



УДК 577.338

© 1994 С. Л. Александров

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
V. С-КОНЦЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
РАН, Москва*

Методом молекулярной механики проанализированы тетраэдрические интермедиаты ацилирования α -химотрипсина N-замещенными амидами дипептидов. Установлена доминирующая роль С-концевых взаимодействий как в кинетической специфичности, так и в специфичности протонирования уходящей группы. Показано, что кинетическая специфичность сериновых протеиназ определяется переходом между двумя формами тетраэдрического производного субстрата на предстационарной стадии.

Вторичная специфичность протеиназ (см., например, [2]), т. е. их специфичность к удаленным от реагирующей группы фрагментам субстрата (в частности, к С-концевому [3—5]), сильно влияет на скорость протеолиза.

Влияние вторичных взаимодействий с субстратом по-разному сказывается у протеиназ различных типов. Так, связанная с ними разница в скорости протеолиза достигает пяти порядков у пепсина [6], тогда как у α -химотрипсина вариации P_{-1} -остатка всего в 10—100 раз изменяют специфичность, оцениваемую величиной отношения k_{cat}/K_m [4]. Во многих случаях вторичные взаимодействия проявляются в изменении k_{cat} , но не K_m [7].

В случае же процессинга белков протеиназами обоих типов, например при активации трипсиногена энтеропептидазой [8] и ангиотензиногена ренином [9], эти взаимодействия становятся доминирующими и определяют абсолютную специфичность протеиназ, которая необходима для регуляторных функций *in vivo* [10].

Экспериментальные исследования пока не могут выявить природу такого сильного влияния вторичных взаимодействий, и потому естественно искать ответ, обращаясь к компьютерному моделированию, в частности к методу молекулярной механики.

Согласно развиваемой в нашей лаборатории концепции [11, 12], эффективность и специфичность протеиназ обусловлена тем, что фермент стабилизирует продуктивный комплекс с субстратом. Такой стабилизации могут способствовать вторичные фермент-субстратные взаимодействия, которые компенсируют повышение свободной энергии, связанной с исчезновением *sp*-сопряженной амидной группы [13].

В настоящей работе с помощью сравнительного анализа структур тетраэдрических производных субстратов удалось объяснить кинетическую

* Сообщение IV см. [1].

Кинетические параметры исследуемых субстратов [5]

Субстрат *	k_{cat} , с^{-1}	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , $\text{с}^{-1}\text{М}^{-1}$
AcPhe-GlyNH ₂	0,14	14,6	9,6
AcPhe-AlaNH ₂	2,8	25	112
AcPhe-ValNH ₂	0,46	12,4	37,6

* Расщепляется амидная связь между аминокислотными остатками.

специфичность сериновых протеиназ и показать ее связь с протонированием амидного N-атома уходящей группы субстрата.

Молекулярная механика применялась для анализа нековалентных комплексов протеолитических ферментов с субстратами (см., например, [14]), но не для сопоставления структур тетраэдрических промежуточных производных с целью определить их связь с кинетической специфичностью и протонированием уходящей группы.

Методы и условия расчета. Метод молекулярной механики нельзя применять для сравнительной оптимизации нековалентных фермент-субстратных взаимодействий, так как он приводит к непродуктивности комплексов [15], однако он вполне уместен для анализа тетраэдрических интермедиатов.

В расчетах использовали программу, позволяющую анализировать конформационные возможности субстратов и некоторых участков фермента в поле атомов белка. Программа использовала: 1) значения потенциалов Леннарда — Джонса, предложенные Скоттом и Шерагой [16] для анализа нековалентных взаимодействий, 2) заряды на атомах [17] для вычисления электростатической энергии, 3) торсионные потенциалы связей [18], 4) потенциалы типа Морзе для оценки энергии водородных связей [19], 5) стандартные геометрические параметры производных аминокислот [18].

Значения двугранных углов приведены согласно стандартной номенклатуре [20]. Диэлектрическая проницаемость соответствовала слабополярной среде ($\epsilon = 4$), а оптимальное значение энергии водородной связи было выбрано равным 1,5 ккал/моль.

Некоторые торсионные потенциалы и заряды на атомах определяли методом CNDO/2 (программа «GEOMO» [21]).

