



УДК 577.156.3.02 : 541.63

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ  
НЕВАЛЕНТНОГО КОМПЛЕКСА  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА  
С N-ФОРМИЛ-L-ТРИПТОФАНОМ***Липкин Г. М., Максумов И. С., Попов Е. М.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

В рамках механической модели молекул проведен анализ конформационных состояний N-формил-L-триптофана в сорбционном комплексе с  $\alpha$ -химотрипсином при условии жесткой фиксации индольного кольца в гидрофобной полости. Показано, что из набора оптимальных форм только конформация с самой низкой энергией является продуктивной. Положение ее основной цепи в активном центре существенно отличается от положения основной цепи N-формил-L-триптофана в кристалле. Из расчета следует наличие водородной связи карбоксила N-формил-L-триптофана с аминогруппой остатка Glu<sup>193</sup> и отсутствие водородной связи между формиламиногруппой и карбониллом -Ser<sup>214</sup>. Показано, что вращение атома O<sup>γ</sup> остатка Ser<sup>195</sup> в свободном ферменте происходит без каких-либо внутримолекулярных затруднений.

Настоящее сообщение является первым из серии наших публикаций, посвященных применению теоретического подхода к изучению конформационных аспектов различных стадий взаимодействия  $\alpha$ -химотрипсина с субстратами и ингибиторами.

К природным субстратам  $\alpha$ -химотрипсина, как известно [1, 2], относятся прежде всего пептиды, содержащие ароматические аминокислотные остатки. Рентгеноструктурный анализ сорбционного комплекса  $\alpha$ -химотрипсина с N-формил-L-триптофаном [3], а также ацилированного [4] и тозилированного [5] ферментов показал наличие в активном центре гидрофобной полости, ответственной за связывание ароматической боковой цепи субстрата. Размеры полости разрешают сорбцию субстрата только при одной ориентации плоскости ароматического кольца остатка, образующего своей карбонильной группой расщепляемую связь. Это обстоятельство позволяет выделить все вопросы, относящиеся к взаимодействию фермента с боковой цепью центрального остатка субстрата в отдельную задачу. Поскольку положение кольца в гидрофобной полости на протяжении всего каталитического акта остается неизменным, то проблему первичной специфичности, по нашему мнению, целесообразно рассматривать на стадии образования ацилфермента, а не комплекса Михаэлиса, где для координации субстрата относительно фермента потребовалось бы введение дополнительных шести переменных (см. [6]). При рассмотрении же комплекса Михаэлиса положение ароматического кольца в гидрофобном кармане можно фиксировать в соответствии с координатами, приведенными в работах [3, 6].

Для правильного расположения расщепляемой группы в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина природные субстраты помимо первичной специ-

фичности должны удовлетворять также требованиям вторичной специфичности, которая обуславливает химическую и стерическую комплементарность между ферментом и основной цепью субстрата [7—9].

В качестве первого шага в исследовании взаимодействий фермента с основной цепью субстрата в данном сообщении приведены результаты конформационного анализа невалентного комплекса N-формил-L-триптофана с  $\alpha$ -химотрипсином. Выбор объекта представляется оправданным по следующим причинам. Молекула N-формил-L-триптофана является простейшим аналогом субстратов  $\alpha$ -химотрипсина. Поэтому можно надеяться, что полученные результаты окажутся полезными при дальнейшем исследовании комплексов, приближающихся по своей сложности к природным. Жесткая фиксация ароматического кольца боковой цепи N-формил-L-триптофана в гидрофобном кармане позволяет все внимание сосредоточить на взаимодействии основной цепи молекулы с  $\alpha$ -химотрипсином. При исследовании этого комплекса может быть проведено сопоставление результатов расчета с экспериментальными данными, полученными Стейцем, Хендерсоном и Блоу [3]. Такое сопоставление полезно не только для апробации теоретического подхода, но и для уточнения и лучшего понимания данных рентгеноструктурного анализа. В работе [3] координаты атомов индольной части N-формил-L-триптофана определены с большой точностью. Что же касается карбоксильной и формиламиногрупп квазисубстрата то, по словам авторов, действительное положение этих групп в комплексе менее очевидно. Одна из трудностей, возникающих при интерпретации карт электронной плотности, связана с близко расположенной в кристалле соседней молекулой фермента, гидроксильная группа остатка  $\text{Trp}^{146}$  которого имеет возможность взаимодействовать с амидной группой N-формил-L-триптофана и тем самым влиять на его конформацию. Другая трудность возникает вследствие того, что сорбция субстрата сопровождается изменением как числа, так и положения молекул воды в активном центре, что вызывает определенные трудности при сопоставлении карт электронной плотности для нативного фермента и его комплекса Михаэлиса. Помимо этого, рентгеноструктурное исследование проводилось на кристаллических образцах при pH 5,7. При этих условиях взаимодействие N-формил-L-триптофана с активным центром может быть несколько иным, чем при pH 7,5 соответствующим максимальной активности фермента.

Основное внимание в настоящей работе уделено исследованию конформационных возможностей N-формил-L-триптофана в комплексе Михаэлиса. В случае, если взаимодействие молекулы с ферментом резко ограничивает число ее возможных конформационных состояний, результаты анализа простейшего аналога субстратов  $\alpha$ -химотрипсина могут значительно облегчить более общее рассмотрение проблемы вторичной специфичности.

Ацилирование  $\alpha$ -химотрипсина сопровождается рядом конформационных перестроек активного центра, среди которых наиболее существенным является вращение боковой цепи остатка  $\text{Ser}^{195}$  вокруг связи  $\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta$  [4, 5, 10]. Поэтому нами рассматривается вопрос о том, в какой степени образование комплекса Михаэлиса с N-формил-L-триптофаном влияет на изменение положения  $\text{Ser}^{195}$ .

