



УДК 577.156.3.02 : 541.63

**КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ
ОСТАТКОВ Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ и Met¹⁹² АКТИВНОГО ЦЕНТРА
 α -ХИМОТРИПСИНА***Максумов И. С., Липкин Г. М., Попов Е. М.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

На основе механической модели молекулы проведено рассмотрение потенциальной поверхности боковых цепей остатков Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ и Met¹⁹² активного центра α -химотрипсина в поле как нативного фермента, так и его комплексов с субстратами. Показана реализация в структуре белка самых предпочтительных конформеров. Выявлена связь между подвижностью остатка и его функциональной ролью в каталитическом акте.

Эффективность и специфичность ферментативного катализа обусловлены электронно-конформационным соответствием фермента и субстрата на всех стадиях каталитического акта. Осуществление такой динамической комплементарности взаимодействующих молекул возможно лишь при взаимных конформационных перестройках в процессе катализа. Они неизбежны также вследствие происходящих на различных стадиях каталитического акта химических изменений фермента и субстрата. Отклонения от нативной структуры фермента могут быть значительны. Так, рентгеноструктурный анализ α -химотрипсина и его ингибиторных комплексов [1—6] указывает на изменения положений боковых цепей целого ряда остатков, входящих в активный центр ($\sim 2,5$ Å у -Ser¹⁹⁵-, ~ 1 Å у -Met¹⁹²-, $\sim 0,5$ Å у -His⁵⁷-). Аналогичные движения каталитически важных остатков наблюдаются в других сериновых протеиназах [7—12]. В связи с этим для понимания механизма катализа наряду с нативной структурой фермента представляется не менее важным знание потенциальной энергии ее изменения, особенно в области активного центра. Решение этой задачи является главным образом прерогативой теоретического конформационного анализа, на основе которого проведено данное исследование.

В настоящем сообщении изложены результаты расчета конформационных состояний остатков Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ активного центра α -химотрипсина, образующих так называемую зарядно-релейную систему [13], и Met¹⁹², эффективно контактирующего с боковой цепью центрального остатка субстрата [3]. Потенциальная поверхность указанных остатков рассматривалась как для нативного α -химотрипсина, так и для его тетраэдрического аддукта и ацильного производного с метиламидом N-ацетил-L-фенилаланина. Некоторые аспекты этой проблемы нами были затронуты в предыдущих сообщениях [14—16].

Расчетные модели и потенциальные функции. В исследовании конформационных возможностей -Asp¹⁰²-, -His⁵⁷-, -Ser¹⁹⁵- и -Met¹⁹²-

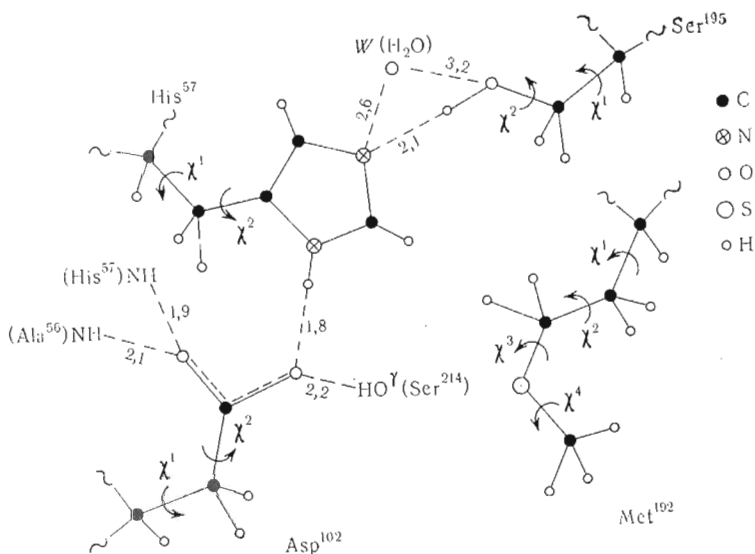


Рис. 1. Расчетная модель остатков Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ и Met¹⁹² активного центра α -химотрипсина. Расчетные длины водородных связей (Å) показаны пунктиром

