



УДК 577.156.3.02 : 541.63

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НЕВАЛЕНТНЫХ  
КОМПЛЕКСОВ  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА С МЕТИЛАМИДОМ  
N-АЦЕТИЛ-*L*-ТРИПТОФАНА И N-АЦЕТИЛ-*L*-  
-АЛАНИЛ-*L*-АЛАНИЛ-*L*-ТРИПТОФАНИЛ-*L*-АЛАНИНОМ

Диркин Г. М., Максумов И. С., Попов Е. М.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

На основе теоретического анализа изучены конформационные аспекты взаимодействия  $\alpha$ -химотрипсина с метиламидом N-ацетил-*L*-триптофана и N-ацетил-*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-триптофанил-*L*-аланином. Показано, что продуктивное связывание субстрата осуществляется только в самой низкоэнергетической конформации комплекса. Рассмотрена зависимость положения боковой цепи остатка Ser<sup>195</sup> от ориентации расщепляемой группы.

Для эффективного каталитического действия  $\alpha$ -химотрипсина важное значение имеет стереохимическая комплементарность субстрата и соответствующих участков связывания активного центра [1—7]. Ранее [8] в качестве первого шага в изучении невалентных комплексов нами было рассмотрено взаимодействие N-формил-*L*-триптофана с  $\alpha$ -химотрипсином, моделирующее главным образом связывание центрального ароматического остатка субстрата  $P_1$  с участком  $S_1$  фермента\*. Следующий шаг в этом направлении заключается в изучении невалентного связывания с  $\alpha$ -химотрипсином субстратов, приближающихся по своей сложности к природным. Здесь представляется важным прежде всего выяснить конформационные и энергетические параметры продуктивного фермент-субстратного комплекса, а также оценить роль ряда специфических взаимодействий — образование антипараллельной  $\beta$ -структуры между остатками  $P_1$  —  $P_3$  субстрата и Ser<sup>214</sup> — Gly<sup>216</sup> фермента [10, 11], взаимодействие отходящей группы с остатками активного центра [5, 7] и др.

Для решения этих задач мы исследовали невалентные комплексы  $\alpha$ -химотрипсина с метиламидом N-ацетил-*L*-триптофана и N-ацетил-*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-триптофанил-*L*-аланином. Первый комплекс позволяет рассмотреть все конформационные возможности центрального остатка  $P_1$  в поле белка и выделить продуктивные расположения расщепляемой группы, а второй — проанализировать наиболее важные взаимодействия между участками  $P_3$  —  $P_1'$  субстрата и  $S_3$  —  $S_1'$  фермента. При связывании природных субстратов с  $\alpha$ -химотрипсином практически все контакты осуществляются в пределах тетрапептидного фрагмента  $P_3$  —  $P_1'$  (см. табл. 2 в работе [12]). Основное внимание в данном сообщении, как и в исследовании комплекса  $\alpha$ -химотрипсина с N-формил-*L*-триптофаном [8], уделено взаимодействию фермента с основной цепью субстрата, т. е. вто-

\* Для обозначения взаимодействующих между собой остатков субстрата и фермента используется номенклатура Шехтера и Бергера [9].

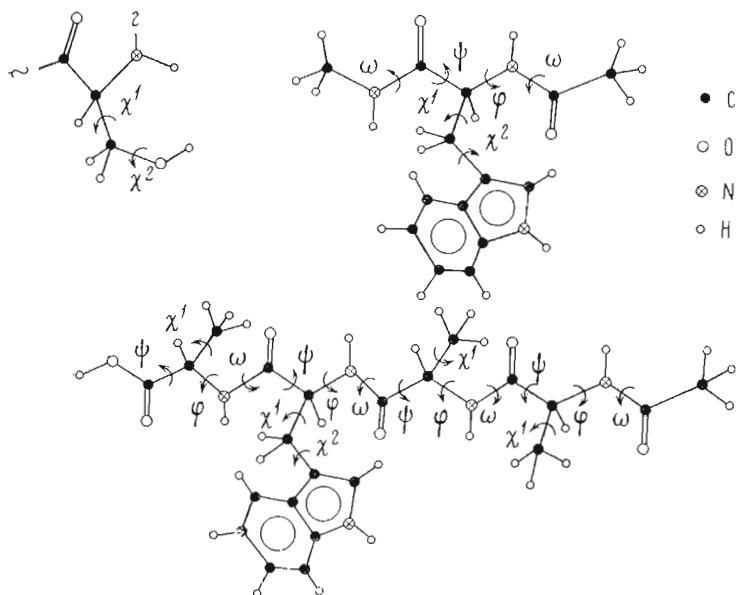


Рис. 1. Расчетные модели метиламида N-ацетил-L-триптофана, N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофанил-L-аланина и -Ser<sup>195</sup>  $\alpha$ -химотрипсина

ричной специфичности. Природа первичной специфичности  $\alpha$ -химотрипсина была рассмотрена нами в работе [13].

*Расчетная модель и потенциальные функции.* На рис. 1 приведены модели рассматриваемых субстратов и остатка Ser<sup>195</sup> активного центра и отмечены принятые в расчете в качестве переменных конформационные параметры. Отсчет двугранных углов производился согласно стандартной номенклатуре [14]. Индолное кольцо остатка P<sub>1</sub> жестко фиксировалось в гидрофобном кармане в соответствии с координатами атомов, приведенными в работе [15]. Для геометрии остальной части субстратов были использованы усредненные параметры пептидов [16]. В расчете принимались во внимание те остатки  $\alpha$ -химотрипсина, которые, согласно рентгеноструктурным исследованиям ряда ингибиторных комплексов [10—12, 17—19], могут образовывать достаточно близкие контакты с субстратом. В случае N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофанил-L-аланина к ним относятся остатки 35, 39—43, 55—60, 94, 96—102, 142, 143, 189—197, 212—222, 224—228, а в случае метиламида N-ацетил-L-триптофана — 57, 102, 189—195, 213—220, 226. Атомы активного центра фиксировались в положениях, отвечающих координатам, приведенным в работе Биркгофта и Блоу [19]. Для -Ser<sup>195</sup>, являющегося наиболее лабильным остатком активного центра, допускалась свобода движения в боковой цепи. Положения атомов водорода фермента найдены на основе координат атомов C, N, O, S и простейших стереохимических правил.