*Расчетная модель и потенциальные функции.* Конформационное состояние N-формил-L-триптофана определяется 4 углами вращения вокруг связей  $\text{N} - \text{C}^\alpha$  ( $\varphi$ ),  $\text{C}^\alpha - \text{C}'$  ( $\psi$ ),  $\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta$  ( $\chi'$ ),  $\text{C}^\beta - \text{C}^\gamma$  ( $\chi^2$ ); переменными параметрами боковой цепи  $-\text{Ser}^{195}$  являются углы вращения вокруг связей  $\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta$  ( $\chi_1^1$ ) и  $\text{C}^\beta - \text{O}^\gamma$  ( $\chi_1^2$ ) (рис. 1). Отсчет углов производился согласно стандартной номенклатуре [11]. Индольный цикл N-формил-L-триптофана жестко фиксировался в гидрофобном кармане в соответствии с координатами, приведенными в работе [6]. Для геометрии остальной части

молекулы использовали усредненные параметры пептидов [12]. Угол  $C^\beta O^+H$  в  $-Ser^{-195}$  принят равным  $110^\circ$  [13].

Образование комплекса Михаэлиса не приводит к заметному изменению геометрии активного центра [3]. Поэтому мы исходили из модели жесткого фермента, допуская свободу вращения только для боковой цепи  $-Ser^{-195}$ . В расчет были включены лишь те остатки фермента, которые могут иметь контакты с *N*-формил-*L*-триптофаном при его продуктивном связывании. Согласно данным [3, табл. 3 и рис. 1] к ним относятся остатки 57, 99, 102, 189—195, 213—220 и 226. Учет взаимодействия субстрата в комплексе Михаэлиса со всеми остатками фермента не приводит к перераспределению энергии сорбции конформеров [6].

Координаты атомов активного центра нативного  $\alpha$ -химотрипсина взяты из работы Бирктофта и Блоу [14]. На основе этих координат были

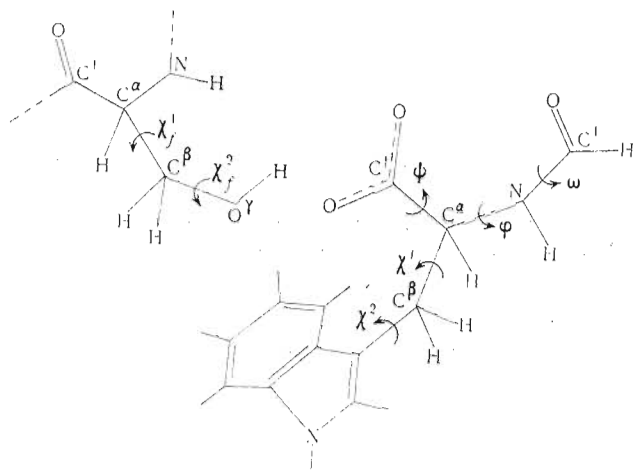


Рис. 1. Расчетная модель *N*-формил-*L*-триптофана и остатка  $Ser^{195}$   $\alpha$ -химотрипсина

найжены положения атомов водорода в амидных группах и ароматических кольцах фермента. Здесь важно подчеркнуть, что  $\alpha$ -химотрипсин практически не меняет своей структуры при изменении pH от 5 до 10 [14]. Поэтому использование координат, найденных Бирктофтом и Блоу для кристаллического состояния, при исследовании комплекса с нативным ферментом вполне оправдано. Остаток  $His^{57}$  рассматривается в непротонированной форме. Положение субстрата задавалось в системе координат фермента [14]. Поиск оптимальных конформаций производился путем вариации двухгранных углов  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\chi^1$ ,  $\chi^2$  *N*-формил-*L*-триптофана и  $\chi^1$ ,  $\chi^2$   $Ser^{195}$  с последующей минимизацией энергии, основанной на выборе направления спуска по вторым производным\*.

Конформационная энергия субстрата и фермент-субстратных взаимодействий определялась при учете невалентных и электростатических взаимодействий, а также торсионного вклада и водородных связей. Энергия невалентных взаимодействий оценивалась по потенциалу Ленарда — Джонса с параметризацией Скотта и Шераги [15]. Все метильные и метиленовые группы аппроксимировались обобщенным атомом с параметрами, полученными в работе [16]. Энергия электростатических взаимодействий рассчитывалась в монополярном приближении с зарядами на атомах, предложенных Поландом и Шерагой [17]; при значении эффективной диэлектрической проницаемости  $\epsilon = 10$  [18].

\* В процессе минимизации допускалась возможность изменения угла  $\phi$ . Однако ни в одной из рассмотренных конформаций квазисубстрата деформация пептидной группы не превышала  $2-3^\circ$ .

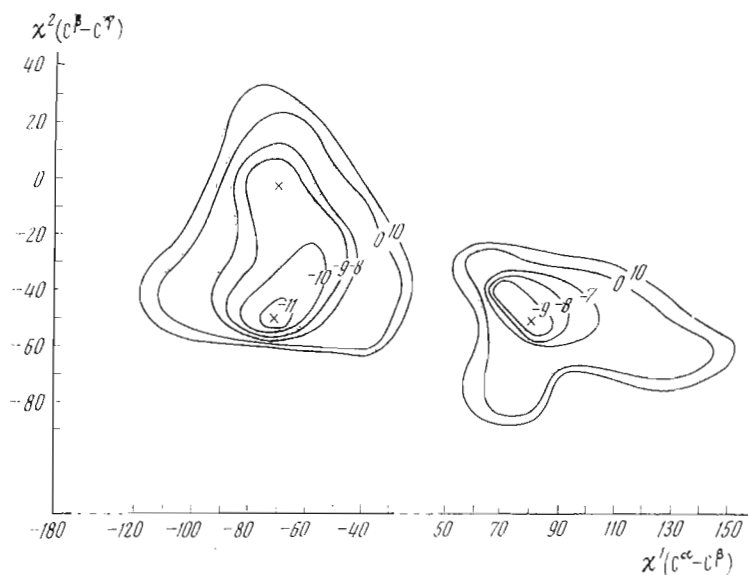


Рис. 2. Области низких энергий на сечении  $\chi^1 (C^\alpha - C^\beta) - \chi^2 (C^\beta - C^\gamma)$  N-формил-L-триптофана в комплексе с  $\alpha$ -химотрипсином