учитывались их взаимодействия со следующими остатками активного центра α -химотрипсина: 35, 39—43, 55—60, 94, 96—102, 142, 143, 189—197, 212—222, 224—228. Модели рассматриваемых остатков представлены на рис. 1. Переменными параметрами являлись двугранные углы вращения вокруг связей боковых цепей. Отсчет углов производился согласно стандартной номенклатуре [17]. Основные цепи -Asp¹⁰²-, -His⁵⁷-, -Ser¹⁹⁵- и -Met¹⁹²-, а также все остальные остатки активного центра жестко фиксировались в соответствии с координатами атомов, полученными при рентгеноструктурном исследовании α -химотрипсина [4]. Положения атомов водорода найдены нами на основе координат атомов C, N, O, S из простейших стереохимических правил. Для длин связей и валентных углов в подвижной части системы приняты значения, предложенные в [18]. В соответствии с работой Блоу и соавт. [13] боковая цепь остатка Asp¹⁰² рассматривалась ионизованной, а His⁵⁷ — как в непротонированном, так и протонированном состояниях.

Представление о конформационной свободе рассматриваемых остатков и об их оптимальных формах получено из конформационных карт, построенных с шагом в 20°. При этом учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, торсионные вклады и водородные связи. Невалентные взаимодействия рассчитывались по потенциалу Леннарда — Джонса с параметрами Скотта и Шераги [19]. Торсионные потенциалы и величины барьеров вращения взяты из обзора Шераги [18]. Энергия электростатических взаимодействий находилась в монополярном приближении с зарядами на атомах, предложенными Поландом и Шерагой [20]. Величина эффективной диэлектрической проницаемости ϵ принималась равной 4 [21]. Водородные связи учитывались по потенциалу типа Морзе [22] с параметром D 4 ккал/моль, соответствующим оптимальной энергии водородной связи в неполярной среде [21].

Обсуждение результатов расчета. Центральное положение в активном центре α -химотрипсина занимает зарядно-релейная система. Для выяснения взаимообусловленности конформационных состояний -Asp¹⁰²-, -His⁵⁷- и -Ser¹⁹⁵- нами исследована потенциальная поверхность каждого остатка в поле бейджа как с учетом, так и без учета его контактов с другими остатками зарядно-релейной системы.