Рассчитываемые системы. В качестве субстратов были выбраны близкие по структуре уходящей группы амиды дипептидов AcPhe-XNH₂ (X = -Gly-, -Ala- и -Val-), у которых K_m отличалась не более чем в 2 раза, а k_{cat} — примерно в 20 раз [5]. Это означает, что при их гидролизе разница в константах скорости второго порядка k_{cat}/K_m отражает главным образом кинетическую специфичность фермента (табл. 1).

В качестве фермента был выбран малоспецифичный α -химотрипсин, у которого минимальны электростатические и другие специфические взаимодействия с субстратами. Это позволило выявить наиболее общие аспекты С-концевой специфичности протеолиза сериновыми протеиназами. Использовали координаты атомов как нативного [22, 23], так и тозил- α -химотрипсина [24]. Локализацию протонов проводили на основе стехиометрии.

В расчет включали остатки белка, атомы которых расположены на расстоянии 8—10 Å от атомов ближайших остатков белкового панкреатического трипсинового ингибитора в фермент-ингибиторном комплексе [25]. К ним относятся сегменты полипептидной цепи фермента 16—20, 32—43, 54—61, 95—104, 140—146, 149—152, 183—199 и 209—229 — всего 84 аминокислотных остатка.

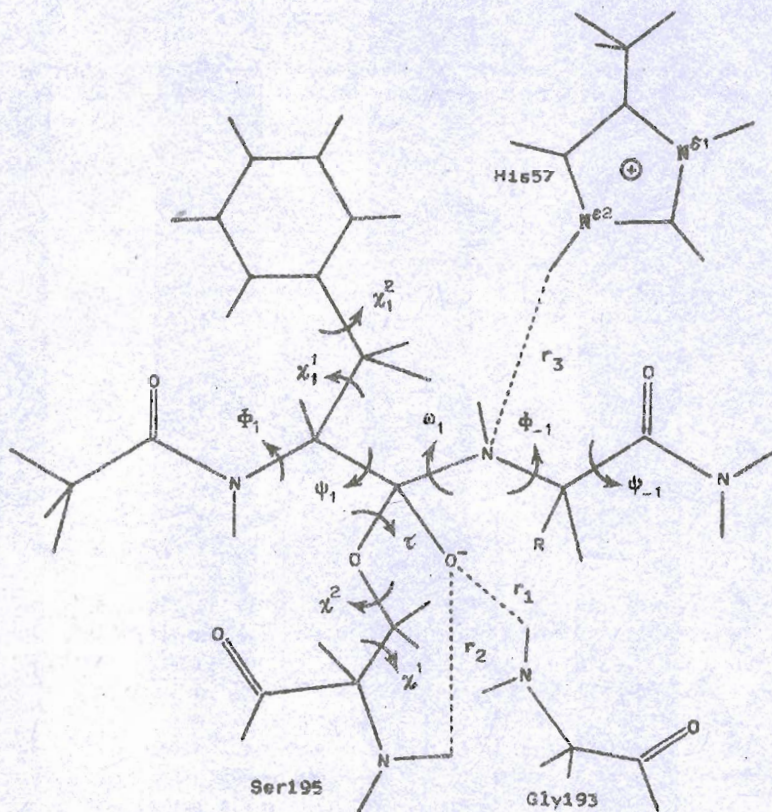


Рис. 1. Рассчитываемые модели тетраэдрических производных субстратов типа AcPhe-XNH₂ и ориентационные параметры, характеризующие их взаимодействия с остатками связывающего и каталитического центров фермента; R — боковые цепи уходящих групп тетраэдрических производных

Кроме полной оптимизации геометрии тетраэдрических производных субстратов определяли локализацию боковых цепей остатков активного центра белка, а именно остатков His57, Asp102, Met192 и Ser195.

Оптимизацию, в отличие от предшествующих расчетов, проводили с очень малым критерием выхода — не более 0,05 ккал/моль (ср., например, [14]), что позволило выявить ряд тонких отличий в геометрии тетраэдрических производных с различными уходящими группами.

Структура тетраэдрических производных субстратов и параметры, характеризующие их ориентацию относительно наиболее важных остатков активного центра фермента, приведены на рис. 1.