Торсионные потенциалы для вращения вокруг связей пептидного остова и боковой цепи -Ser<sup>195</sup> взяты из [19]. Ввиду неоднородности среды в районе активного центра для оценки водородной связи принят потенциал средней силы, в котором энергия связи  $C=O \cdots H-N$  являлась промежуточной ( $\sim 2-2,5$  ккал/моль) по сравнению со значением в полярной ( $0-1,5$  ккал/моль [20]) и неполярной ( $\sim 4$  ккал/моль [20]) средах. Водородную связь описывали потенциалом типа Морзе [21]:

$$U = D [1 - \exp(-3(r - r_0))]^2 - D.$$

Значение параметра  $D$  выбрано таким образом, что  $D$  в сумме с энергией электростатических взаимодействий фрагментов  $C=O \cdots H-N$  или  $C=O \cdots H-O$  при оптимальном расстоянии  $O \cdots H$  ( $r_0, 1,8 \text{ \AA}$ ) и  $\epsilon = 10$  воспроизводит экспериментальную энергию диссоциации модельных соединений — 2 ккал/моль [20]. При этом условии  $D$  равен 1,5 ккал/моль.

*Обсуждение результатов расчета.* Представление о потенциальной поверхности N-формил-L-триптофана в поле белка можно получить из конформационных карт  $\phi - \Psi$  и  $\chi^1 - \chi^2$  при учете только невалентных взаимодействий. Положение субстрата в активном центре наиболее чувствительно к изменению углов  $\chi^1$  и  $\chi^2$ . Поэтому нахождение возможных локальных конформаций было начато с построения карт  $\chi^1 - \chi^2$ . Для углов основной цепи взяты следующие пары исходных значений:  $\phi - 62, \Psi - 0^\circ$  (рентгеноструктурные данные Стейца и соавт. [3]) и  $\phi - 150, \Psi - 24^\circ$ . В последнем случае угол  $\phi$  отвечает другому крайнему допустимому значению на карте метиламида N-ацетил-L-фенилаланина [22]. Полученные карты  $\chi^1 - \chi^2$  (рис. 2) показали, что независимо от исходной конформации основной цепи допустимые значения углов  $\chi^1$  и  $\chi^2$  находятся в двух резко очерченных энергетических областях  $\chi^1 - 70, \chi^2 - 50$  и  $\chi^1 - 80, \chi^2 - 50^\circ$ . Особенно ограничено движение вокруг связи  $C^\beta - C^\gamma$  ( $\chi^2$ ), что представляет собой разительный контраст по сравнению с практически неограниченной свободой вращения вокруг этой связи свободного метиламида N-ацетил-L-триптофана [22]. Разбиение сечения  $\chi^1 - \chi^2$  с интервалом в  $10^\circ$  выявило наличие в одной из низкоэнергетических областей еще одного минимума  $\chi^1 - 70, \chi^2 - 0^\circ$ .