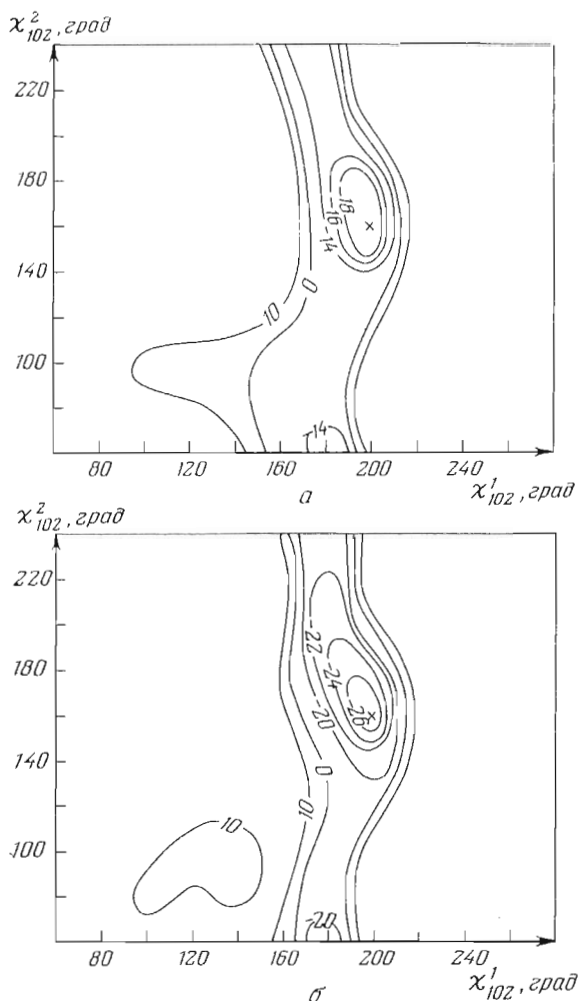
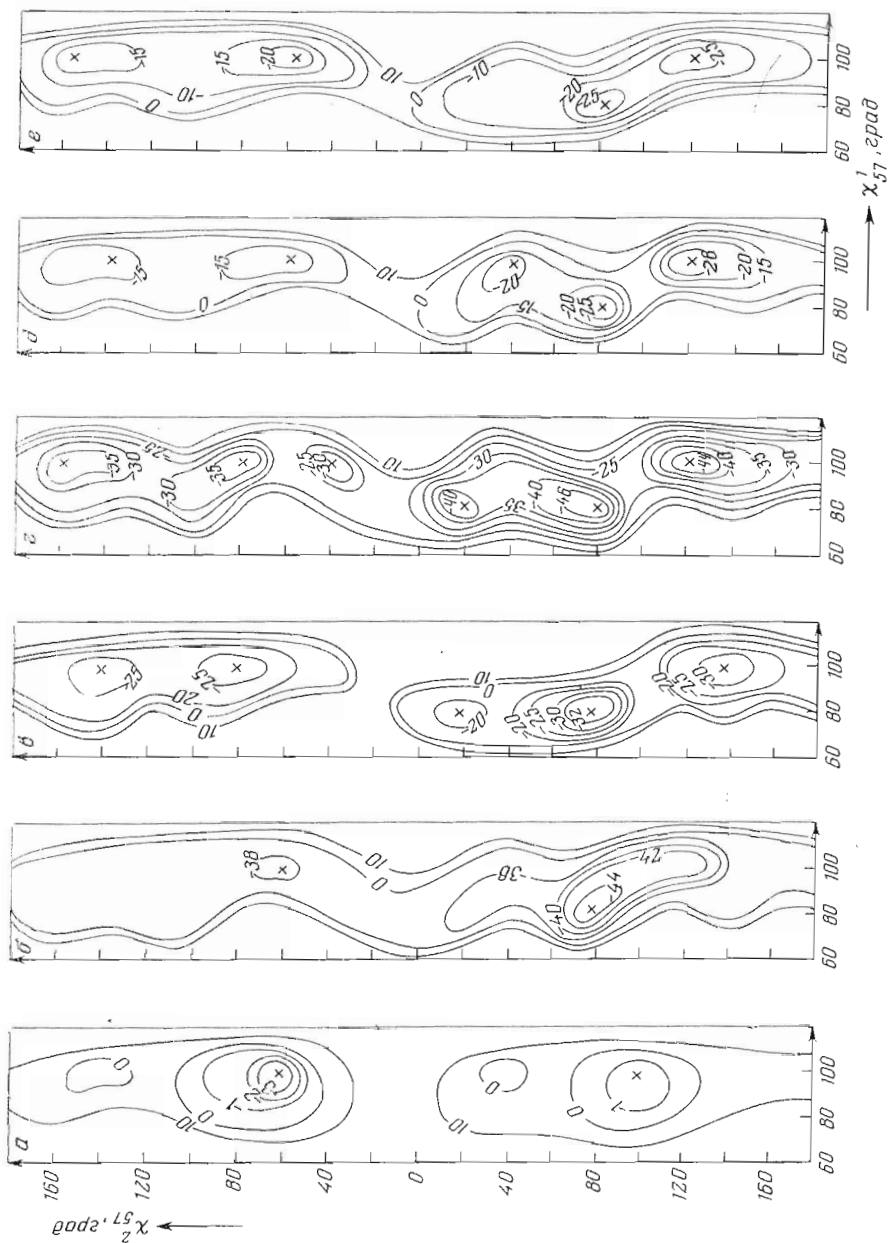


Рис. 2. Конформационные карты боковой цепи $-\text{Asp}^{102}$ в поле α -химотрипсина без учета взаимодействий с боковыми цепями $-\text{His}^{57}$ - и $-\text{Ser}^{195}$ - (а), без учета взаимодействий с боковой цепью $-\text{Ser}^{195}$ - (б)

