coutinho, B.Henrissat. In *Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation*. (Eds K.Ohmiya, K.Hayashi, K.Sakka, Y.Kobayashi, S.Karita, T.Kimura). Uni Publishers Co., Tokyo, 1999. P. 15
53. B.Henrissat. *Biochem. J.*, **280**, 309 (1991)
54. B.Henrissat, A.Bairoch. *Biochem. J.*, **293**, 781 (1993)
55. B.Henrissat, A.Bairoch. *Biochem. J.*, **316**, 695 (1996)
56. G.Davies, B.Henrissat. *Structure*, **3**, 853 (1995)
57. M.L.Sinnott. *Chem. Rev.*, **90**, 1171 (1990)
58. J.A.Campbell, G.J.Davies, V.Bulone, B.Henrissat. *Biochem. J.*, **326**, 929 (1997)
59. P.M.Coutinho, E.Deleury, G.J.Davies, B.Henrissat. *J. Mol. Biol.*, **328**, 307 (2003)
60. C.T.Porter, G.J.Bartlett, J.M.Thornton. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 129 (2004)
61. G.J.Bartlett, C.T.Porter, N.Borkakoti, J.M.Thornton. *J. Mol. Biol.*, **324**, 105 (2002)
62. S.F.Alschul, W.Gish, W.Miller, E.W.Myers, D.J.Lipman. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403 (1990)
63. S.Jones, J.M.Thornton. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 3 (2004)
64. S.Schmitt, D.Kuhn, G.Klebe. *J. Mol. Biol.*, **323**, 387 (2002)
65. R.A.Laskowski, N.M.Luscombe, M.B.Swindells, J.M.Thornton. *Protein Sci.*, **5**, 2438 (1996)
66. A.V.Tendulkar, P.P.Wangikar, M.A.Sohoni, V.V.Samant, C.Y.Mone. *J. Mol. Biol.*, **334**, 157 (2003)
67. P.J.Artymiuk, A.R.Poirrette, H.M.Grindley, D.W.Rice, P.Willett. *J. Mol. Biol.*, **243**, 327 (1994)
68. R.V.Spriggs, P.J.Artymiuk, P.Willett. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **43**, 412 (2003)
69. A.C.Wallace, R.A.Laskowski, J.M.Thornton. *Protein Sci.*, **5**, 1001 (1996)
70. A.C.Wallace, N.Borkakoti, J.M.Thornton. *Protein Sci.*, **6**, 2308 (1997)
71. J.A.Barker, J.M.Thornton. *Bioinformatics*, **19**, 1644 (2003)
72. H.Yao, D.M.Kristensen, I.Mihalek, M.E.Sowa, C.Shaw, M.Kimmel, L.Kavraki, O.Lichtarge. *J. Mol. Biol.*, **326**, 255 (2003)
73. С.Д.Варфоломеев, К.Г.Гуревич. *Изв. АН. Сер. хим.*, **10**, 1629 (2001)
74. С.Д.Варфоломеев, И.В.Упоров, Е.В.Федоров. *Биохимия*, **67**, 1328 (2002)
75. А.М.Яглом, И.М.Яглом. *Вероятность и информация*. Наука, Москва, 1973
76. С.Е.Shannon, W.Weaver. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL, 1949
77. А.Дж.Вильсон. *Энтропийные методы моделирования сложных систем*. Наука, Москва, 1978
78. Г.Р.Лайнен. *Биохимия*, **67**, 107 (2002)
79. E.Di Cera, Q.D.Dang, Y.M.Ayala. *Cell Mol. Life Sci.*, **53**, 701 (1997)
80. J.B.Cooper. *Curr. Drug Targets*, **3**, 155 (2002)
81. C.M.Troy, M.L.Shelanski. *Cell Death Differ.*, **10**, 101 (2003)
82. M.Donepudi, M.G.Grutter. *Biophys. Chem.*, **101**, 145 (2002)
83. Y.Shi. *Mol. Cell*, **9**, 459 (2002)
84. K.Kolmodin, J.Aqvist. *FEBS Lett.*, **498**, 208 (2001)
85. D.Barford, A.K.Das, M.P.Egloff. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**, 133 (1998)
86. Z.Y.Zhang. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 1 (1998)
87. Z.Jia. *Biochem. Cell Biol.*, **75**, 17 (1997)
88. J.E.Villafranca, C.R.Kissinger, H.E.Parge. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **7**, 397 (1996)
89. R.J.Williams. *Mol. Biotechnol.*, **23**, 225 (2003)
90. B.S.Chevalier, B.L.Stoddard. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3757 (2001)
91. M.Galleni, J.Lamotte-Brasseur, X.Raquet, A.Dubus, D.Monnaie, J.R.Knox, J.M.Frere. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1171 (1995)