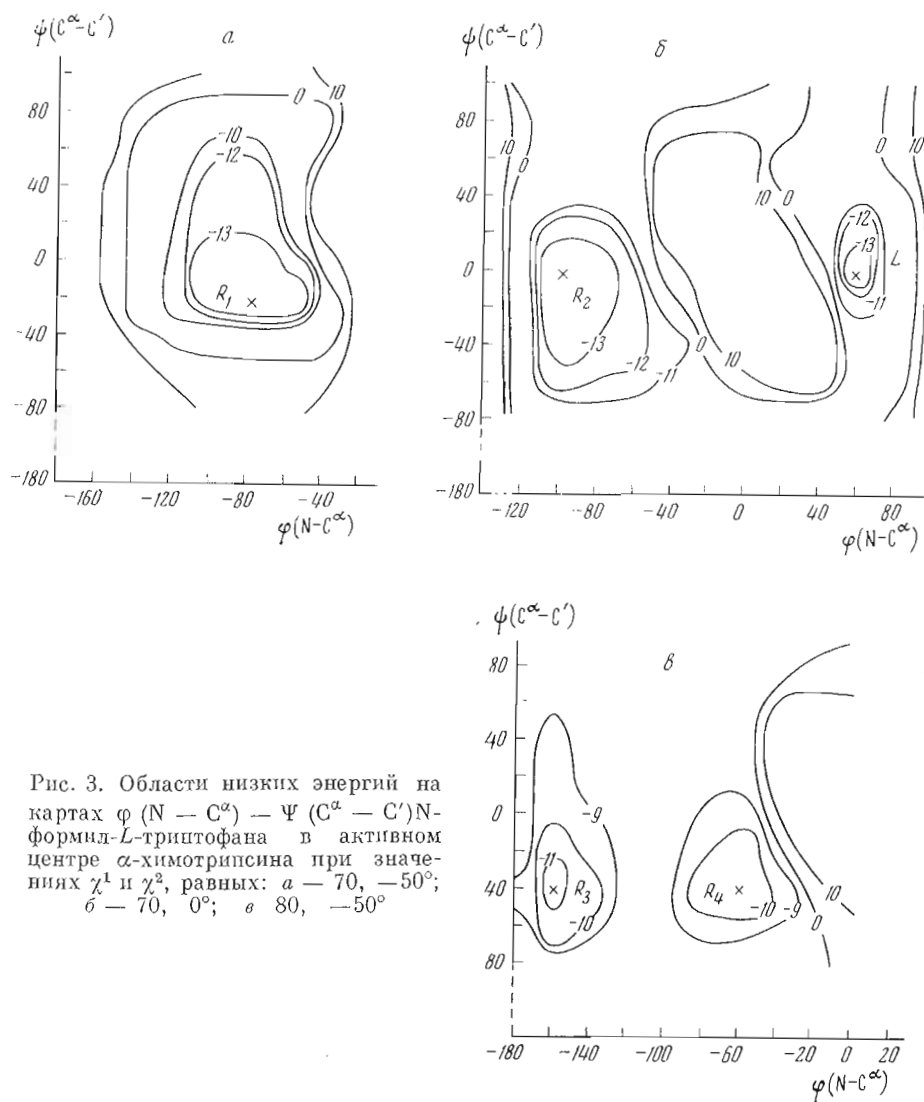


Рис. 3. Области низких энергий на картах  $\varphi(N-C^\alpha) - \Psi(C^\alpha-C')$  N-формил-L-триптофана в активном центре  $\alpha$ -химоотрипсина при значениях  $\chi^1$  и  $\chi^2$ , равных: а - 70,  $-50^\circ$ ; б - 70,  $0^\circ$ ; в - 80,  $-50^\circ$

Для трех найденных конформаций боковой цепи N-формил-L-триптофана ( $\chi^1, \chi^2$  80,  $-50^\circ$ ;  $-70, -50^\circ$ ;  $-70, 0^\circ$ ) при положении -Ser<sup>195</sup>, соответствующем положению в нативном ферменте, построены сечения  $\varphi - \Psi$  с интервалом в  $20^\circ$  (рис. 3, а-в). Учитывая симметрию карбоксильной группы, угол  $\Psi(C^\alpha - C')$  изменяли в пределах от 0 до  $180^\circ$ . На рис. 3, а ( $\chi^1 - 70, \chi^2 - 50^\circ$ ) имеется одна область низкой энергии ( $\varphi \sim -80, \Psi \sim -20^\circ$ ). Обозначим конформацию молекулы с таким набором углов  $\varphi, \Psi, \chi^1, \chi^2$  символом  $R_1$ . При ином положении боковой цепи ( $\chi^1 - 70, \chi^2 0^\circ$ ) карта  $\varphi - \Psi$  претерпевает существенные изменения (рис. 3, б). Наряду с минимумом при  $\varphi - 100$  и  $\Psi 0^\circ$  ( $R_2$ ) появляется новая область низкой энергии  $L$  ( $\varphi 60, \Psi 0^\circ$ ). В случае  $\chi^1 80$  и  $\chi^2 - 50^\circ$  на карте  $\varphi - \Psi$  (рис. 3, в) имеются два близко расположенных минимума  $\varphi - 160, \Psi - 40^\circ$  ( $R_3$ ) и  $\varphi - 60, \Psi - 40^\circ$  ( $R_4$ ). В целом можно отметить, что основная цепь молекулы в активном центре  $\alpha$ -химоотрипсина обладает значительной свободой движения, которая в отношении угла  $\Psi(C^\alpha - C')$  лишь немногим уступает изолированным меггиламидам N-ацетил- $\alpha$ -аминокислот с ароматической боковой цепью [22].

Найденные на основе сечений  $\chi^1 - \chi^2$  и  $\varphi - \Psi$  формы  $R_1 - R_4$  и  $L$  явились исходными приближениями для поиска оптимальных конформа-

Геометрические и энергетические параметры оптимальных форм N-формил-L-триптофана в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина

I — данные получены без учета электростатических взаимодействий, II — с учетом всех составляющих потенциальной функции

Параметр	Единица измерения	$R_1$		$R_2$		$R_3$		$R_4$		$L$	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
$\varphi$	градус	-145	-161	-106	-108	-163	-165	-60	-100	58	65
$\Psi$	»	-28	-94	-35	-33	-34	-36	-40	-2	18	28
$\chi^1$	»	-76	-89	-65	-68	75	79	-76	86	-63	-70
$\chi^2$	»	-39	-32	-10	-5	-45	-44	-46	-38	-20	-3
$U_f^*$	ккал/моль	-15,8	-1,7	-15,5	-2,0	-13,6	-1,3	-10,5	4,6	-16,6	2,4
$U_s$	»	-13,1	-5,3	-12,6	-4,5	-13,0	-4,4	-9,4	0,5	-14,4	-3,6

\*  $U$  — полная энергии по абсолютной шкале,  $U_f$  — энергия фермент-субстратного взаимодействия.

ций N-формил-L-триптофана в нативном  $\alpha$ -химотрипсине путем минимизации энергии с учетом всех составляющих потенциальной функции при вариации параметров  $\varphi$ ,  $\Psi$ ,  $\chi^1$ ,  $\chi^2$ . Полученные результаты приведены в табл. 1.

Конформации  $R_1$  и  $R_2$  имеют близкие значения геометрических и энергетических параметров. По существу они отвечают двум минимумам одной потенциальной ямы. Конформация  $R_3$  энергетически столь же благоприятна, как  $R_1$  и  $R_2$ , однако она, так же как и  $R_4$ , представляет значительно меньший интерес, являясь реакционно непродуктивной. В формах  $R_3$  и  $R_4$  к  $\text{-Ser}^{195}$  обращена не карбоксильная, а N-формиламиногруппа субстрата. При таких конформациях основной цепи центрального остатка невозможна также  $\beta$ -структурная ассоциация с остатками 214—216 белка [23]. Конформация  $L$  по энthalпии не менее выгодна, чем  $R_1$  и  $R_2$ . Однако при учете электростатических взаимодействий она становится явно невыгодной (проигрыш в энергии по сравнению с  $R_1$  составляет 4,2 ккал/моль). Вывод о ее невыгодности для субстратов  $\alpha$ -химотрипсина сделан также в работе [6].