На рис. 2,а, 3,а и 4,а приведены конформационные карты $\chi^1 - \chi^2$ и χ^1 боковых цепей $-\text{Asp}^{102}$ -, $-\text{His}^{57}$ и $-\text{Ser}^{195}$ -, полученные без учета взаимодействия между ними. Конформационная подвижность боковой цепи $-\text{Asp}^{102}$ весьма ограничена; угол χ^1 допускает лишь незначительное отклонение от 200° , а изменения угла χ^2 от оптимального значения 170° возможны лишь в пределах $\pm 10^\circ$ (рис. 2, а). Форма потенциальной поверхности $-\text{Asp}^{102}$ определяется тесными контактами боковой цепи с рядом гидрофобных остатков и образованием водородных связей с остатками Ala^{56} и Ser^{214} . Расчетные длины этих водородных связей показаны на рис. 1. Положение единственного на карте минимума хорошо согласуется с экспериментальными значениями $\chi^1 196^\circ$ и $\chi^2 174^\circ$ [4]. Несмотря на резкий профиль потенциальной поверхности, конформация $-\text{Asp}^{102}$ в α -химотрипсине отвечает одной из наиболее выгодных форм свободного монопептида [23].

Боковая цепь $-\text{His}^{57}$ -, не возмущенная взаимодействиями с Asp^{102} - и $-\text{Ser}^{105}$ -, обладает значительной подвижностью по углу χ^2 (рис. 3, а), однако для угла χ^1 доступен очень узкий интервал вблизи 100° , куда и

Рис. 3. Конформационные карты боковой цепи -His⁵⁷. В поле α -химотрипсина без учета взаимодействий с боковыми цепями -Asp¹⁰² и -Ser¹⁹⁵, (а), без учета взаимодействий с боковой цепью -Ser¹⁹³, (б), при нативном положении -Ser¹⁹⁵, (в), при положении -Ser¹⁹⁵ в ацилферменте (г), в тетраэдрическом комплексе с метиламидом N-ацетил-L-фенилаланина (д), в ацильном комплексе с метиламидом N-ацетил-L-фенилаланина (е)



попадает экспериментальное значение этого угла в нативном ферменте (χ^1 87° [4]). Глобальный минимум на сечении $\chi^1 - \chi^2$ (χ^1 100° , χ^2 60°) не соответствует реальной ориентации $-\text{His}^{57}$, для которого χ^2 равен -101° . Ей отвечает второй минимум с χ^1 100° , χ^2 -100° , энергия которого на ~ 2 ккал/моль выше глобального*.

В кислотно-основном механизме катализа α -химотрипсином большое значение придается подвижности боковой цепи $-\text{Ser}^{195}$. Рентгеноструктурные исследования показали, что ацилирование фермента сопровождается смещением атома O^γ (195) примерно на $2,5 \text{ \AA}$ от нативного положения

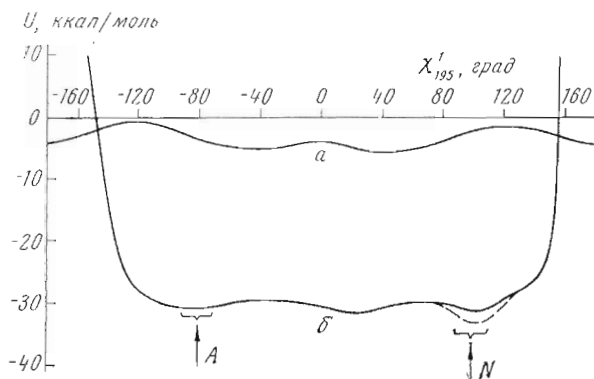


Рис. 4. Конформационные карты боковой цепи $-\text{Ser}^{195}$ в поле α -химотрипсина без учета взаимодействий с боковыми цепями $-\text{Asp}^{102}$ и $-\text{His}^{57}$ (а), при учете взаимодействия со всеми остатками активного центра (б)

[1, 3, 6], что соответствует вращению вокруг связи $\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta$ примерно на 120° . Сечение потенциальной поверхности χ^1 ($\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta$) (рис. 4, а) для $-\text{Ser}^{195}$, построенное без учета взаимодействия с боковыми цепями остатков His^{57} и Asp^{102} , показывает, что вращение вокруг связи $\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta$ может происходить без каких-либо пространственных затруднений в пределах от -80 до $+80^\circ$. Положения максимумов на кривой обусловлены прежде всего формой торсионного потенциала вокруг связи $\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta$. Энергия при χ^1 0° понижена из-за образования водородной связи $\text{O}^\gamma \dots \text{H} - \text{N}$ ($-\text{Ser}^{195}$).