Потенциальная энергия невалентных взаимодействий оценивалась по потенциалу Леннарда — Джонса с параметризацией Скотта и Шераги [20], а электростатических взаимодействий — по закону Кулона с зарядами на атомах, предложенными в работе [21] при значении диэлектрической проницаемости  $\epsilon = 4$ , что соответствует слабой полярности среды в области контактов активного центра с субстратом. Торсионные потенциалы, описывающие вращения вокруг связей субстрата и боковой цепи -Ser<sup>195</sup>, взяты из обзора Шераги [22]. Водородные связи описывались потенциалом типа Морзе [23] с оптимальным значением энергии связи, равным 1,5 ккал/моль. Отсчет энергий производился по абсолютной шкале.

## Обсуждение результатов расчета

### Комплекс $\alpha$ -химо-трипсина с метиламидом *N*-ацетил-*L*-триптофана.

При рассмотрении невалентного комплекса  $\alpha$ -химо-трипсина с *N*-формил-*L*-триптофаном [8] было найдено три набора значений углов  $\chi^1, \chi^2$ , допустимых для боковой цепи-Trp(-70, -50; -70, 0; 80, -50°). В связи с этим поиск исходных для оптимизации положений основной цепи метиламида *N*-ацетил-*L*-триптофана был начат с построения конформационных карт  $\varphi - \psi$  для каждой из указанных выше пар углов  $\chi^1, \chi^2$ . Затем, при фиксации основной цепи в низкоэнергетических на картах  $\varphi - \psi$  конформациях, уточнялись значения  $\chi^1, \chi^2$  путем построения карт  $\chi^1 - \chi^2$ . При появлении на поверхности  $\chi^1 - \chi^2$  нового минимума строили дополнительно карту  $\varphi - \psi$  и находили соответствующую ему ориентацию основной цепи. Карты строили с шагом в 30°, а в областях низкой энергии — 6°. Боковая цепь -Ser<sup>195</sup> при этом отвечала пассивному положению [19].

На рис. 2 приведены конформационные карты, построенные для варианта  $\chi^1 - 70, \chi^2 - 50^\circ$ . На карте  $\varphi - \psi$  (рис. 2, а) имеются две области низкой энергии с минимумами при  $\varphi - 108, \psi 168^\circ$  и  $\varphi - 78, \psi 48^\circ$ . На соответствующих им сечениях  $\chi^1 - \chi^2$  (рис. 2, б, в) обнаруживаются четыре попарно сближенных минимума  $\chi^1 - 72, \chi^2 - 30^\circ$  (рис. 2, б) и  $\chi^1 - 84, \chi^2 - 42^\circ$  (рис. 2, в) и  $\chi^1 90, \chi^2 - 36^\circ$  (рис. 2, б) и  $\chi^1 78, \chi^2 - 42^\circ$  (рис. 2, в). Для более низкоэнергетического варианта  $\chi^1 78, \chi^2 - 42^\circ$  второй пары была вновь построена карта  $\varphi - \psi$  (рис. 2, з). Из этой карты следует еще одна конформация ( $\varphi - 150, \psi 30^\circ$ ) основной цепи субстрата. Найденные таким образом приближения минимизировались с допущением вращения боковой цепи -Ser<sup>195</sup> вокруг связей  $C^\alpha - C^\beta, C^\beta - O^\gamma$ .

Как видно из табл. 1, из пяти возможных конформаций метиламида *N*-ацетил-*L*-триптофана только  $B_1$  и  $R_1$  представляют интерес, поскольку остальные непродуктивны. Так, в конформации  $B_2$  к атому N<sup>ε2</sup> (57) направлен кислород карбонильной группы субстрата, что делает невозможным протонирование отходящей группы, а в  $B_3$  к остатку Ser<sup>195</sup> обращена не метиламидная, а *N*-ацетильная группа, т. е. непродуктивно ориентирована вся основная цепь субстрата. В конформации  $L$  угол  $\varphi 65^\circ$  исключает возможность образования  $\beta$ -структуры между ферментом и удлиненной *N*-концевой частью субстрата. Конформации  $B_2, B_3, L$  малореальны также вследствие высоких значений энергий. Самые низкоэнергетические конформации  $B_1$  и  $R_1$  соответствуют по существу двум подминимумам одной потенциальной ямы. В конформации  $B_1$  карбонильная группа триптофана направлена в сторону амидных протонов остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup>, однако при этом она образует лишь одну слабую водородную связь с -Gly<sup>193</sup> на расстоянии O . . . H 2,7 Å. Боковая цепь -Ser<sup>195</sup> не сохраняет своего пассивного положения и повернута примерно на 100°. В новом положении орбиталь неподеленной пары электронов атома O<sup>γ</sup> (195) ориентирована приблизительно перпендикулярно плоскости расщепляемой группы, а атом O<sup>γ</sup> располагается на расстоянии 2,8 Å от атакующего углерода.

