



УДК 577.152.344.042.2:548.737

РАСПОЛОЖЕНИЕ МОЛЕКУЛ ЭТАНОЛА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ПЕПСИНА

Гущина А. Е., Андреева Н. С.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Антонов В. Е.

Институт биоорганической химии Академии наук СССР, Москва

Изучение трехмерной структуры фермента пепсина методом рентгеноструктурного анализа проводилось на кристаллах, полученных из 20% раствора этанола. Анализ карт электронной плотности, полученных после уточнения структуры пепсина с разрешением 2 Å, показал, что в активном центре фермента находятся молекулы этанола. Расположение молекул этанола вблизи активных групп фермента позволяет объяснить его ингибирующие свойства.

В последние годы методами рентгеноструктурного анализа определены трехмерные структуры высокого разрешения для ряда ферментов, принадлежащих к классу аспартатных протеиназ [1–4]. Оказалось, что эти ферменты обладают очень сходным строением, так же, как, например, ферменты, принадлежащие к классу сериновых протеиназ*. Однако детальное сравнение трехмерных структур аспартатных протеиназ обнаружило некоторые тонкие различия в строении их активных центров. Так как в каждом конкретном случае исследователи работали с кристаллами фермента, полученными при разных значениях pH и из различных растворов, можно предположить, что тонкие различия в структурах активных центров частично связаны с условиями кристаллизации этих ферментов.

Объектом наших исследований был фермент пепсин, кристаллы которого выращивались из 20% раствора этилового спирта при pH 2 [5].

В работе Танга [6] по исследованию воздействия алифатических спиртов на протеолитическую активность пепсина было показано, что алифатические спирты являются конкурентными ингибиторами пепсина. Из таблицы видно, что ингибирующая способность спиртов возрастает с увеличением длины молекулы спирта. Танг предположил, что метильные

Константы ингибирования пепсина алифатическими спиртами

Спирт	K_i , M	Спирт	K_i , M
MeOH	0,620	Bu ¹ OH	0,026
EtOH	0,240	Bu ² OH	0,044
Pr ⁿ OH	0,091	Am ⁿ OH	0,015
Bu ⁿ OH	0,033	Am ¹ OH	0,017

и метиленовые группы спиртовой молекулы конкурируют с гидрофобными группами субстрата при взаимодействии с ферментом.

В. К. Антоновым [7] исследовалась ингибирующая способность этанола в зависимости от положения гидрофобного остатка аминокислоты в субстрате относительно расщепляемой связи. Оказалось, что этанол действует как конкурентный ингибитор гидролиза Z-Phe(NO₂)-Ala-Arm**

* Сравнение трехмерных структур карбоксильных протеиназ выполнено нами в работе, которая будет опубликована отдельно.

** -Arm – 3-морфолинопропиламид.

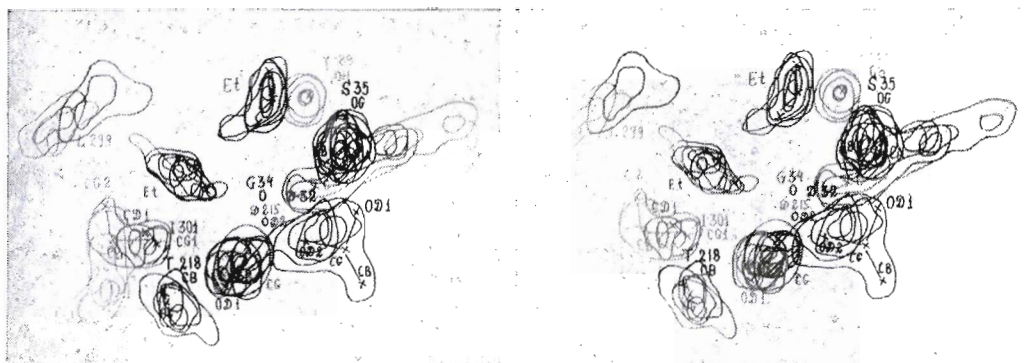


Рис. 1. Сечения электронной плотности пепсина в области активного центра

и как неконкурентный ингибитор гидролиза Z-Ala-Phe(NO₂)-Arg. Авторы предположили, что связывание спирта происходит в S₁-месте, причем, когда в P₁-положении находится остаток аланина, образуется тройной комплекс фермент-этанол-Z-Ala-Phe(NO₂)-Arg.