При учете взаимодействия боковой цепи $-\text{His}^{57}$ со всеми остатками активного центра, за исключением боковой цепи $-\text{Ser}^{195}$, конформационная карта $\chi^1 - \chi^2$ (рис. 3, б) претерпевает изменения по сравнению с ранее рассмотренной картой (рис. 3, а). Боковая цепь $-\text{Asp}^{102}$ фиксировалась в своем оптимальном положении (рис. 2, а). Для того чтобы оба азота имидазольного кольца $\text{N}^{\delta 1}$ и $\text{N}^{\delta 2}$ были потенциально адекватными в отношении взаимодействия с $-\text{Asp}^{102}$, остаток His^{57} принимался протошироковым. По сравнению с сечением на рис. 3, а глобальный минимум на рис. 3, б сместился и располагается теперь при углах χ^1 80° и χ^2 -80° , весьма близких экспериментальным значениям (χ^1 87° и χ^2 -101° [4]). Общее повышение энергии на карте (рис. 3, б, см. также рис. 4, б), наблюдаемое при включении в расчет боковой цепи $-\text{Asp}^{102}$, вызвано в основном ее взаимодействиями с фиксированной частью активного центра. Аналогичный эффект не столь значителен в отношении боковых цепей $-\text{His}^{57}$ и $-\text{Ser}^{195}$ (рис. 2, б и рис. 3, в, г). Таким образом, стабилизация гистидина в нативной конформации происходит за счет его взаимодействия с аспарагиновой кислотой, т. е. последняя выполняет важную ориентационную функцию. Очевидно, воздействие остатка Asp^{102} на $-\text{His}^{57}$

* Отсчет энергии производится в абсолютной шкале.

привело к такому его уникальному конформационно-электронному состоянию, в котором он становится эффективным для выполнения каталитической функции. Что же касается самой аспарагиновой кислоты, то взаимодействие с гистидином практически не отражается на ее конформационных свойствах (рис. 2, б).

Потенциальная кривая вращения боковой цепи $-\text{Ser}^{195}$ - в поле белка, включая остатки Asp^{102} и His^{57} при их ориентации в нативном α -химотрипсине, приведена на рис. 4, б. Энергия в каждой точке проминимизирована по углу χ^2 . Кривая показывает, что конформационные изменения серина могут происходить практически свободно в очень широком интервале — от -120 до 140° . Более сглаженный характер кривой в этом интервале по сравнению с рис. 4, а обусловлен образованием водородных связей боковой цепи $-\text{Ser}^{195}$ - с атомом $\text{N}^{\epsilon 2}$ $-\text{His}^{57}$ - при нативном положении гидроксила (N , $\chi^1 \sim 90^\circ$) и с карбонилем $-\text{Ser}^{214}$ - при $\chi^1 \sim -90^\circ$, отвечающем положению $-\text{Ser}^{195}$ -, наблюдаемому в ацилферменте (А, [4]). Резкое увеличение энергии на границах интервала связано с наталкиванием серина и гистидина. Вместе с тем возможные конформации боковой цепи $-\text{Ser}^{195}$ - в белке являются низкоэнергетическими для серина в свободном состоянии [24].

В нативном положении боковая цепь $-\text{Ser}^{195}$ - дополнительно стабилизирована водородной связью с ориентационной молекулой воды W , координаты которой приведены Биркфотом и Блоу [4]. Потенциальная кривая, учитывающая взаимодействие $-\text{Ser}^{195}$ с W , показана на рис. 4, б пунктирной линией. При вытеснении молекулы воды, что имеет место при связывании субстратов [2, 4], стабилизирующее влияние водородной связи пропадает (сплошная линия) и все положения боковой цепи серина в интервале $-120 \div 140^\circ$ становятся практически равновероятными. Следовательно, переход $N \rightarrow A$ может происходить без каких-либо внутримолекулярных затруднений. Этот вывод полностью противоречит точке зрения Полгара и Асбота [25], которые полагают, что поворот боковой цепи серина невозможен по стерическим причинам. Результаты расчета также не в полной мере согласуются с предположением Фершта и соавт. [26], согласно которому вращение серина является вынужденным и осуществляется за счет невыгодных контактов с субстратом. По нашему мнению, оно может происходить спонтанно в результате вытеснения при комплексообразовании молекулы воды W .