92. Z.Wang, W.Fast, A.M.Valentine, S.J.Benkovic. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 614 (1999)
93. G.Jung, H.Ueno, R.Hayashi. *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**, 1 (1999)
94. O.Hlavacek, L.Vachova. *Folia Microbiol. (Praha)*, **47**, 203 (2002)
95. M.Schmidt, A.N.Lupas, D.Finley. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 584 (1999)
96. V.Tougu, T.Kesvatera. *Biochim. Biophys. Acta*, **1298**, 12 (1996)
97. A.John, G.Tuszynski. *Pathol. Oncol. Res.*, **7**, 14 (2001)
98. С.Д.Варфоломеев, А.Е.Пожитков. *Вестн. МГУ. Сер. 2: Химия*, **3**, 147 (1999)
99. B.M.Dunn. *Chem. Rev.*, **102**, 4431 (2002)
100. J.S.Fruton. *Q. Rev. Biol.*, **77**, 127 (2002)
101. N.S.Andreeva, A.E.Gustcina, A.A.Fedorov, N.E.Scutzkever, T.N.Volnova. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **95**, 23, (1977)
102. Н.С.Андреева, А.С.Жданов, А.А.Федоров. *Мол. биология*, **18**, 3136 (1984)
103. A.R.Sielecki, A.A.Fedorov, A.Boothoo. *J. Mol. Biol.*, **214**, 148 (1990)
104. C.L.DiIanni, L.J.Davis, M.K.Holloway, W.K.Herber, P.L.Darke, N.E.Kohl, R.A.Dixon. *J. Biol. Chem.*, **265**, 17348 (1990)
105. M.Schulein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**, 239 (2000)
106. A.Vasella, G.J.Davies, M.Bohm. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 619 (2002)
107. N.C.Strynadka, M.N.James. *EXS*, **75**, 185 (1996)
108. B.Fischer. *EXS*, **75**, 143 (1996)
109. M.Karplus, C.B.Post. *EXS*, **75**, 111 (1996)
110. T.Fukamizo. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **1**, 105 (2000)
111. J.D.Robertus, A.F.Monzingo. *EXS*, **87**, 125 (1999)
112. I.S.Ridder, H.J.Rozeboom, K.H.Kalk, D.B.Janssen, B.W.Dijkstra. *J. Biol. Chem.*, **272**, 33015 (1997)
113. K.H.Verschuere, F.Seljee, H.J.Rozeboom, K.H.Kalk, B.W.Dijkstra. *Nature (London)*, **363**, 693 (1993)
114. Д.Г.Кнорре, С.Д.Мызина. *Биологическая химия. Высшая школа, Москва*, 1992
115. T.M.Glenon, Warshel. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 10234 (1998)
116. D.J.Quirk, R.T.Raines. *Biophys. J.*, **76**, 1571 (1991)
117. B.C.Oh, W.C.Choi, S.Park, Y.O.Kim, T.K.Oh. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 362 (2004)
118. J.W.Kozarich. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 78 (2003)
119. M.Holmquist. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **1**, 209 (2000)
120. F.Drablos, S.B.Peterson. In *Methods in Enzymology. Vol. 284*. (Eds B.Rubin, E.A.Dennins). Academic Press, San Diego, CA, 1997. P. 28
121. С.Д.Варфоломеев, К.Г.Гуревич. *Биокинетика*. Фаир-Пресс, Москва, 1992
122. K.Martinek, V.N.Dorovska, S.D.Varfolomeev, I.V.Berezin. *Biochim. Biophys. Acta*, **271**, 8086 (1972)
123. B.H.Rehm. *Biochem. J.*, **376**, 15 (2003)
124. *Lipases, Their Structure, Biochemistry and Applications*. (Eds P.Wooley, S.Petersen). Cambridge University Press, Cambridge, 1994
125. H.Soreq, A.Gnatt, Y.Loewenstein, L.F.Neville. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 353 (1992)
126. G.Dodson, A.Wlodamer. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 347 (1998)
127. E.B.Fauman, M.A.Saper. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 413 (1996)
128. M.Paetzel, R.E.Dalbey. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 28 (1997)
129. C.Goffin, J.M.Ghuysen. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1079 (1998)
130. G.J.Palm, J.Lubkowski, C.Derst, S.Schleper, K.H.Rohm, A.Wlodawer. *FEBS Lett.*, **390**, 211 (1996)