Таблица 1

Геометрические и энергетические параметры оптимальных форм метиламида *N*-ацетил-*L*-триптофана и боковой цепи -Ser<sup>195</sup> в активном центре  $\alpha$ -химо-трипсина

Параметр	$B_1$					Параметр	$R_1$				
	$B_1$	$B_2$	$B_3$	$L$	$B_1$		$B_2$	$B_3$	$L$		
$\varphi$ , град	-107	-135	-140	-154	65	$\omega^2$	178	-179	176	177	178
$\psi$	-5	22	163	40	9	$\chi_{195}^1$	-10	-5	12	3	-12
$\chi^1$	-68	-78	-79	86	-71	$\chi_{195}^2$	107	118	135	134	103
$\chi^2$	-7	-30	-31	-37	-15	$U$ , ккал/моль	-1,7	-2,1	1,3	2,7	8,4
$\omega^1$	180	179	176	170	177						

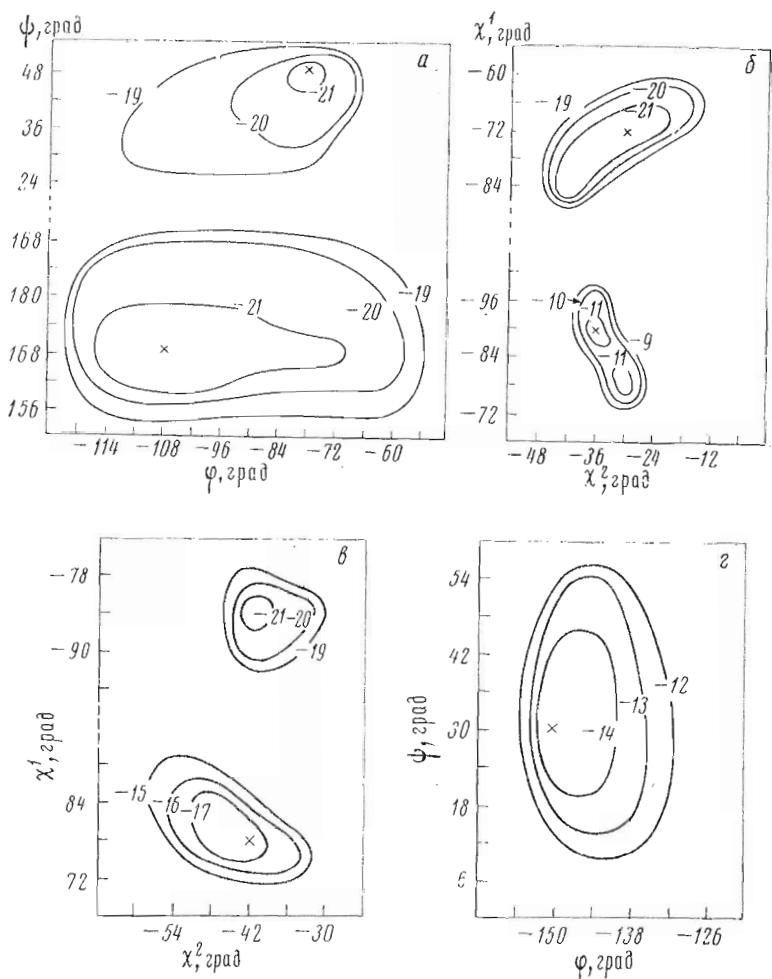


Рис. 2. Области низкой энергии на сечениях  $\psi - \psi$  при  $\chi^1 = -70$  и  $\chi^2 = -50^\circ$  (а),  $\chi^2 = \chi^1$  при  $\psi = -105$  и  $\psi = 168^\circ$  (б),  $\chi^2 = \chi^1$  при  $\psi = -78$  и  $\psi = 48^\circ$  (в),  $\psi = \psi$  при  $\chi^1 = -78$  и  $\chi^2 = -42^\circ$  (г) потенциальной поверхности метиламида N-ацетил-L-триптофана в комплексе с  $\alpha$ -хитотрипсином

Положение азота отходящей группы в конформации  $B_1$  вполне допускает его протонирование имидазольным кольцом -His<sup>-57</sup> при образовании тетраэдрического аддукта [24].

N-Ацетиламидная группа субстрата предрасположена к образованию водородной связи с карбонилем остатка Ser<sup>214</sup>. Таким образом, самое оптимальное связывание субстрата является одновременно продуктивным. Сопутствующие образованию невалентного комплекса движения боковых цепей -Ser<sup>-195</sup> и -His<sup>-57</sup> создают необходимые стерические условия для последующей стадии катализа.

Геометрические параметры конформации  $B_1$  близки параметрам самой выгодной конформации  $R_1$  N-формил-L-триптофана в комплексе с  $\alpha$ -хитотрипсином (ср. табл. 1 с табл. 3 в [8]). Наибольшее различие ( $\sim 40^\circ$ ) наблюдается для угла  $\psi$ . Однако это несущественно, поскольку изменение угла  $\psi$  в случае N-формил-L-триптофана от  $-40$  до  $40^\circ$  может осуществляться свободно, т. е. без значительного увеличения энергии. Таким образом, конформации  $R_1$  и  $B_1$  метиламида N-ацетил-L-триптофана и  $R_1$  N-формил-L-триптофана отвечают одному минимуму на потенциальной поверхности связывания ферментом. Важно то, что двугранные углы метиламида N-ацетил-L-триптофана в конформации  $B_1$  соответствуют низкоэнергети-

Оптимальные положения атома O<sup>γ</sup> боковой цепи -Ser-<sup>195</sup> при различных ориентациях расщепляемой группы в продуктивных комплексах α-химоотрипсина с метиламидом N-ацетил-L-триптофана

Двугранные углы, град				Расстояние O <sup>γ</sup> (195) → C' (P <sub>1</sub> ), Å	Двугранные углы, град				Расстояние O <sup>γ</sup> (195) → C' (P <sub>1</sub> ), Å
χ <sup>2</sup>	χ <sup>1</sup>	ψ	χ <sup>1</sup> <sub>195</sub>		χ <sup>2</sup>	χ <sup>1</sup>	ψ	χ <sup>1</sup> <sub>195</sub>	
-40	-92	20	3	3,0	-30	-77	40	-21	2,9
-20	-92	20	1	3,0	-40	-62	20	-23	2,9
-30	-77	20	-4	2,8	-30	-62	20	-28	2,8
-30	-62	0	-6	2,8	-20	-62	20	-35	3,0
-40	-77	40	-14	2,8					

ческим областям на сечениях потенциальной поверхности свободной молекулы [25, 26], т. е. комплексообразование не вызывает значительного напряжения ни в субстрате, ни в ферменте. К такому же выводу приходят и авторы работ [27, 28].