На рис. 3, в—г приведены конформационные карты $-\text{His}^{57}$ - в поле активного центра, построенные при учете взаимодействия с боковой цепью $-\text{Ser}^{195}$ - при двух экспериментально наблюдаемых положениях атома O^γ (195) в нативном ($\chi^1 \sim 90^\circ$) и ацилированном ($\chi^1 \sim -90^\circ$) α -химотрипсине [4]. Глобальный минимум сохраняет такое же положение ($\chi^1 80^\circ$, $\chi^2 -80^\circ$), как и на карте, при построении которой не учитывалось взаимодействие с $-\text{Ser}^{195}$ - (рис. 3, б). Помимо этого минимума на сечении 3, в четко локализуется другой низкоэнергетический минимум при $\chi^1 100^\circ$ и $\chi^2 -140^\circ$, а на сечении 3, г — при $\chi^1 100^\circ$, $\chi^2 -120^\circ$. В тетраэдрическом аддукте и ацильном производном α -химотрипсина с метиламидом N -ацетил- L -фенилаланина [15, 16] на потенциальной поверхности боковой цепи $-\text{His}^{57}$ - именно минимум при $\chi^1 100^\circ$, $\chi^2 -120^\circ$ становится глобальным (рис. 3, д, е). Интересно отметить, что положения глобальных минимумов в свободном α -химотрипсине ($\chi^1 80^\circ$ и $\chi^2 -80^\circ$, рис. 3, в) и его комплексах (рис. 3, д, е) не совпадают. Таким образом, из конформационных карт следует, что боковая цепь $-\text{His}^{57}$ - не зажата в белке жестко и может подстраиваться к новому окружению при сорбции субстрата. Найденная наиболее предпочтительная ориентация гистидина в комплексах (рис. 3, д, е) хорошо согласуется с экспериментом по тозил- α -химотрипсину ($\chi^1 93^\circ$, $\chi^2 -104^\circ$ [4]).

Значение угла вращения χ^2 ($\text{C}^\beta-\text{C}^\gamma$) боковой цепи остатка His^{57} , равное -120° , наиболее характерно для аддукта (рис. 3, д), поскольку в ацил-