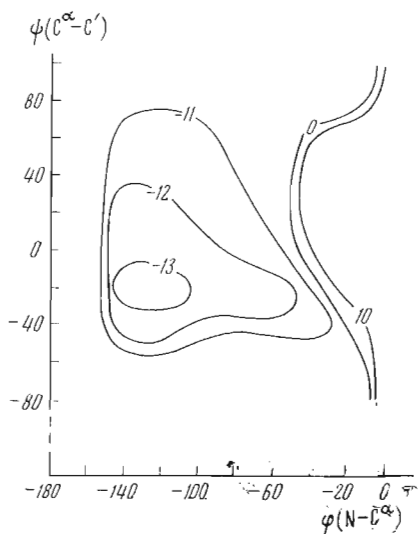


Рис. 4. Область низкой энергии на карте  $\varphi$  (N —  $C^\alpha$ ) —  $\Psi$  ( $C^\alpha$  —  $C'$ ) N-формил-L-триптофана при углах  $\chi^1$  — 76,3°,  $\chi^2$  — 38,6°

Сделаем это на примере формы  $R_1$ . Соответствующие ей углы  $\varphi$  — 145°,  $\Psi$  — 28° (табл. 1) попадают в область высокой энергии на карте  $\varphi$  —  $\Psi$  (рис. 3, а), построенной при углах  $\chi^1$  — 70° и  $\chi^2$  — 50°, несколько отличных от значений в оптимизированной форме  $R_1$ . На рис. 4 приведена конформационная карта, построенная при  $\chi^1$  и  $\chi^2$ , точно соответствующих форме  $R_1$  (табл. 1). В этом случае параметры  $\varphi$  и  $\Psi$  для оптимальной конформации находятся уже в области самой низкой энергии.

Таблица 2

Координаты атомов (Å) основной цепи N-формил-L-триптофана в конформации  $R_2$  в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина

Фрагмент	X	Y	Z
Карбоксильная группа			
C <sup>1</sup>	15,0	1,1	3,8
O <sup>1</sup>	14,0	0,5	3,5
O <sup>2</sup>	15,0	2,2	4,4
Формиламиногруппа			
N	17,3	1,6	3,1
H	17,6	2,0	4,0
C <sup>1</sup>	17,8	2,0	2,0
O	17,4	1,5	0,9
H	18,8	3,1	1,9

Примечание. Данные соответствуют системе координат, принятой в работе Биркгофта и Блоу [14].

Таблица 3

Геометрические и энергетические параметры оптимальных форм N-формил-L-триптофана в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина при подвижной боковой цепи -Ser<sup>195</sup>

Параметр	Единица измерения	$R_1$	$R_2$
$\Phi$	градус	-154	-111
$\Psi$	»	-15	-27
$\chi^1$	»	-88	-69
$\chi^2$	»	-33	-6,2
$\chi_f^1$	»	7	15
$\chi_f^2$	»	138	135
$U^*$	ккал/моль	-7,6	-7,1
$U_{fs}$	»	-9,2	-8,7

\*  $U$  — полная энергия по абсолютной шкале,  $U_{fs}$  — энергия фермент-субстратного взаимодействия.

Аналогичная ситуация наблюдается и в остальных случаях. Таким образом, хотя взаимообусловленность конформационных состояний основной и боковой цепей N-формил-L-триптофана в активном центре фермента и имеет место, она проявляется в пределах одного и того же локального минимума.

Для выяснения соответствия между приведенными расчетными данными и конформацией N-формил-L-триптофана, полученной Стейцем и соавт. [3], нами проведена оптимизация энергии из начального приближения, отвечающего конформации в кристалле, т. е. при  $\Phi$  -62,  $\Psi$  0,  $\chi^1$  -53,  $\chi^2$  -11°. Оказалось, что геометрические и энергетические параметры минимизированной по энергии конформации точно соответствуют параметрам формы  $R_2$  (табл. 1). При минимизации наибольшему изменению подверглись углы основной цепи  $\Phi$  и  $\Psi$ . В начальной точке энергия была на 1,5 ккал/моль выше оптимального значения. Это связано с невыгодными взаимодействиями атомов карбоксильной группы квазисубстрата и остатка Ser<sup>195</sup> в кристаллической структуре. То обстоятельство, что положение основной цепи N-формил-L-триптофана в кристалле несколько отли-

чается от конформации в комплексе с нативным ферментом, не вызывает удивления, так как кристаллическая упаковка  $\alpha$ -химотрипсина имеет бимолекулярную ячейку, в которой молекулы контактируют областями, близкими к активным центрам [5, 14]. Кроме того, в силу указанных выше причин возможно не совсем точное экспериментальное определение координат атомов этой части квазисубстрата. Рассчитанные нами координаты атомов основной цепи N-формил-L-триптофана в конформации  $R_2$  приведены в табл. 2.

О различиях структуры комплекса Михаэлиса в кристалле и в растворе свидетельствует также кинетический анализ субстратов с ограниченной конформационной свободой, проведенный В. К. Антоновым [24, 25]. Предложенные автором значения углов метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина ( $\varphi -140^\circ$ ,  $\Psi -40^\circ$ ,  $\chi^1 -60^\circ$ ,  $\chi^2 -30^\circ$ ) также отличаются от данных Стейца и соавт. [3] и в то же время удовлетворительно совпадают с параметрами формы  $R_1$ , рассчитанными без учета электростатических взаимодействий (табл. 1). Такое сопоставление более корректно, поскольку две молекулы близки по природе невалентных взаимодействий, но существенно отличаются зарядами на атомах. Угол  $\varphi$  у N-ацетил-L-триптофана в комплексе с  $\alpha$ -химотрипсином был определен также методом ЯМР [26]. Полученное здесь значение  $\varphi (-30 \pm 20^\circ)$  более существенно отличается от найденного нами.