Геометрические параметры тетраэдрического производного N-метиламида N-ацетил-L-фенилаланина, включая двугранный угол τ (см. рис. 1), рассчитанный ранее в поле атомов α -химотрипсина [26], использовали в качестве исходных данных при сравнительном расчете интермедиатов протеолиза, протонированных по N^{δ2}-атому остатка His57. Торсионный потенциал реакционной амидной связи в этих производных был взят равным 4 ккал/моль.

Структура тетраэдрических интермедиатов протеолиза. Сравнительный анализ показал, что для трех амидов дипептидов конформации субстратного компонента и боковых цепей каталитических важных остатков белка практически одинаковы, несмотря на различия в структуре уходящих групп. В то же время конформация субстратного компонента в интермедиате кардинально отличалась от конформации этих субстратов в нековалентных комплексах. Это указывало на

Значения абсолютных величин энергии рассчитываемых систем и двугранных углов для субстратов и боковых групп фермента, ответственных за специфичность

Рассчитываемая система	Субстрат *								Ser195	Met192	E , ккал/моль
	P_1 -остаток					P_{-1} -остаток					
	Φ_1	Ψ_1	ω_1	χ_1^1	χ_1^2	Φ_{-1}	Ψ_{-1}	χ^1	χ^2		
Нековалентный комплекс **: X = -Gly- -Ala- -Val-	-98	37	177	-82	-50	-84	-151	32	143	-35,1	
	-97	39	176	-83	-51	-84	-153	32	142	-32,8	
	-97	38	179	-81	-52	-84	-158	33	144	-16,9	
Тетраэдрические промежуточные производные TETR1:											
X = -Gly-	-110	41	124	-52	141	-86	-156	-47	135	0,7	
-Ala-	-113	48	122	-53	146	-87	-173	-50	126	29,2	
-Val-	-116	48	119	-53	147	-85	179	-50	121	-7,3	
TETR2:											
X = -Gly-	-111	38	72	-49	141	-161	-151	-51	143	-21,8	
-Ala-	-113	40	75	-51	140	-145	-162	-52	142	-26,8	
-Val-	-124	39	73	-50	139	-136	-171	-51	142	-31,8	
Бычий панкреатический ингибитор трипсина ***	-117	39	164	-63	-172	-88	164	-83	68	—	

* См. рис. 1 (X — уходящая группа).

** Результаты сравнительного конформационного анализа [15].

*** Результаты рентгеноструктурного анализа комплекса этого ингибитора и β -трипсина [25].

то, что нуклеофильная атака включает конформационную перестройку субстратов (табл. 2) [15].

Имеются две главные особенности, характеризующие рассчитанные тетраэдрические интермедиаты.

Первая из них заключается в том, что эти производные по своей структуре очень близки к комплексам сериновых протеиназ с природными белковыми ингибиторами [27], в частности β -трипсина с бычьим панкреатическим ингибитором трипсина [25]. Если в таких комплексах ингибитор заменить на субстрат, должно иметь место сильное взаимодействие карбонильного O-атома субстрата с остатками «оксанионной полости» (r_1 и r_2 ; табл. 3). Такое взаимодействие очень сильно поляризует реакционную связь, приводя к значительному перераспределению электронной плотности.

В нековалентных комплексах [15] (табл. 3) гидролизуемая связь занимает иное положение относительно «оксанионной полости», и в ней не происходит перераспределение электронной плотности, увеличивающее ее электрофильность до уровня, достаточного для запуска гидролитического процесса [13, 15].

Таким образом, наши расчеты согласуются с концепцией о стабилизации субстрата в продуктивном комплексе [12], который структурно сходен с тетра-

Геометрические параметры рассчитываемых систем, определяющие электрофильную активацию субстратов и ответственные за специфичность переноса протона на уходящую группу

Рассчитываемая система*	$r_1, \text{Å}$	$r_2, \text{Å}$	$r_3, \text{Å}$	$\angle 1, \text{град}$	$\angle 2, \text{град}$
Нековалентный комплекс ^{2*} :					
X = -Gly-	2,84	3,76	—	—	—
-Ala-	2,80	3,74	—	—	—
-Val-	2,82	3,75	—	—	—
Тетраэдрические промежуточные производные					
TETR1:					
X = -Gly-	2,38	1,86	1,23	74	-28
-Ala-	2,39	1,70	1,34	85	9
-Val-	2,40	1,72	1,19	86	25
TETR2:					
X = -Gly-	2,44	1,90	1,11	94	12
-Ala-	2,44	1,82	1,31	95	16
-Val-	2,47	1,91	1,35	102	15
Бычий панкреатический ингибитор трипсина ^{3*}	2,29	2,03	—	—	—

* См. рис. 1 (X — уходящая группа).