131. S.J.Yoo, Y.K.Shim, I.S.Seong, J.H.Seol, M.S.Kang, C.H.Chung. *FEBS Lett.*, **412**, 57 (1997)
132. H.J.Duggleby, S.P.Tolley, C.P.Hill, E.J.Dodson, G.Dodson, P.C.Moody. *Nature (London)*, **373**, 264 (1995)
133. *Неорганическая биохимия*. (Под ред. Г.Эйхгорна). Мир, Москва, 1978
134. E.Kimura. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 207 (2000)
135. C.Montecucco, G.Schiavo. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 324 (1993)
136. K.M.Holtz, E.R.Kantrowitz. *FEBS Lett.*, **462**, 7 (1999)
137. J.E.Murphy, B.Stec, L.Ma, E.R.Kantrowitz. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 161 (1997)
138. K.M.Holtz, E.R.Kantrowitz. *FEBS Lett.*, **462**, 7 (1999)
139. S.Benini, W.R.Rypniewski, K.S.Wilson, S.Miletti, S.Ciurli, S.Mangani. *Struct. Fold Des.*, **7**, 205 (1999)
140. I.G.Danilova, A.D.Ryabov, S.D.Varfolomeev. *J. Mol. Catal.*, **118**, 161 (1997)
141. V.S.Sergeeva, E.N.Efremenko, G.M.Kazankov, A.K.Gladilin, S.D.Varfolomeev. *Biotechnol. Tech.*, **13**, 479 (1999)
142. J.K.Crimsky, J.M.Scholtz, C.N.Pace, J.R.Wild. *Biochemistry*, **36**, 14366 (1992)
143. K.Lay, K.I.Dave, J.R.Wild. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16579 (1994)
144. G.A.Omburo, J.M.Kuo, L.S.Mullins, F.M.Rushel. *J. Biol. Chem.*, **267**, 13278 (1992)
145. V.S.Sergeeva, E.N.Efremenko, G.M.Kazankov, S.D.Varfolomeev. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **10**, 571 (2000)
146. С.М.Аваева. *Биохимия*, **65**, 441 (2000)
147. G.S.Baldwin, N.A.Gormley, S.E.Halford. *Met. Ions Biol. Syst.*, **37**, 345 (2000)
148. P.H.Burton, D.C.Hall, J.Josse. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4346 (1970)
149. С.М.Аваева, Т.И.Назарова. *Успехи биол. химии*, **26**, 42 (1985)
150. V.Yu.Oganessyan, S.A.Kurilova, N.N.Vorobyova, T.I.Nazarova, A.N.Popov, A.A.Lebedev, S.M.Avaeva, E.H.Harutyunyan. *FEBS Lett.*, **348**, 301 (1974)
151. Э.Г.Артюнян, В.Ю.Оганесян, Н.Н.Оганесян, С.С.Терзян, А.Н.Попов, С.В.Рубинский, Б.К.Вайнштейн, Т.И.Назарова, С.А.Курилова, Н.Н.Воробьева, С.М.Аваева. *Кристаллография*, **41**, 84 (1996)
152. E.H.Harutyunyan, V.Yu.Oganessyan, N.N.Oganessyan, S.M.Avaeva, T.I.Nazarova, N.N.Vorobyova, S.A.Kurilova, R.Huler. *Biochemistry*, **35**, 7754 (1996)
153. P.Heikinheimo, V.Tuominen, A.K.Ahonen, A.Teplyakov, B.S.Cooperman, A.A.Baykov, R.Lahti, A.Goldman. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 3121 (2001)
154. G.Lukatela, N.Krauss, K.Theis, T.Selmer, V.Gieselmann, K.von Figura, W.Saenger. *Biochemistry*, **37**, 3654 (1998)
155. T.A.Steitz. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17395 (1999)
156. D.Sam, G.G.Perova. *Biochemistry*, **38**, 6576 (1999)
157. G.S.Baldwin, R.B.Sessions, S.G.Erskine, S.E.Galford. *J. Mol. Biol.*, **288**, 87 (1999)
158. H.Viadu, A.K.Agarwal. *Nature Struct. Biol.*, **5**, 910 (1998)
159. L.Holm, C.Sander. *Science*, **273**, 595 (1996)
160. И.Г.Газарян. *Биотехнология. Т. 34. (Итоги науки и техники)*. Изд-во ВИНТИ, Москва, 1992. С. 4
161. B.C.Finzel, T.L.Poulos, J.Kraut. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13027 (1984)
162. N.Kunishima, K.Fukuyama, H.Matsubara, H.Hatanaka, Y.Shibano, T.Amachi. *J. Mol. Biol.*, **235**, 331 (1994)
163. J.J.Birtoft, L.J.Banaszak. *J. Biol. Chem.*, **258**, 472 (1983)
164. A.R.Clarke, H.M.Wiks, D.A.Barstow, T.Atkinson, N.N.Chia, J.J.Holbrook. *Biochemistry*, **27**, 1617 (1988)
165. H.Taguchi, T.Ohta, H. Matsuzawa. *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 802 (1997)
166. E.A.MacGregor, S.Janecek, B.Svensson. *Biochim. Biophys. Acta*, **1546**, 1 (2001)
167. М.Л.Рабинович, М.С.Мельник, А.В.Болобова. *Биохимия*, **67**, 1026 (2002)
168. P.Tomme, R.A.Warren, N.R.Gilkes. *Adv. Microb. Physiol.*, **37**, 1 (1995)