О расположении спирта вблизи активного центра свидетельствуют и результаты работы [8] по изучению связывания алифатических спиртов аспаратными протеиназами с помощью флуоресцентной метки, в качестве которой использовались соединения Zn-PAD — цинк(II)-(2-пиридино)азо-*n*-диметиланилин и TNS — 2-*n*-толуидинилнафталин-6-сульфонат. Согласно [8], пять спиртов (метанол, этанол, *n*-пропанол, *n*-бутанол и *n*-амиловый спирт) вытесняют Zn-PAD из комплекса Zn-PAD-фермент, *n*-амиловый спирт вытесняет TNS-метку из системы TNS-фермент. В работе [9] было показано, что метка Zn-PAD связывается в активном центре фермента, причем атом цинка Zn²⁺ координируется двумя каталитическими остатками аспарагиновых кислот. На основании всех этих данных, а также учитывая, что даже такая маленькая молекула спирта, как метанол, вытесняет Zn-PAD из комплекса Zn-PAD-фермент, авторы статьи высказывают предположение, что гидроксильная группа спиртов связывается очень близко к каталитическому участку фермента и может, таким образом, вытеснить метку Zn-PAD. При исследовании связывания пепстатина пепсином, содержащим флуоресцентную метку TNS [10], оказалось, что этанол, как и пепстатин, вытесняет TNS из комплекса пепсин-TNS, связываясь с ферментом.

Так как исследуемые нами кристаллы пепсина выращивались из ~5 М раствора этилового спирта, можно было ожидать, что в активном центре пепсина присутствует по крайней мере одна молекула этанола. И действительно, на всех картах электронной плотности пепсина, начиная с синтезов, построенных по изоморфным фазам с разрешением 3 Å, включая все синтезы, рассчитывавшиеся на различных этапах уточнения* по расчетным фазам и с коэффициентами $|2F_{obs} - F_{calc}|$ в активном центре пепсина, вблизи каталитически активных остатков аспарагиновых кислот всегда наблюдалась дополнительная электронная плотность, не относящаяся к молекуле белка (рис. 1). Интерпретация этой дополнительной плотности на разностных синтезах Фурье, построенных на заключительных этапах уточнения структуры пепсина с разрешением 2 Å по расчетным фазам и с коэффициентами $|2F_{obs} - F_{calc}|$, позволила разместить молекулы этанола в активном центре фермента (рис. 2).

Все молекулы расположены вблизи активных остатков аспарагиновых кислот. Две молекулы расположены в непосредственной близости друг от друга, и их метильные и метиленовые группы находятся на расстоянии, удобном для стабилизации их взаимного расположения с помощью гидрофобных взаимодействий. Гидроксильная группа первой молекулы располо-

* Работа по уточнению структуры пепсина с разрешением 2 Å выполнялась А. С. Ждановым [11].