Продуктивная ориентация гидролизуемой связи меняется при сорбции в активном центре различных субстратов в зависимости от природы остатков P<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>', P<sub>2</sub>' . . . Мы рассмотрели поведение боковой цепи -Ser-<sup>195</sup> при отклонении расщепляемой группы от конформации, наблюдаемой для метиламида N-ацетил-L-триптофана. С этой целью субстрат фиксировался в нескольких конформациях, отличающихся от B<sub>1</sub> по углу χ<sup>2</sup> на ±10°, по углу χ<sup>1</sup> на ±15° и по углу ψ на ±20°, и для каждой из них проводилась оптимизация положения боковой цепи остатка Ser<sup>195</sup>. Из анализа результатов этой процедуры (табл. 2) следует, что гидроксильная группа серина каждый раз занимает оптимальное положение для атаки на углерод карбоксильной группы субстрата. Аналогичной возможностью обладает также имидазольное кольцо -His-<sup>57</sup> [24].

Комплекс α-химоотрипсина с N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофаном. При рассмотрении комплексов α-химоотрипсина с истинным субстратом прежде всего была выяснена предложенная Сегалем и соавт. [10] конформация, которая обеспечивает образование антипараллельной β-структуры между остатками P<sub>1</sub> — P<sub>3</sub> и Ser<sup>214</sup> — Gly<sup>216</sup>. Такая структура реализуется также в модельном комплексе α-химоотрипсина [12] и тетраэдрических аддуктах трипсина с ингибиторами из поджелудочной железы быка (PTI) и соевых бобов (STI) [29—32]. Поиск конформации субстрата, приводящей к образованию β-структуры, проведен путем последовательного увеличения цепи субстрата с N-конца остатка P<sub>1</sub> и анализа геометрии водородных связей и энергии комплекса на каждом шаге. На рис. 3, а — г приведены зависимости энергий комплекса и расстояний между атомами, образующими водородные связи, от углов вращения. На основании конформационных карт χ<sup>1</sup> — χ<sup>2</sup> (рис. 3, а) и φ (P<sub>1</sub>) (рис. 3, б), построенных для метиламида N-ацетил-L-триптофана, в дальнейшем анализе углы χ<sup>1</sup>, χ<sup>2</sup> и φ фиксировались соответственно при значениях -90, -30 и -90°. На рис. 3, в, г приведены аналогичные карты ψ — φ (P<sub>2</sub>) и ψ — φ (P<sub>3</sub>) для комплекса α-химоотрипсина с метиламидом N-ацетил-L-аланил-L-триптофана и с метиламидом N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофана. Угол φ (P<sub>1</sub>) при построении карт фиксировался при оптимальном значении 22°, найденном выше для метиламида N-ацетил-L-триптофана, а боковая цепь -Ser-<sup>195</sup> закреплялась в нативном положении [19].

Двугранные углы остатков P<sub>1</sub> (χ<sup>1</sup> -90°, χ<sup>2</sup> -30°, φ -90°), P<sub>2</sub> (φ -30°, ψ 120°) и P<sub>3</sub> (φ -180°, ψ -150°) составили нулевое приближение β-структурной конформации для последующей минимизации энергии (рис. 3, а — г). Как видно из табл. 3, рассчитанные и экспериментальные значения длин водородных связей между остатками P<sub>1</sub> — P<sub>3</sub> и Ser<sup>214</sup> — Gly<sup>216</sup> находятся в хорошем согласии. Водородная связь между (P<sub>1</sub>)NH и (214)