169. P.Begu. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**, 219 (1990)
170. P.Begu, P.M.Alzari. *Biochem. Soc. Trans.*, **26**, 178 (1998)
171. N.R.Gilkes, B.Henrissat, D.G.Kilburn, R.C.Miller, R.A.Warren. *Microbiol. Rev.*, **55**, 303 (1991)
172. M.Hassouni, B.Henrissat, M.Chippaux, F.Barras. *J. Bacteriol.*, **174**, 765 (1992)
173. G.A.Tavares, P.Begu, P.M.Alzari. *J. Mol. Biol.*, **273**, 701 (1997)
174. M.E.Himmel, W.S.Adney, J.W.Fox, D.J.Mitchell, J.O.Baker. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **39–40**, 213 (1993)
175. В.И.Крупяно. *Биохимия*, **53**, 2059 (1988)
176. M.V.Nogues, M.Vilanova, C.M.Cuchillo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1253**, 16 (1995)
177. D.M.Blow. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 405 (1997)
178. S.Bencharit, C.L.Morton, Y.Xue, P.M.Potter, M.R.Redinbo. *Nature Struct. Biol.*, **10**, 349 (2003)
179. Y.S.Ho, L.Swenson, U.Derewenda, L.Serre, Y.Wei, Z.Dauter, M.Hattori, T.Adachi, J.Aoki, H.Arai, K.Inoue, Z.S.Derewenda. *Nature (London)*, **385**, 89 (1997)
180. C.G.Swain, J.I.Brown. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2534 (1952)
181. C.G.Swain, J.I.Brown. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2538 (1952)
182. K.B.Schowen, H.H.Limbach, G.S.Denisov, R.L.Schowen. *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 43 (2000)
183. M.Eigen. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **3**, 1 (1964)
184. J.H.Wang. *Science*, **161**, 328 (1968)
185. Н.Г.Есипова, В.Г.Туманян. *Мол. биология*, **6**, 840 (1972)
186. M.Sasai. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 8438 (1995)
187. I.Friedberg, T.Kaplan, H.Margalit. In *Proc. Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology. Vol. 8*. San Diego, 2000. P. 162
188. Z.Q.Cheng, B.A.McFadden. *Protein Eng.*, **11**, 457 (1998)
189. A.C.Martin, J.M.Thornton. *J. Mol. Biol.*, **263**, 800 (1996)
190. A.V.Efimov. *FEBS Lett.*, **355**, 213 (1999)
191. S.D.Lahiri, G.Zhang, J.Dai, D.Dunaway-Mariano, K.N.Allen. *Biochemistry*, **43**, 2812 (2004)
192. M.Saito, K.Hori, T.Kurotsu, M.Kanda, Y.Saito. *J. Biochem. (Tokyo)*, **117**, 276 (1995)
193. K.E.Jaeger, B.W.Dijkstra, M.T.Reetz. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 315 (1999)
194. M.Eigen, L.De Mayer. *Z. Electrochem.*, **59**, 986 (1955)
195. M.Eigen. *Discuss. Faraday Soc.*, **39**, 7 (1965)

CATALYTIC SITES OF HYDROLASES: STRUCTURE AND CATALYTIC CYCLE

S.D.Varfolomeev, I.A.Gariev, I.V.Uporov

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

Leninskie Gory, 119992 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939–5417

The review is devoted to the analysis of published data on the structure of active sites and mechanisms of action of hydrolases. The bioinformatics methods employed for automated analysis of proteins are described, including contemporary protein databases and methods for classification and search for enzyme active sites. It is shown that the catalytic sites of the known hydrolases belong to one of the four principal types as regards the mechanism of water activation. By examples of glycosyl hydrolases and serine hydrolases it is demonstrated how different proteins employ common catalytic centres and mechanisms of action. The modes employed by catalytic centers for water activation are discussed and representative schemes of reactions are given for each type of catalytic sites. The role of aspartic acid and histidine in the substrate activation and the role of glycine, proline and cysteine in structural organization of catalytic sites are discussed. The rate and nature of limiting steps of catalytic cycles are discussed.

Bibliography — 195 references.

Received 23rd July 2004