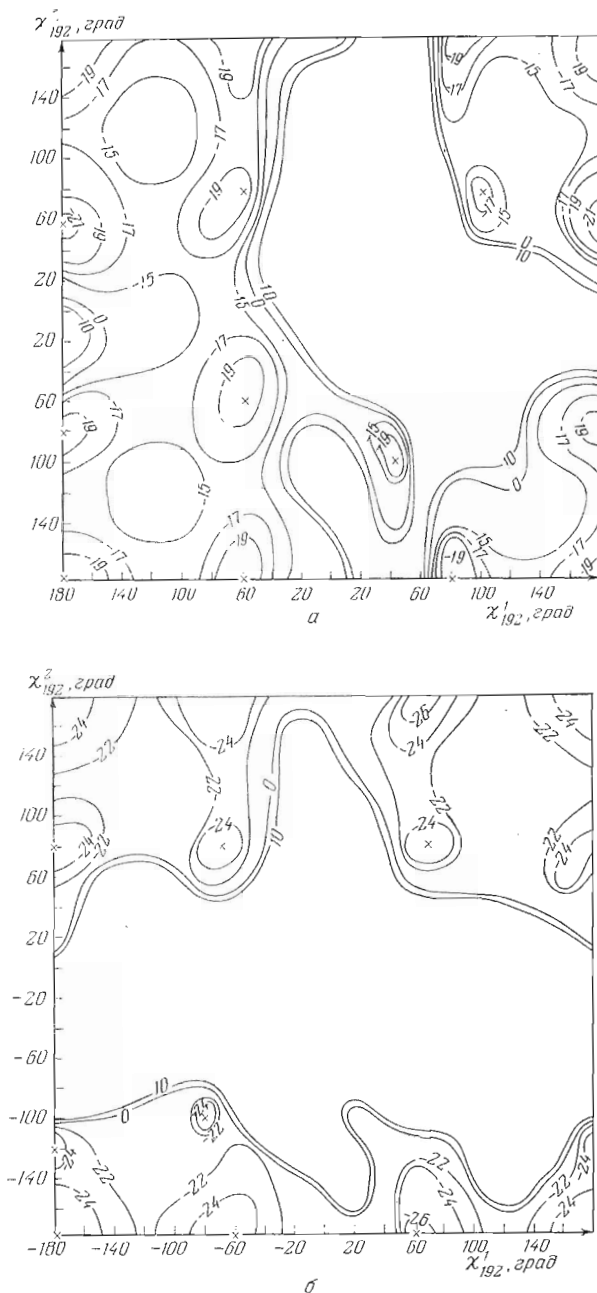


Рис. 5. Конформационные карты боковой цепи -Met¹⁹²- в поле нативного α -химотрипсина (а), в поле N-ацетил-L-фенилаланил- α -химотрипсина (б). Карты построены без учета электростатических взаимодействий

ферменте положения с χ^2 -80 и -120° приблизительно изоэнергетичны (рис. 3, е). Факт смещения -His⁵⁷- от нативного положения был обнаружен в комплексах трипсина с его ингибиторами STI и PTI [10—12]. В случае χ^2 -120° происходит ослабление водородной связи O ^{δ 1} (102) . . . HN ^{δ 1} (57), что также отмечается авторами рентгеноструктурных исследований аддуктов [10—12]. Это обстоятельство способствует протонированию отходящей группы субстрата имидазолом -His⁵⁷-.

Помимо остатков зарядно-релейной системы нами рассмотрены в поле белка конформационные состояния боковой цепи $-\text{Met}^{192}$, для которой также отмечается изменение положения при комплексообразовании [3]. Смещения этого остатка играют важную роль в процессе активации химотрипсина [27]. Боковая цепь, как видно из сечения $\chi^1 - \chi^2$ (рис. 5, а), обладает большой свободой движения. Карта $\chi^1 - \chi^2$ построена при экспериментальном значении угла $\chi^3 - 145^\circ$ в тозил- α -химотрипсине [4] и $\chi^4 60^\circ$. При других значениях угла χ^3 , соответствующих минимальным значениям торсионной энергии, как показал расчет, форма потенциальной поверхности остается практически неизменной. Для боковой цепи $-\text{Met}^{192}$ в поле нативного α -химотрипсина можно выделить 9 предпочтительных ориентаций, для которых в порядке возрастания энергии углы χ^1, χ^2 равны 180, 60; 80, 180; 180, 180; $-60, 180$; $-60, -60$; $-60, 80$; 180, -80 ; 100, 80; 40, -100° . Реальность конформационных переходов боковой цепи метионина находит свое подтверждение в рентгеноструктурном исследовании как самого фермента [2, 3], так и $[\text{Me-His}^{57}]\alpha$ -химотрипсина [5].

Сравнительное сопоставление структур нативного и ацилированного α -химотрипсина [3] показывает, что в нативном белке боковая цепь $-\text{Met}^{192}$ направлена во внешнюю область, тогда как в ацилферменте ее ориентация меняется таким образом, что она прикрывает боковую цепь ароматического остатка субстрата от контакта с водой. В первой ориентации угол χ^1 равен $\sim 60^\circ$, во второй ~ 180 или -60° . Сечение потенциальной поверхности (рис. 5, а) отражает возможность таких конформационных перестроек $-\text{Met}^{192}$. Ацилирование α -химотрипсина приводит к сужению конформационной свободы боковой цепи этого остатка: область значений угла χ^2 ($C^\beta - C^\gamma$) от -80 до $+60^\circ$ становится запрещенной (рис. 5, б). Выделяемое в рентгеноструктурном исследовании тозил- α -химотрипсина положение $-\text{Met}^{192}$ ($\chi^1 - 68^\circ$ и $\chi^2 141^\circ$ [4]) соответствует одному из самых низкоэнергетических минимумов на конформационной карте.