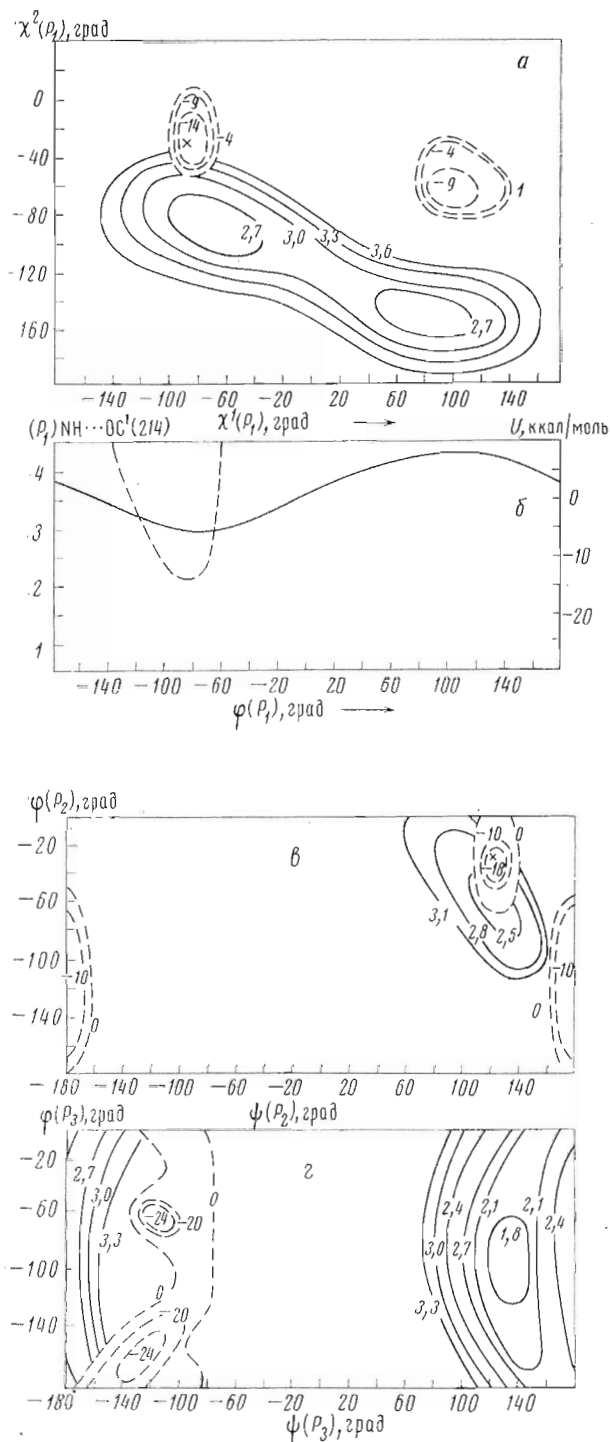


Рис. 3. Зависимости энергий и расстояний  $(P_1) N \dots OC'$  (214) от углов  $\chi^2, \chi^1(P_1)$  (a),  $(P_1) NH \dots OC'$  (214) от угла  $\varphi(P_1)$  (б),  $(P_3) C'O \dots NH$  (216) от углов  $\psi, \varphi(P_2)$  (в),  $(P_3) NH \dots OC'$  (216) от углов  $\psi, \varphi(P_3)$  (г) в комплексе N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофанил-L-аланина с  $\alpha$ -химотрипсином. Изоэнергетические контуры показаны пунктиром

Расчетные и экспериментальные значения расстояний между атомами субстрата (ингибитора) и активного центра  $\alpha$ -химотрипсина (трипсина)

Контакты	Расстояния			
	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	<i>г</i>
( $P_1$ )NH . . . OC'(214)	2,8	2,6	2,3	2,2
( $P_3$ )C'O . . . HN(216)	2,5	2,2	2,3	2,3
( $P_3$ )NH . . . OC'(216)	2,5	—	—	—
( $P_1$ )C'O . . . HN(193)	2,5	2,6	1,7	2,0
( $P_1$ )C'O . . . HN(195)	3,7	2,0	1,7	2,4
( $P_1$ )C' $\beta$ . . . S $\gamma$ (42)	4,5	4,2		5,1
( $P_1$ )C' $\beta$ . . . C $\delta^2$ (57)	3,7	3,8		4,0
( $P_1$ )C' $\beta$ . . . N $\epsilon^2$ (57)	3,6	3,7		4,0
( $P_1$ )C'O . . . C $\alpha$ (192)	4,5	3,9		3,5
( $P_1$ )C'O . . . C $\beta$ (192)	3,8	3,6		4,0
( $P_1$ )C'O . . . C $\gamma$ (192)	3,9	3,8		5,1

*a* — комплекс N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофанил-L-аланина с  $\alpha$ -химотрипсином (данная работа); *б* — комплекс РТИ с  $\alpha$ -химотрипсином [12]; *в* — комплекс РТИ с трипсином [29]; *г* — комплекс STI с трипсином [32].

C'O, слабая в невалентном комплексе, усиливается в данной структуре по сравнению с комплексами, образуемыми  $\alpha$ -химотрипсином с N-формил-L-триптофаном [8] и метиламидом N-ацетил-L-триптофана. Нечувствительность полученных результатов к потенциалам водородной связи с различной оптимальной энергией (от 1,5 до 5 ккал/моль) означает, что образование водородных связей в  $\beta$ -структуре является следствием, а не причиной комплементарной упаковки остатков  $P_1 - P_3$  субстрата на участке Gly<sup>214</sup> — Ser<sup>216</sup> белковой цепи. В обоих рассчитанных нами комплексах расщепляемая группа имеет одинаковое положение; следовательно, образование  $\beta$ -структуры не играет ориентирующей роли. По-видимому, ее роль заключается в дополнительной фиксации субстрата в поле белка, а также в понижении энергии связывания [10].

После определения оптимальной формы N-концевой части субстрата в поле белка нами было рассмотрено взаимодействие активного центра с отходящей группой N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофанил-L-аланина. Результаты кинетического анализа [5, 7] показывают, что взаимодействие активного центра с  $-P_1'$  имеет гидрофобную природу и весьма существенно влияет на скорость реакции. Основываясь на известных структурах  $\alpha$ -химотрипсина и РТИ, Блоу и соавт. [12] предложили форму их связывания, согласно которой боковая цепь остатка  $P_1'$  эффективно контактирует с -Cys-<sup>42</sup> и -His-<sup>57</sup>, а карбонильная группа — с боковой цепью -Met-<sup>192</sup>. Справедливость этого предположения была подтверждена данными рентгеноструктурных исследований тетраэдрических аддуктов трипсина с РТИ и STI [29—32]. Поэтому мы предприняли поиск ориентации отходящей группы, исходя из критерия продуктивного расположения гидролизующей связи и приведенных в работе Блоу и соавт. [12] эффективных контактов. N-концевая часть субстрата фиксировалась в  $\beta$ -структурной конформации, а -Ser-<sup>195</sup> — в нативной [19].