^{2*} Результаты сравнительного конформационного анализа [15].

^{3*} Результаты рентгеноструктурного анализа комплекса этого ингибитора и β -трипсина [25]; имеется пирамидализация реакционной амидной группы ($\Delta_c = 0,09 \text{ Å}$).

^{4*} Расстояние между $\text{H}^{\delta 2}$ -протоном His57 и неподеленной парой электронов атома азота уходящей группы субстратов.

^{5*} Угол между связью $\text{N}-\text{C}_\alpha$ P₁-остатка субстратов и направлением, соединяющим $\text{H}^{\delta 2}$ -протон и N-атом уходящей группы субстрата.

^{6*} Угловое отклонение неподеленной пары и направления, соединяющего $\text{H}^{\delta 2}$ -протон и N-атом уходящей группы, относительно вращения по углу ω_1 .

эдрическим интермедиатом, а не с нековалентным комплексом, в котором амидная группа субстрата планарна [15].

Вторая особенность связана с наличием не одного, а двух равновесных тетраэдрических промежуточных производных (TETR1 и TETR2), различающихся в основном значением угла ω_1 (сечения потенциальных поверхностей по углам ω_1 и φ_{-1} ; табл. 2 и рис. 2). Естественно возникает вопрос: какое из этих двух производных протонируется, и не связана ли кинетическая специфичность с трансформацией одного тетраэдрического промежуточного производного в другое?

Протонирование N-атома уходящей группы субстрата. Протонирование уходящей группы сильно зависит от подвижности боковой цепи остатка His57, которая в тетраэдрических промежуточных производных очень ограничена, особенно по углу χ^1 [28], определяющему ориентацию этого остатка по отношению к N-атому уходящей группы субстрата.

Хотя анализ модельных систем отдает предпочтение протонированию через молекулу воды [29], при котором подвижность боковой цепи остатка His57 не