Таким образом, сопоставление результатов расчета потенциальных поверхностей боковых цепей остатков Asp^{102} , His^{57} , Ser^{195} и Met^{192} в поле α -химотрипсина с экспериментально наблюдаемыми их положениями приводит к заключению о реализации в структуре белка самых предпочтительных конформеров. Они в свою очередь соответствуют одной из низкоэнергетических форм остатков в свободном состоянии, т. е. не являются напряженными по близким взаимодействиям. Характер конформационной подвижности остатка находится в тесной связи с его функциональной ролью в катализе. Боковая цепь $-\text{Asp}^{102}$, практически жестко фиксированная в белке, правильно ориентирует имидазольное кольцо $-\text{His}^{57}$, для которого, однако, имеются возможности конформационной подстройки путем вращения вокруг связи $C^\beta - C^\gamma$ (χ^2). Напротив, боковая цепь $-\text{Ser}^{195}$ может изменять свои положения в широком диапазоне значений угла χ^1 (до 200°). Ориентации, принимаемые остатками на различных стадиях каталитического акта, уже потенциально предопределены в нативном ферменте, что обуславливает спонтанность конформационных перестроек в процессе функционирования α -химотрипсина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matthews B. W., Sigler P. B., Henderson R., Blow D. M. (1967) *Nature*, **214**, 652—656.
2. Steitz T. A., Henderson R., Blow D. M. (1969) *J. Mol. Biol.*, **46**, 337—348.
3. Henderson R. (1970) *J. Mol. Biol.*, **54**, 341—354.
4. Birktoft J. J., Blow D. M. (1972) *J. Mol. Biol.*, **68**, 187—240.
5. Wright C. S., Hess G. P., Blow D. M. (1972) *J. Mol. Biol.*, **63**, 295—303.
6. Robillard G. T., Powers J. C., Wilcox P. E. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1773—1784.
7. Shotton D. M., White N. J., Watson H. C. (1972) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **XXXVI**, 91—105.
8. Robertus J. D., Alden R. A., Birktoft J. J., Kraut J., Powers J. C., Wilcox P. E. (1972) *Biochemistry*, **11**, 2439—2449.

9. Krieger M., Kay L. M., Stroud R. M. (1974) *J. Mol. Biol.*, **83**, 209—230.
10. Rühlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R. (1973) *J. Mol. Biol.*, **77**, 417—436.
11. Blow D. M., Janin J., Sweet R. M. (1974) *Nature*, **249**, 54—57.
12. Sweet R. M., Wright H. T., Janin J., Chothia C. H., Blow D. M. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4212—4228.
13. Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S. (1969) *Nature*, **221**, 337—340.
14. Липкинд Г. М., Максумов И. С., Попов Е. М. (1975) *Биоорганич. химия*, **1**, 973 — 984.
15. Максумов И. С., Липкинд Г. М., Попов Е. М. (1976) *Биоорганич. химия*, **2**, 632—647.
16. Липкинд Г. М., Максумов И. С., Касумова Л. И., Попов Е. М. (1976) *Биоорганич. химия*, **2**, 648—654.
17. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **229**, 1—17.
18. Scheraga H. A. (1968) *Adv. Phys. Org. Chem.*, **6**, 103—184.
19. Scott R. A., Scheraga H. A. (1966) *J. Chem. Phys.*, **45**, 2091—2101.
20. Poland D., Scheraga H. A. (1967) *Biochemistry*, **6**, 3791—3800.
21. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1970) *Ж. структурн. химии*, **11**, 121—126.
22. Попов Е. М., Дашевский В. Г., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 612—620.
23. Kreissler M. A., Lipkind G. M., Arkhipova S. F., Popov E. M. (1973) *J. Chem. Phys.*, **70**, 1371—1378.
24. Lipkind G. M., Arkhipova S. F., Popov E. M. (1973) *Int. J. Peptide Prot. Res.*, **5**, 381—397.
25. Polgar L., Asboth B. (1974) *J. Theor. Biol.*, **46**, 543—548.
26. Fersht A. R., Blow D. M., Pastrez J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2035—2041.
27. Freer S. T., Kraut J., Robertus J. D., Wright H. T., Xuong Ng. H. (1970) *Biochemistry*, **9**, 1997—2009.

Поступила в редакцию
19.XI.1975

CONFORMATIONAL PROPERTIES OF ASP¹⁰², HIS⁵⁷, SER¹⁹⁵ AND MET¹⁹² RESIDUES OF α -CHYMOTRYPSIN ACTIVE CENTER

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

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

The side chain potential surfaces of Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ and Met¹⁹² residues of α -chymotrypsin active center were considered starting from the mechanical model of the molecule. The interactions within the native enzyme as well as in its complexes with the substrates were analyzed. Only low-energy conformers were shown to occur in the protein structure. The relationship was revealed between the mobility of a residue and its catalytic function.