На рис. 4, *a* приведены кривые зависимости расстояний ( $P_1$ )C'O ... HN (193) и ( $P_1$ )C'O . . . HN (195) от угла  $\psi$  ( $P_1$ ) в низкоэнергетической конформации  $\varphi -90^\circ$ ,  $\psi -60^\circ$  остатка  $P_1'$  [33]. Оптимальные значения

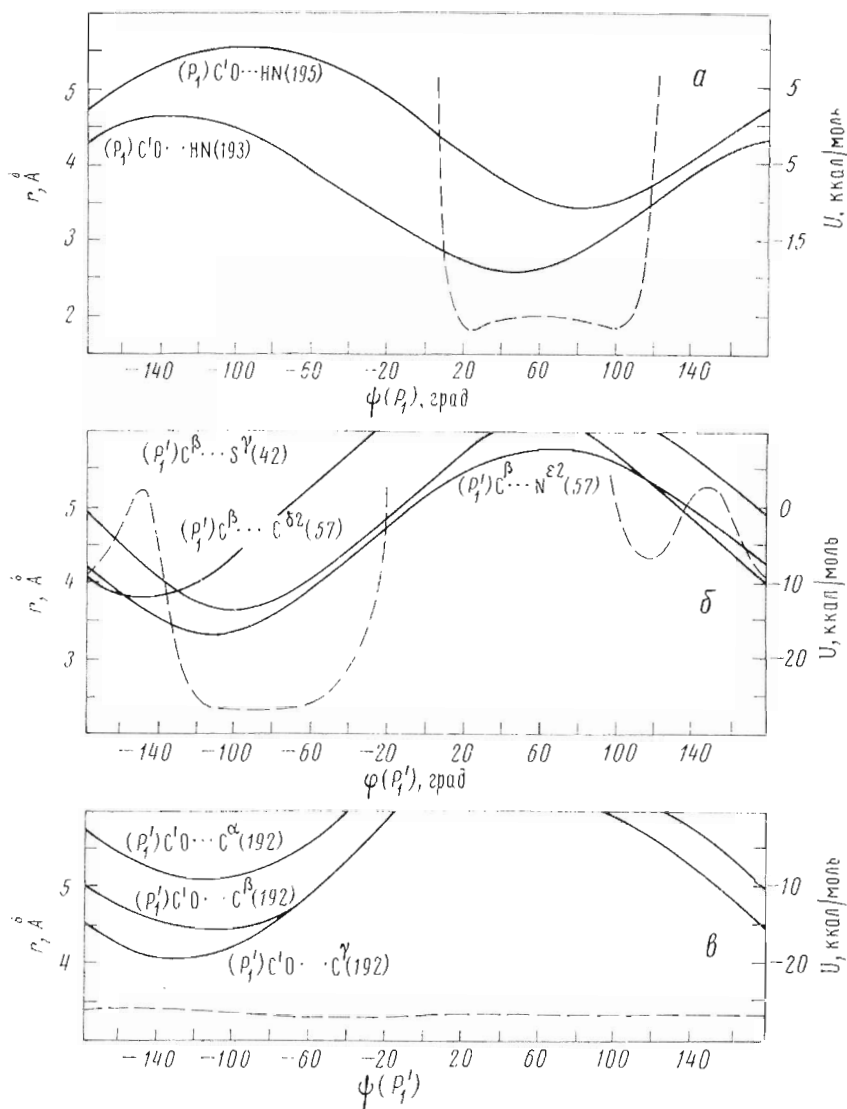


Рис. 4. Зависимости расстояний  $(P_1)C'O \dots HN$  (193) и  $(P_1)C'O \dots \dots HN$  (195) от угла  $\psi$  ( $\psi = -90^\circ$ ,  $\psi = -60^\circ$  остатка  $P_1'$ ) (а),  $(P_1')C^\beta \dots \dots S^\gamma$  (42),  $(P_1')C^\beta \dots \dots C^{\delta 2}$  (57) и  $(P_1')C^\beta \dots \dots N^{\epsilon 2}$  (57) от угла  $\varphi$  ( $P_1'$ )... (б),  $(P_1')C'O \dots \dots C^\alpha$  (192),  $(P_1')C'O \dots \dots C^\beta$  (192) и  $(P_1')C'O \dots \dots C^\gamma$  (192) от угла  $\psi$  ( $P_1'$ ) ( $\psi(P_1) = 30^\circ$ ,  $\varphi(P_1') = -90^\circ$ ) (в) в комплексе N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофанил-L-аланина с  $\alpha$ -химотрипсином. Энергетические зависимости показаны пунктиром

угла  $\psi$  ( $P_1$ ), следующие из условия продуктивной ориентации гидролизуемой связи, находятся в интервале  $30-60^\circ$ , наиболее предпочтительном и по энергии.

Важно отметить, что при изменении угла  $\psi$  ( $P_1$ ) в указанном интервале расстояние между атомами  $C^\alpha(P_1')$  и  $O^\gamma$  (195) превышает  $4\text{Å}$ , поэтому гипотеза Феррита и соавт. [7], согласно которой паталкивание этих атомов в продуктивном комплексе является причиной изменения нативного положения боковой цепи -Ser-195, выглядит неправдоподобной.