Интересно сопоставить наиболее предпочтительные в комплексе Михаэлиса конформации  $R_1$  и  $R_2$  N-формил-L-триптофана с оптимальными формами его близкого аналога — метиламида N-ацетил-L-фенилаланина, изученного ранее как теоретически [22], так и экспериментально с помощью метода ЯМР [27]. Согласно совпадающим между собой результатам обеих работ, наиболее предпочтительная конформация молекулы в полярной среде имеет следующие значения углов:  $\varphi \sim -130^\circ$ ,  $\Psi \sim 150^\circ$ ,  $\chi^1 \sim -60^\circ$ ,  $\chi^2 \sim -90^\circ$ . Сравнение с данными табл. 1 ( $R_2$ ) показывает, что фермент связывает квазисубстрат в конформации, весьма близкой (в отношении углов

$\varphi$ ,  $\Psi$ ,  $\chi^1$ ) к глобальной форме свободной молекулы. Отклонение угла  $\chi^2$  от наиболее выгодного значения приводит к повышению энергии приблизительно на 2 ккал/моль [22]. Эта величина значительно меньше энтальпии образования комплекса Михаэлиса [28].

На основании приведенных рассуждений можно предположить, что при продуктивном связывании соединений, более близких по строению к природным субстратам, в комплексе будут реализовываться углы  $\chi^1$ ,  $\chi^2$  и  $\varphi$ , близкие к найденным нами для N-формил-L-триптофана. Что касается угла  $\Psi$ , то здесь число допустимых значений будет вдвое больше, поскольку удлинение цепи с C-конца снимает вырождение по  $\Psi$ . Однако

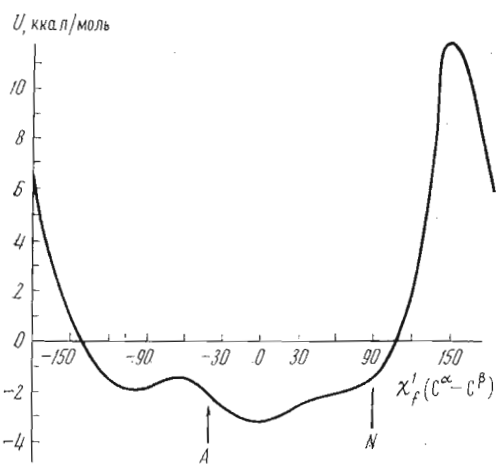


Рис. 5. Зависимость конформационной энергии боковой цепи -Ser<sup>195</sup>- от угла вращения вокруг связи C<sup>α</sup> — C<sup>β</sup> ( $\chi^1$ ) в нативном  $\alpha$ -химотрипсине

в этом случае возникают дополнительные ограничения, вызванные требованием правильной ориентации расщепляемой группы. Более подробно на этих вопросах мы остановимся в следующем сообщении.

В каталитическом акте  $\alpha$ -химотрипсина наибольшее конформационное изменение претерпевает боковая цепь остатка Ser<sup>195</sup>. При образовании



ацилфермента атом  $O^\gamma$  серинового гидроксила смещается по отношению к нативному состоянию на 2,5 Å [4]. На основе модельного анализа взаимодействий  $\alpha$ -химотрипсина с ингибитором трипсина Фершт и соавт. [10] пришли к заключению, что изменение угла вращения вокруг связи  $C^\alpha - C^\beta - Ser^{195}$  ( $\chi_f^1$ ) примерно на  $120^\circ$  происходит вследствие невыгодных контактов между отходящей группой субстрата и боковой цепью  $-Ser^{195}$ . Учитывая подвижность  $-Ser^{195}$ , мы провели минимизацию полной конфор-

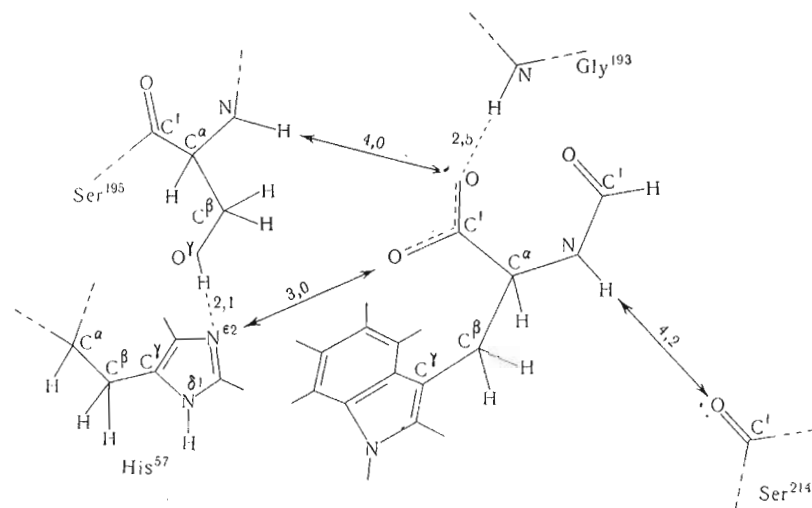


Рис. 6. Контакты N-формил-L-триптофана в конформации  $R_2$  с активным центром  $\alpha$ -химотрипсина ( $Ser^{195}$ - в нативном состоянии  $\chi_f^1$   $90^\circ$ ; расстояния даны в Å)