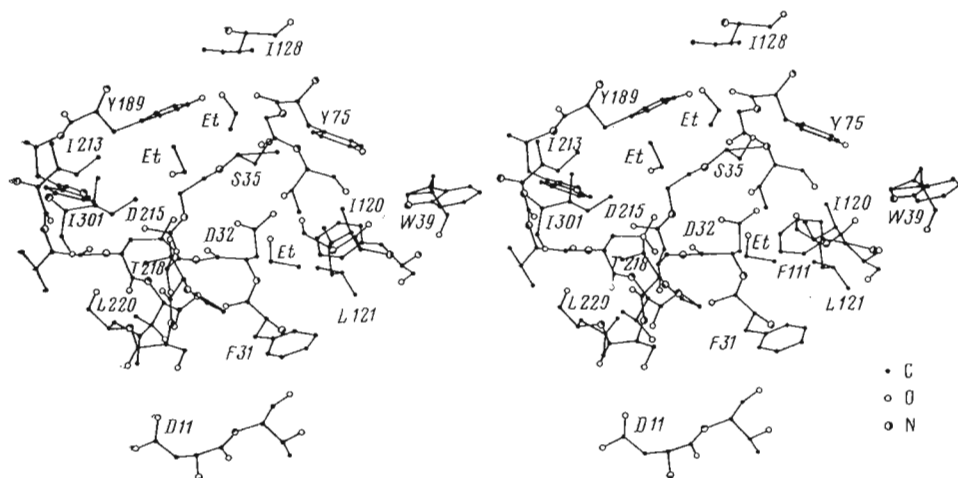


Рис. 2. Стереοизображение расположения трех молекул этанола в активном центре пепсина

жена на расстоянии, благоприятном для образования водородной связи ($\sim 2,8$ Å) от атома кислорода OD2 остатка Asp²¹⁵. Гидроксильная группа соседней молекулы спирта расположена примерно на таком же расстоянии от остатка Tyr¹⁸⁹. Кроме того, первая молекула этанола находится на расстоянии, удобном для гидрофобных взаимодействий с боковой цепью остатка Ile³⁰¹. Еще одна молекула этанола располагается по другую сторону от линии, соединяющей остатки каталитически активных аспарагиновых кислот. Ее гидроксильная группа находится на расстоянии, удобном для образования водородной связи между ним и молекулой воды, которая в свою очередь образует водородную связь с атомом OD2 остатка Asp³². Гидрофобная часть спиртовой молекулы находится вблизи боковой цепи остатка Ile¹²⁰ на расстоянии, благоприятном для образования гидрофобного контакта между этими группами.

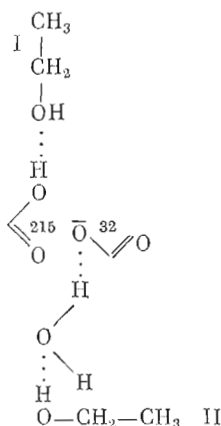
В результате уточнения трехмерной структуры пенициллопепсина с разрешением 1,8 Å Джеймсу и др. [2] удалось локализовать 319 молекул воды в молекуле фермента. Одна из молекул воды находится вблизи активных остатков аспарагиновых кислот и, образуя две водородные связи с двумя атомами кислорода остатка Asp²¹⁵ и водородную связь с одним из атомов кислорода остатка Asp³², играет важную роль и в стабилизации конформации активных остатков аспарагиновых кислот, и, по-видимому, в функционировании фермента. Активные остатки аспарагиновых кислот в пенициллопепсине находятся на расстоянии 2,87 Å, обеспечивая тем самым возможность образования водородной связи между сближенными кислородными атомами [2].

Результаты уточнения трехмерной структуры пепсина с разрешением 2 Å (*R*-фактор 29%) [11] показали, что расстояние между ближайшими атомами кислорода остатков Asp³² и Asp²¹⁵ несколько превышает величину, допускающую возможность образования водородной связи между ними. Одна из молекул воды в активном центре фермента, расположенная вблизи активных групп, может образовывать водородную связь с атомом кислорода Asp³², а от атомов кислорода остатка Asp²¹⁵ находится на более далеком расстоянии.

Высокая степень гомологии трехмерных структур пепсина и других карбоксильных протеиназ позволяет предположить, что разница в окружении и взаимном расположении остатков Asp³² и Asp²¹⁵ в этих структурах связана с тем, что при определении структуры пепсина мы работали с ферментом, в активном центре которого находятся молекулы этанола. Ингибирующее действие этанола можно объяснить, исходя из расположения его молекул в активном центре фермента. Предполагаемая схема взаимодействия молекул этанола I и II с активными группами составлена на основе существующих представлений о разных значениях *pK* двух актив-

ных остатков аспарагиновых кислот, а также с учетом того, что спирт в водных растворах, образуя водородные связи, может быть как донором, так и акцентором протона [12].