Ранее [24] мы показали, что вращение боковой цепи серина происходит спонтанно при вытеснении субстратом молекулы воды, стабилизирующей нативное состояние атома  $O^\gamma$  (195). К допустимым значениям  $\psi$  ( $P_1$ ) близки



Двугранные углы и координаты атомов N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-аланил-L-триптофанил-L-аланина и боковой цепи -Ser-<sup>195</sup> в продуктивном комплексе  $\alpha$ -химотрипсина

Остаток	Двугранные углы, градус				Координаты, Å	Атомы											
	$\varphi$	$\psi$	$\omega$	$\chi^1$		$\chi^2$	H <sup><math>\alpha</math></sup> <sub>1</sub>	H <sup><math>\alpha</math></sup> <sub>2</sub>	H <sup><math>\alpha</math></sup> <sub>3</sub>	C <sup><math>\alpha</math></sup>	C'	O	H <sup><math>\beta</math></sup> <sub>1</sub>	H <sup><math>\beta</math></sup> <sub>2</sub>	H <sup><math>\beta</math></sup> <sub>3</sub>	C'	O
N-Ацетил	—	61	-173	—	—	x	23,9	25,0	23,2	24,0	24,0	24,9					
						y	-0,7	0,3	0,5	0,3	1,4	2,2					
						z	1,0	0,0	-0,2	0,5	1,6	1,7					
P <sub>8</sub> = Ala	173	-155	177	57	—	x	22,1	22,8	22,6	23,3	22,8	23,8	22,7	22,1	21,1	20,6	
						y	0,8	1,5	2,6	2,6	4,0	4,0	4,8	4,1	2,5	1,4	
						z	2,2	2,3	3,2	4,1	2,5	2,1	3,2	1,7	3,7	3,7	
P <sub>2</sub> = Ala	-36	126	-178	60	—	x	21,1	20,6	19,2	19,1	18,6	18,7	19,3	17,9	18,3	18,3	
						y	4,5	3,6	3,7	3,4	5,1	5,7	5,8	5,3	2,8	2,9	
						z	4,2	4,1	4,6	5,6	4,5	3,7	5,0	5,1	3,7	2,5	

Таблица 4 (продолжение)

Остаток	Двугранные углы, град				Координаты, Å	Атом, Å												
	φ	ψ	ω	χ <sup>1</sup>		χ <sup>2</sup>	H	N	C <sup>α</sup>	H <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	H <sup>β</sup> <sub>I</sub>	H <sup>β</sup> <sub>2</sub>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup> <sub>I</sub>	H <sup>δ</sup> <sub>I</sub>	N <sup>ε</sup> <sub>I</sub>	H <sup>ε</sup> <sub>I</sub>
P <sub>1</sub> = Trp	-102	38	176	-86	-32	x	17,6	16,8	17,1	16,9	16,0	17,0	18,1	18,6	18,3	19,5	19,9	
						y	4,8	0,9	0,8	-0,5	-1,1	-0,4	-1,3	-1,2	-0,5	-2,2	-2,6	
						z	5,3	3,6	2,6	4,3	4,0	5,4	3,8	2,5	1,7	2,4	1,4	
							C <sup>ε</sup> <sub>2</sub>	H <sup>ε</sup> <sub>2</sub>	C <sup>γ</sup> <sub>2</sub>	H <sup>γ</sup> <sub>2</sub>	C <sup>ε</sup> <sub>3</sub>	H <sup>ε</sup> <sub>3</sub>	C <sup>δ</sup> <sub>2</sub>	H <sup>δ</sup> <sub>2</sub>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup> <sub>2</sub>	O	
						x	19,9	21,8	20,8	21,6	19,9	19,9	18,9	18,1	18,8	15,3	14,4	
						y	-2,7	-3,8	-3,8	-4,4	-3,5	-3,8	-2,7	-2,5	-2,2	1,3	0,5	
						z	3,7	3,5	5,5	5,9	6,4	7,4	5,8	6,5	4,6	3,7	3,8	
							H	N	C <sup>α</sup>	H <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	H <sup>β</sup> <sub>I</sub>	H <sup>β</sup> <sub>2</sub>	H <sup>β</sup> <sub>3</sub>	O	O	H	
P <sub>1</sub> ' = Ala	-84	-151	180	60	-	x	15,8	13,7	13,0	13,7	14,3	14,0	12,6	13,2	13,6	12,3	12,0	
						y	3,3	3,2	2,6	4,6	5,2	4,6	5,0	3,1	2,2	3,9	3,8	
						z	3,5	3,5	4,1	4,0	3,3	5,0	3,9	2,0	1,3	1,6	0,7	
							C <sup>β</sup>	H <sup>β</sup> <sub>I</sub>	O <sup>γ</sup>	H <sup>γ</sup>								
Ser <sup>195</sup>	-53	144	-176	33	137	x	15,0	15,0	14,3	14,2	16,0	15,0	14,3	14,2	14,2	14,2	14,2	
						y	0,8	1,8	0,7	1,7	0,5	1,8	0,7	1,7	1,7	1,7	1,7	
						z	7,7	8,1	6,4	6,2	7,6	8,1	6,4	6,2	6,2	6,2	6,2	

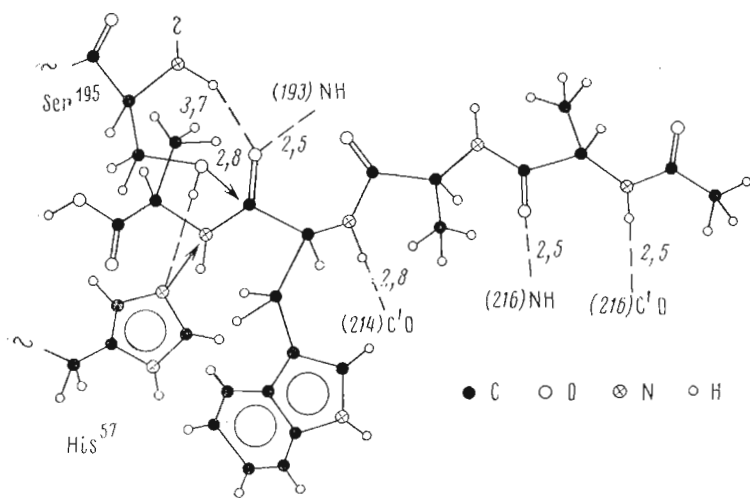


Рис. 5. Продуктивная ориентация N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-триптофанил-L-аланина в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина

значения этого угла в нативной структуре РТИ ( $\psi$  (Lys<sup>15</sup>) = 32°) [30] и в рассмотренном выше метиламиде N-ацетил-L-триптофана ( $\psi$  (Trp) = 22°).