мационной энергии N-формил-L-триптофана при вариации не только углов  $\phi$ ,  $\Psi$ ,  $\chi^1$ ,  $\chi^2$ , но и параметров боковой цепи остатка  $Ser^{195} - \chi_f^1$  и  $\chi_f^2$ . Результаты этой процедуры для форм  $R_1$  и  $R_2$ , представляющих, как было показано, наибольший интерес, даны в табл. 3. Из сопоставления данных табл. 1 и 3 следует, что углы вращения N-формил-L-триптофана изменились незначительно. Что касается боковой цепи  $-Ser^{195}$ , то ее нативное положение ( $\chi_f^1$   $90^\circ$ ) не сохраняется. Отклонение достигает  $\sim 80^\circ$ . Анализ всех взаимодействий между атомами фермента и квазисубстрата показал, что это изменение не связано с наличием неблагоприятных контактов N-формил-L-триптофана с боковой цепью остатка  $Ser^{195}$ . Поворот может осуществляться без каких-либо затруднений и в выбранной нами модели свободного белка. Это видно из рис. 5, где показана зависимость конформационной энергии боковой цепи  $-Ser^{195}$  от угла  $\chi_f^1$  в свободном белке при учете всех составляющих потенциальной функции (энергия в каждой точке проминимизирована по углу  $\chi_f^2$ ). В точках  $N$  и  $A$ , соответствующих положению атома  $O^\gamma Ser^{195}$  в нативном и ацилированном ферментах, энергия одинакова. Глобальный минимум находится вблизи  $\chi_f^1 = 0^\circ$ , что и объясняет результаты минимизации. При  $\chi_f^1 = 0^\circ$  группа  $NH$  остатка  $Ser^{195}$  образует водородную связь с атомом  $O^\gamma$  собственной боковой цепи. Такая связь может возникать и в свободном метиламиде N-ацетил-L-серина [29]. Таким образом из кривой, приведенной на рис. 5, следует, что для перехода  $N \rightarrow A$ , по-видимому, достаточен небольшой «толчок», возникающий при связывании ферментом истинного субстрата\*.

При обосуждении ферментативного катализа  $\alpha$ -химотрипсином существенная роль в правильной ориентации субстрата отводится водород-

\* Более подробно этот вопрос будет рассмотрен нами в отдельной работе.

ным связям между карбонилем расщепляемой группы и основными цепями -Gly<sup>193</sup> и -Ser<sup>195</sup>, а также между аминогруппой N-конца ароматического остатка и карбонилем -Ser<sup>214</sup> [3, 4, 25]. На важное значение последней связи указывает, например, резкое снижение скорости гидролиза при замене ацетиламиногруппы субстрата на ацетоксигруппу [7]. А

На рис. 6 показана ориентация карбоксильной и формиламиногрупп N-формил-L-триптофана в конформации  $R_2$  при нативном положении -Ser<sup>195</sup>. Как видим, из указанных выше взаимодействий в комплексе Михаэлиса реализуется только одна водородная связь между карбоксильной группой и основной цепью остатка Gly<sup>193</sup>. Картина меняется при положении -Ser<sup>195</sup>, отвечающем минимуму  $\chi_1^1-O^0$ , т. е. состоянию вполне реальному в растворе (рис. 7). В этом случае атом O $\gamma$  остатка Ser<sup>195</sup> повернут таким образом, что образует водородную связь с NH-группой этого же остатка, что делает невозможным образование водородной связи

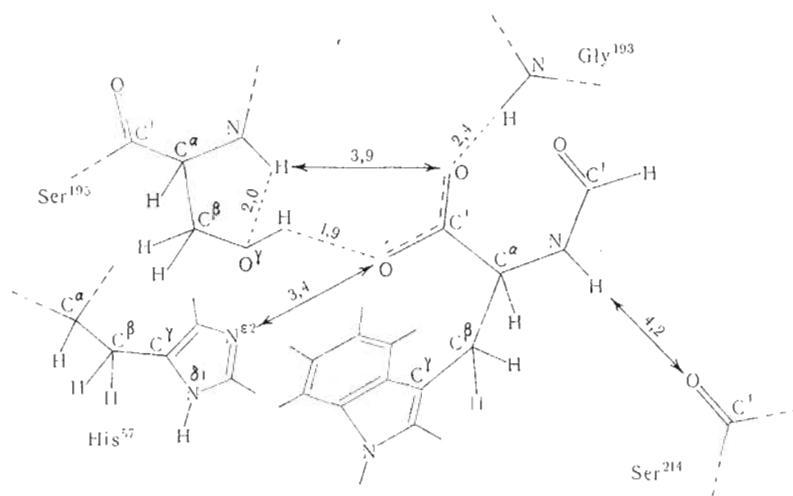


Рис. 7. Контакты N-формил-L-триптофана в конформации  $R_2$  с активным центром  $\alpha$ -химотрипсина (боковая цепь -Ser<sup>195</sup> повернута от нативного положения на  $-80^\circ$ ; расстояния даны в Å)

между квазисубстратом и основной цепью -Ser<sup>195</sup>. Один из атомов карбоксилла теперь может вступать во взаимодействие с водородом гидроксила -Ser<sup>195</sup>, другой — по-прежнему давать водородную связь с NH-группой остатка 193. Водородная связь между формиламиногруппой квазисубстрата и карбонилем -Ser<sup>214</sup> не образуется ни при  $\chi_1^1 90^\circ$ , ни при  $\chi_1^1 0^\circ$ , поскольку расстояние O...H превышает 4 Å.