Схема связывания молекул этанола I и II вблизи активных остатков Asp²¹⁵ и Asp³²



Образование водородной связи первой молекулы этанола с OD2 остатка Asp²¹⁵ уменьшает вероятность образования водородной связи этого атома с OD2 атомом остатка Asp³², что должно приводить к увеличению расстояния между атомами кислорода каталитических активных остатков аспарагиновых кислот. Связывание второй молекулы этанола через молекулу воды с атомом OD2 остатка Asp³² еще более уменьшает возможность образования водородной связи между атомами OD2 остатков Asp³² и Asp²¹⁵, частично погашая отрицательный заряд на атоме OD2 остатка Asp³². Однако непосредственный контакт первой молекулы спирта (I) с Asp²¹⁵, а также размещение ее у входа в предполагаемый карман S₁ [13, 14], стабилизируемое взаимодействиями гидрофобной части молекулы спирта с гидрофобным остатком Pe³⁰¹, позволяет предположить, что связывание молекулы этанола I сильнее отражается на состоянии фермента. Это предположение хорошо согласуется с данными В. К. Антонова [7]. По-видимому, субстрат Z-Phe(NO₂)-Ala-Arm конкурирует с этанолом, вытесняя своей ароматической группой связанную молекулу спирта II и своей метильной группой молекулу спирта I, расположенную непосредственно у входа в предполагаемый карман S₁' (рис. 3). Субстрат Z-Ala-Phe(NO₂)-Arm, в отношении которого этанол является некокурентным ингибитором, не может вытеснить молекулу спирта II боковой цепью аланилового остатка, но, вероятно, может вытеснить молекулу I своей ароматической группой в положении P₁'. В результате этот субстрат образует с пепсином и молекулой этанола II тройной комплекс, в котором каталитические функции остатка Asp³² ослаблены за счет взаимодействия через молекулу воды с гидроксилом спиртовой молекулы. Эта схема подтверждается неспособностью спирта ингибировать гидролиз Z-Phe(NO₂)-Phe-Arm, поскольку в этом случае вытеснение спиртом прочно связывающихся ароматических остатков субстрата в использованных в работе [7] концентрациях невозможно.

Таким образом, при определении трехмерной структуры пепсина мы работали с ферментом, в активном центре которого находятся молекулы этанола. Особенности размещения этих молекул хорошо согласуются с данными Танга [6] о преимущественно гидрофобных белок-спиртовых взаимодействиях, а также с данными В. К. Антонова [7], согласно которым спирт занимает первичные места связывания субстрата. Взаимное расположение гидроксильной группы первой молекулы спирта и атома кислорода OD2 остатка Asp²¹⁵ на расстоянии, удобном для образования водородной связи, не противоречит данным, изложенным в работах [8, 9] по исследованию связывания карбоксильными протеиназами алифатических спиртов с помощью флуоресцентной метки. Так как структура актив-