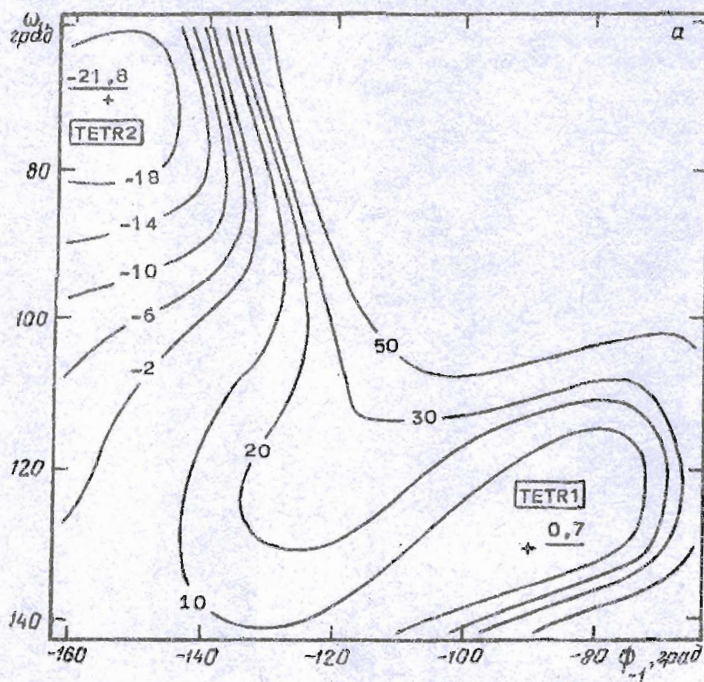


Рис. 2а

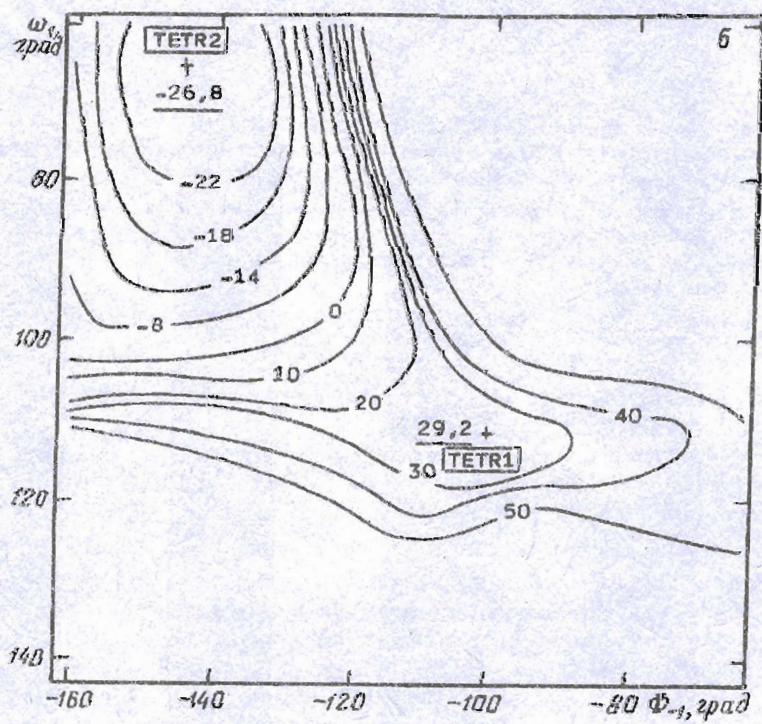


Рис. 2б

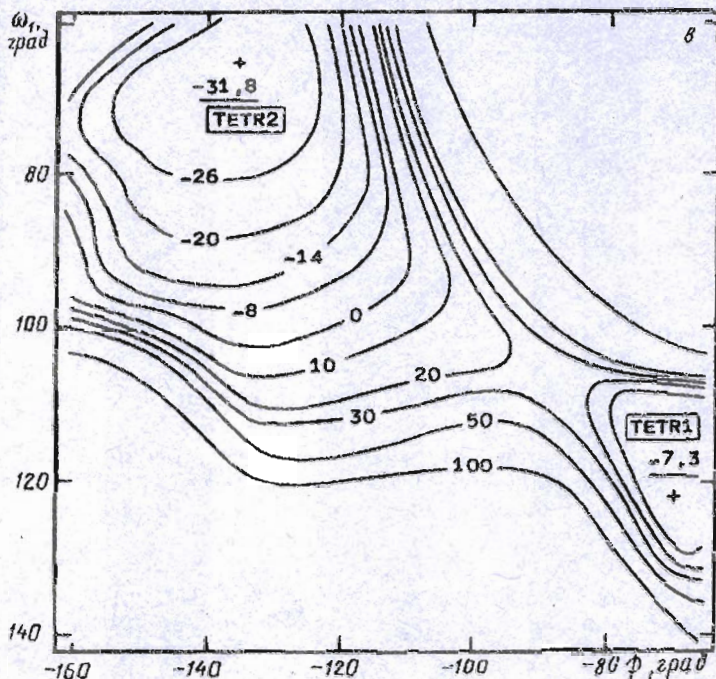


Рис. 2в

Рис. 2. Сечения потенциальной поверхности по двугранным углам ω_1 и ϕ_{-1} для тетраэдрических производных субстратов типа $AcPhe-XNH_2$, где $X = -Gly-$ (а), $-Ala-$ (б) и $-Val-$ (в)

играет главную роль, мы в своих расчетах не учитывали этот механизм, поскольку рентгеноструктурные данные о вытеснении акценторной молекулы воды противоречивы [22—24, 27], и для амидных субстратов нет данных, которые свидетельствовали бы об участии в протонировании промежуточных акценторов [30].

Сечения потенциальных поверхностей тетраэдрических промежуточных производных по углам ω_1 и ϕ_{-1} качественно отличаются друг от друга (рис. 2), и именно это различие определяет кинетическую специфичность анализируемых субстратов, независимо от механизма протонирования.