Путем перебора углов  $\varphi$ ,  $\chi^1$ ,  $\chi^2$  было найдено положение ( $\varphi -110^\circ$ ,  $\chi^1 -70^\circ$ ,  $\chi^2 -60^\circ$ ), при котором расстояние между кислородом группы C=O -Ser<sup>214</sup> и протоном NH-группы квазисубстрата составляет  $\sim 2$  Å. Однако такой ориентации отвечает энергия, более чем на 10 ккал/моль превышающая энергию конформаций  $R_1$  и  $R_2$ . Можно допустить, что такая связь становится более реальной в комплексах с субстратами, способными образовывать антипараллельную  $\beta$ -структуру с остатками 214—216 [23]. Вместе с тем возможна и другая интерпретация полученного результата. Вполне реально предположить, что на стадии комплекса Михаэлиса образование водородной связи с группой NH ароматического остатка вообще не является обязательным. Очевидно, поэтому замена N-ацетиламинной группы на N-ацетоксигруппу не сказывается на способности субстрата к связыванию с ферментом [4]. Обсуждаемая водородная связь, как и связи NH-групп остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup> с карбонилем расщепляемой группы, по-видимому, существенна в стабилизации переходного (тетраэдрического)

состояния, при котором образуется валентная связь между С' субстрата и атомом О<sup>γ</sup> остатка Ser<sup>195</sup>. Такая водородная связь была зафиксирована в квазипереходном состоянии комплекса трипсина с ингибитором [30]. Действительно, переход от конформаций R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> к положению, в котором возможно образование валентной связи О<sup>γ</sup> — С' и которое по своей ориентации в активном центре близко к тетраэдрическому состоянию, сопровождается уменьшением расстояния СО (214)... HN до 2,5 Å, т. е. до длины водородной связи. Таким образом, связь между С=О остатка Ser<sup>214</sup> и амидной группой на N-конце ароматического центрального остатка субстрата, наряду с другими факторами [31], способствует переходу комплекса Михаэлиса в тетраэдрическое промежуточное состояние.

В заключение мы выражаем искреннюю благодарность В. К. Антонову за детальное обсуждение работы и ценные замечания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bender M. L., Kezdy F. J. (1965) Annual Rev. Biochem., 34, 49—76.
2. Ingles D. W., Knowles J. K. (1968) Biochem. J., 108, 561—569.
3. Steitz T. A., Henderson R., Blow D. M. (1969) J. Mol. Biol., 46, 337—348.
4. Henderson R. (1970) J. Mol. Biol., 54, 341—354.
5. Matthews B. W., Sigler P. B., Henderson R., Blow D. M. (1967) Nature, 214, 652—656.
6. Platzner K. E. B., Momany F. A., Scheraga H. A. (1972) Int. J. Peptide Protein Res., 4, 201—209.
7. Cohen S. G., Weinstein S. Y. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 5326—5330.
8. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dultér H. (1970) FEBS Letters, 8, 257—260.
9. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dultér H. (1973) Eur. J. Biochem., 39, 381—391.
10. Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J. (1973) Biochemistry, 12, 2035—2041.
11. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) Biochem. et biophys. acta, 229, 1—17.
12. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Дашевский В. Г. (1968) Молекулярн. биология, 2, 622—630.
13. Sutton L. E. (Ed.) (1958) Tables of Interatomic Distances and Configurations in Molecules and Ions, The Chemical Soc., London.
14. Birktoft J. J., Blow D. M. (1972) J. Mol. Biol., 68, 187—240.
15. Scott R. A., Scheraga H. A. (1966) J. Chem. Phys., 45, 2091—2101.
16. Pletnev V. Z., Popov E. M., Kadyмова F. A. (1974) Theoret. chim. acta (Berlin), 35, 93—96.
17. Poland D., Scheraga H. A. (1967) Biochemistry, 6, 3791—3800.
18. Липкинд Г. М., Архипов С. Ф., Попов Е. М. (1970) Ж. структурной химии, 11, 121—126.
19. Scheraga H. A. (1968) Adv. Phys. Org. Chem., 6, 103—184.
20. Пиментел Дж., Мак-Клеллан О. (1964) Водородная связь, «Мир», М.
21. Попов Е. М., Дашевский В. Г., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф. (1968) Молекулярн. биология, 2, 612—620.
22. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1970) Изв. АН СССР, Сер. хим., 315—322.
23. Segal D. M., Powers J. C., Cohen G. H., Davies D. R., Wilcox P. E. (1971) Biochemistry, 10, 3728—3738.
24. Антонов В. К., Румш Л. Д. (1972) Химия природн. соедин., 5, 581—596.
25. Антонов В. К. (1972) Докл. АН СССР, 205, 839—841.
26. Rodgers P., Roberts G. C. K. (1973) FEBS Lett., 36, 330—333.
27. Bystrov V. F., Portnova S. L., Balashova T. A., Tsetlin V. I., Ivanov V. T., Kostetzky P. V., Ovchinnikov Yu. A. (1969) Tetrahedron Lett., 60, 5283—5286.
28. Kajender S., Han M., Lumry R. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 1378—1385.
29. Lipkind G. M., Arkhipova S. F., Popov E. M. (1973) Int. J. Peptide Prot. Res., 5, 381—397.
30. Rühlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R. (1973) J. Mol. Biol., 77, 417—436.
31. Blow D. M., Janin J., Sweet R. M. (1974) Nature, 249, 54—57.

Поступила в редакцию  
11.XII.1974

THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN  
NONCOVALENT COMPLEX N-FORMYL-*L*-TRYPTOPHAN

LIPKIND G. M., MAKSUMOV I. S., POPOV E. M.

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

The results of semiempirical calculations on conformational properties of N-formyl-*L*-tryptophan sorption complex with  $\alpha$ -chymotrypsin are presented. The rotational  $\varphi$ (N-C $^{\alpha}$ ),  $\psi$ (C $^{\alpha}$ -C'),  $\chi^1$ (C $^{\alpha}$ -C $^{\beta}$ ),  $\chi^2$ (C $^{\beta}$ -C $^{\gamma}$ ) angles were varied whereas the indole ring was maintained fixed in a hydrophobic cavity. Among all favorable forms only lowest energy conformation is productive, its backbone orientation in the active center being considerably different from that of N-formyl-*L*-tryptophan in crystalline complex. The calculations indicate the presence of a hydrogen bond between the carboxyl group of N-formyl-*L*-tryptophan and Gly-193 amino group and the absence of hydrogen bonding between the formylamino group and the Ser-214 carbonyl. The rotation of O $^{\gamma}$  Ser-195 in the free enzyme is shown to be not restricted.

---