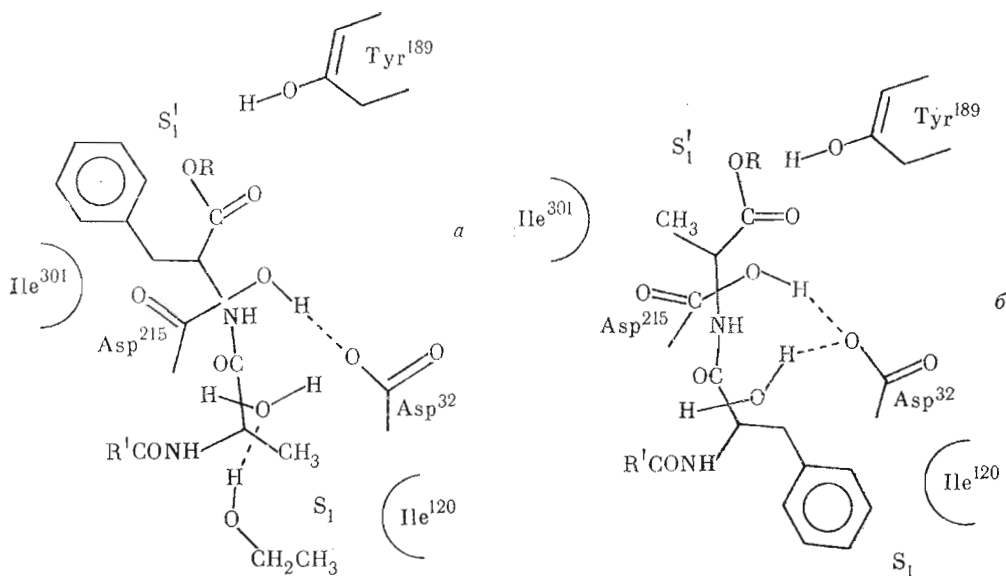


Рис. 3. Схематическое представление комплекса, образованного пепсином с этанолом и субстратами: Z-Ala-Phe(NO₂)-Apm (а) и Z-Phe(NO₂)-Ala-Apm (б)

ного центра пепсина высокомологична структурам активных центров других карбоксильных протеиназ, можно сделать вывод, что ингибирующее действие спиртовых молекул не вносит существенных изменений в расположение остатков, формирующих активный центр пепсина, но незначительно меняет непосредственное окружение и взаимное расположение каталитически активных остатков аспарагиновых кислот.

Авторы выражают благодарность В. Б. Журкину и Ю. П. Лысову за помощь в получении стереоизображения активного центра пепсина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Н. С., Федоров А. А., Гущина А. Е., Рискулов Р. Р., Шуцкевер Н. Е., Сафро М. Г. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 4, с. 922-935.
2. James M. N. G., Sielecki A. J. Mol. Biol., 1983, v. 163, № 2, p. 299-361.
3. Subramanian E., Liu M., Davies D. R. Adv. Exptl Med. and Biol., 1977, v. 95, p. 33-43.
4. Jenkins J. A., Tickle I. J., Sewell T., Ungaretty L., Wollmer A., Blundell T. L. Adv. Exptl Med. and Biol., 1977, v. 95, p. 43-59.
5. Бакулина В. М., Борисов В. В., Мелик-Адамян В. Р., Шуцкевер Н. Е., Андреева Н. С. Кристаллография, 1968, т. 13, № 1, с. 44-48.
6. Tang J. J. Biol. Chem., 1965, v. 240, № 10, p. 3810-3815.
7. Antonov V. K. Adv. Exptl Med. and Biol., 1977, v. 95, p. 179-198.
8. Nakatani H., Kitagishi K., Hiromi K. J. Biochem., 1980, v. 87, № 2, p. 563-571.
9. Nakatani H., Hiromi K., Satoi S., Oda K., Murao S., Ichishima E. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 391, № 2, p. 415-421.
10. Kitagishi K., Nakatani H., Hiromi K. J. Biochem., 1980, v. 87, № 2, p. 573-579.
11. Жданов А. С., Андреева Н. С. Докл. АН СССР, 1983, т. 272, № 1, с. 109-112.
12. Jorgensen W. L., Madura J. D. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 6, p. 1407-1413.
13. James M. N. G., Sielecki A. R., Salituro F., Rich D. H., Hofmann T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 20, p. 6137-6141.
14. Андреева Н. С., Гущина А. Е., Федоров А. А. Докл. АН СССР, 1981, т. 259, № 5, с. 1261-1264.

Поступила в редакцию
18.VII.1983

ARRANGEMENT OF ETHANOL MOLECULES IN THE ACTIVE SITE OF PEPSIN

GUSTCHINA A. E., ANDREEVA N. S., ANTONOV V. K.
[Institute of Molecular Biology and M. M. Shemyakin Institute]
of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow]

During the refinement of the pepsin structure at 2 Å resolution the solvent molecules present in the crystals were taken into account. As it turned out, some of them were ethanol molecules bound to the protein in the active site region (ethanol was used as precipitating agent for crystallisation). The presence of ethanol molecules in this region may explain its inhibitory properties.