Для всех субстратов ни в одном из оптимизированных тетраэдрических промежуточных производных TETR1 и TETR2 $H^{\epsilon 2}$ -протон остатка His57 не ориентирован оптимально для протонирования амидного N-атома уходящей группы (табл. 3).

Трансформация тетраэдрического промежуточного производного TETR1 в TETR2, предшествующая образованию ацилфермента [31], связана с преодолением энергетического барьера (U_{ϵ}), с которым линейно коррелирует k_{cat} для всех трех субстратов (рис. 3). Структуры соответствующих переходных состояний, будучи различными для трех субстратов, тем не менее все соответствуют выгодному расположению $H^{\epsilon 2}$ -протона для его переноса на амидный N-атом: 1) минимально расстояние между $H^{\epsilon 2}$ -протоном His57 и неподеленной парой электронов амидного азота уходящей группы (r_3 ; см. рис. 1) — около 1,6 Å; 2) ориентация этого протона относительно неподеленной пары электронов амидного N-атома уходящей группы ($\angle 1$; см. табл. 3) близка к 109,5°; 3) связь N— $H^{\epsilon 2}$ по своему направлению совпадает с неподеленной электронной парой N-атома P₋₁-остатка ($\angle 2$, см. табл. 3).

Более того, из формы потенциальных поверхностей видно, что переход

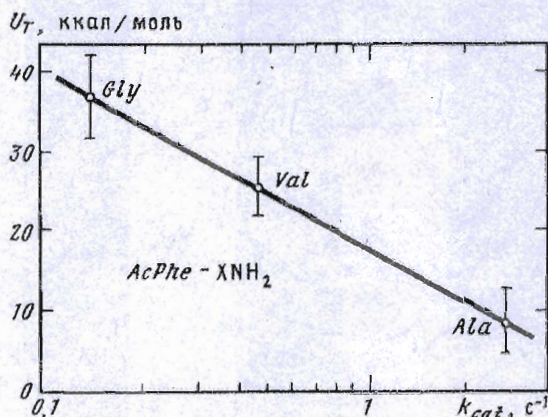


Рис. 3. Корреляция между каталитическими константами (k_{cat}) и энергетическим барьером ($U_{‡}$) трансформации TETR1 → TETR2 для субстратов типа AcPhe-XNH₂; уходящая группа (X) указана на графике

TETR1 → TETR2 у производного AcPhe-GlyNH₂ (рис. 2 а) сопряжен с более глубокими конформационными изменениями по сравнению с производными AcPhe-AlaNH₂ и AcPhe-ValNH₂ (рис. 2б, в); это качественно согласуется с тем, что AcPhe-GlyNH₂ является наихудшим субстратом [5] (табл. 1), хотя в нековалентном комплексе он наиболее подвижен [15].

Итак, сравнительный анализ структур тетраэдрических промежуточных производных однозначно показывает следующее:

1. Кинетическая специфичность субстратов определяется энергетическим барьером ($U_{‡}$) трансформации тетраэдрического производного TETR1 в TETR2; последнее характеризуется значительно меньшим значением угла ω_1 .

2. Механизм протонирования действительно близок к S_N2 (как предположил Бендер [32]), и для переноса протона на амидный N-атом необязательно образование «правильного» тетраэдрического промежуточного соединения. Другими словами, протонирование уходящей группы происходит на предстационарной стадии, до завершения нуклеофильной атаки.

3. Протонирование определяется не столько ориентацией остатка His57, сколько структурами высокоэнергетических тетраэдрических промежуточных соединений, индивидуальных для каждого субстрата.

К сожалению, эти результаты носят лишь качественный характер, так как в рамках метода молекулярной механики невозможно проследить распределение электронной плотности на этой стадии протеолиза, т.е. динамику протонирования. Только использование эстафетной электронно-конформационной программы [15] позволит не только количественно оценить кинетическую специфичность, но и определить механизм протонирования и роль акцепторной молекулы воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров С. Л., Антонов В. К. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 464—475.
2. Antonov V. K. // Symp. Biol. Hungar. 1978. V. 21. P. 63—78.
3. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dutler H. // FEBS Lett. 1970. V. 8. P. 257—261.
4. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dutler H. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 39. P. 381—391.
5. Bizzozero S. A., Baumann W. K., Dutler H. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 122. P. 251—258.
6. Зинченко А. А., Руми Л. Д., Антонов В. К. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1663—1670.
7. Medzihradsky K., Voinick I. M., Medzihradsky-Schweiger H., Fruton J. S. // Biochemistry. 1970. V. 9. P. 1154—1162.

8. Anderson L. E., Walsh K. A., Neurath H.//Biochemistry. 1977. V. 16. P. 3354—3360.
9. Inagami T., Murakami K.//J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 2978—2983.
10. Proteases in Biological Control/Ed. Cunningham D. D., Loug G. L. N. Y.: Liss, 1987.
11. Антонов В. К., Александров С. Л.//Физико-химические проблемы ферментативного катализа/Ред. Торчинский Ю. М. М.: Наука, 1984. С. 232—241.
12. Antonov V. K., Alexandrov S. L.//Peptides and Proteases: Recent Advances/Eds Schowen R. L., Barth A. N. Y.: Pergamon Press, 1987. P. 265—272.
13. Александров С. Л., Антонов В. К.//Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. С. 1576—1582.
14. Попов Е. М.//Молекулярн. биология. 1977. Т. 11. С. 5—41.
15. Александров С. Л.//Биоорганич. химия. 1994. № 2.
16. Scott R. A., Scheraga H. A.//J. Chem. Phys. 1966. V. 45. P. 2091—2101.
17. Poland D., Scheraga H. A.//Biochemistry. 1967. V. 6. P. 3791—3800.
18. Scheraga H. A.//Adv. Phys. Org. Chem. 1968. V. 6. P. 103—184.
19. Попов Е. М., Дашевский В. Г., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф.//Молекулярн. биология. 1968. Т. 2. С. 612—620.
20. IUPAC—IUB Commission on Biochemical Nomenclature//Biochim. et biophys. acta. 1971. V. 229. P. 1—17.
21. Rinaldi D. QCPE Program N290 («GЕОМО»). Bloomington: Indiana Univ. Press, 1974.
22. Blevins R. A., Tulinsky A.//J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 8865—8872.
23. Tsukada H., Blow D. M.//J. Mol. Biol. 1985. V. 184. P. 703—711.
24. Birkteft J. J., Blow D. M.//J. Mol. Biol. 1972. V. 68. P. 187—240.
25. Huber R., Kukla D., Bode W., Schwager P., Bartels K., Deisenhöfer J., Steigemann W.//J. Mol. Biol. 1974. V. 89. P. 73—101.
26. Липкинд Г. М., Максумов И. С., Касумова Л. И., Попов Е. М.//Биоорганич. химия. 1976. Т. 2. С. 648—654.
27. Marquart M., Walter J., Deisenhöfer J., Bode W., Huber R.//Acta Crystallogr. 1983. V. B39. P. 480—490.
28. Максумов И. С., Липкинд Г. М., Попов Е. М.//Биоорганич. химия. 1976. Т. 2. С. 737—745.
29. Александров С. Л., Антонов В. К.//Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. С. 147—158.
30. Johnson P. E., Stewart J. A., Allen K. G. D.//J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 2353—2362.
31. Максумов И. С., Липкинд Г. М., Попов Е. М.//Биоорганич. химия. 1976. Т. 2. С. 632—647.
32. Komiyama M., Bender M. L.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 557—560.

Поступила в редакцию
15.VI.1993

S. L. Alexandrov

**THEORETICAL ASPECTS OF THE PROTEOLYTIC
ENZYMES ACTION MECHANISM.
V. C-TERMINAL SPECIFICITY OF SERINE PROTEASES**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Tetrahedral intermediates of the α -chymotrypsin acylation by N-protected amide dipeptide substrates having different leaving groups were analyzed by means of the molecular mechanic method. A predominant role of the C-terminal interactions in the leaving group protonation and in the development of a kinetic specificity was determined. The kinetic specificity of serine proteases was shown to be controlled by the transformation of various forms of tetrahedral substrate intermediates at the presteady stage.