На рис. 4, б при  $\psi$  ( $P_1$ ) 30° приведены зависимости расстояний C<sup>β</sup> ( $P_1'$ ) . . . S<sup>γ</sup> (42), C<sup>δ2</sup> (57) и N<sup>ε2</sup> (57) от угла  $\phi$  ( $P_1'$ ). В интервале -120 ÷ -90° имеет место эффективное взаимодействие указанных атомов в пределах 3—4 Å. Угол  $\phi$  ( $P_1'$ ) = -90° наиболее близок к значению этого угла в РТИ ( $\phi$  (Ala<sup>16</sup>) = -76°) [30]. Поиск контактов карбонильной группы остатка  $P_1'$  с боковой цепью -Met-<sup>192</sup> проведен путем построения сечения  $\psi$  ( $P_1'$ ) при  $\psi$  ( $P_1$ ) = 30° и  $\phi$  ( $P_1'$ ) = -90°. Из найденных зависимостей расстояний O ( $P_1'$ ) . . . C<sup>α</sup> (192), C<sup>β</sup> (192) и C<sup>γ</sup> (192) от угла  $\psi$  ( $P_1'$ ) (рис. 4, в) следует, что пристраемым является интервал изменений  $\psi$  ( $P_1'$ ) от -150 до -120°, причем  $\psi$  ( $P_1'$ ) = -150° более всего близок к экспериментальному значению  $\psi$  (Ala<sup>16</sup>) = -179° в РТИ [30].

Таким образом, для нулевого приближения двугранных углов отходящей группы субстрата были выбраны следующие значения:  $\psi$  ( $P_1$ ) = 30°,  $\phi$  ( $P_1'$ ) = -90°,  $\psi$  ( $P_1'$ ) = -150°. Затем они были уточнены путем вариации с шагом в 10° соответственно в интервалах 30—60, -120 ÷ -90, -150 ÷ -120°, при этом для амидной группы остатка  $P_1$  допускалась возможность деформации ( $\omega$ ) в интервале 150—210°. Как следует из энергетических контуров, показанных на рис. 4, а — в пунктирными линиями, полученное в результате этой процедуры приближение — одно из наиболее предпочтительных по энергии. Оптимизированные контакты отходящей группы субстрата с атомами активного центра  $\alpha$ -химотрипсина приведены в табл. 3. Они близки к экспериментально наблюдаемым. В табл. 4 приведены расчетные параметры субстрата и -Ser-<sup>195</sup>, а на рис. 5 показана его ориентация в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина.

В заключение отметим, что образование комплекса Михаэлиса с  $\alpha$ -химотрипсином происходит таким образом, что только предпочтительная по энергии конформация субстрата в активном центре оказывается продуктивной и вместе с тем одной из низкоэнергетических форм свободного субстрата. Комплексообразование не приводит к появлению неблагоприятных контактов с ферментом. Имеющие место конформационные изменения каталитически активных остатков Ser<sup>195</sup> и His<sup>57</sup> происходят самопроизвольно. Стабилизирующие взаимодействия с субстратом ориентируют их в положениях, необходимых для выполнения каталитической функции.

1. Hein G. E., Niemann C. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4495—4503.
2. Jones J. B., Niemann C. (1962) *Biochemistry*, **1**, 1033—1096.
3. Wolf J. P., Niemann C. (1963) *Biochemistry*, **2**, 493—497.
4. Niemann C. (1964) *Science*, **143**, 1287—1296.
5. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dulter H. (1970) *FEBS Lett.*, **8**, 257—260.
6. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dulter H. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **39**, 381—391.
7. Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2035—2041.
8. Липкинд Г. М., Максумов И. С., Попов Е. М. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 973—983.
9. Schechter I., Berger A. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157—162.
10. Segal D. M., Powers J. C., Cohen G. H., Davies D. R., Wilcox P. E. (1971) *Biochemistry*, **10**, 3728—3738.
11. Segal D. M., Cohen G. H., Davies D. R., Powers J. C., Wilcox P. E. (1972) *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, **36**, 85—90.
12. Blow D. M., Wright C. S., Kukla D., Rühlmann A., Steigemann W., Huber R. (1972) *J. Mol. Biol.*, **69**, 137—144.
13. Максумов И. С., Липкинд Г. М., Попов Е. М. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 632—648.
14. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **229**, 1—17.
15. Platzer K. E. B., Momany F. A., Scheraga H. A. (1972) *Int. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 201—219.
16. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Дашевский В. Г. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 622—630.
17. Steitz T. A., Henderson R., Blow D. M. (1969) *J. Mol. Biol.*, **46**, 337—348.
18. Henderson R. (1970) *J. Mol. Biol.*, **54**, 341—354.
19. Birkoft J. J., Blow D. M. (1972) *J. Mol. Biol.*, **68**, 187—240.
20. Scott R. A., Scheraga H. A. (1966) *J. Chem. Phys.*, **45**, 2091—2101.
21. Poland D., Scheraga H. A. (1967) *Biochemistry*, **6**, 3791—3800.
22. Scheraga H. A. (1968) *Advances Phys. Org. Chem.*, **6**, 103—184.
23. Попов Е. М., Дашевский В. Г., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф. (1968) *Молекулярн. биология*, **2**, 612—620.
24. Максумов И. С., Липкинд Г. М., Попов Е. М. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 737—745.
25. 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.
26. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1970) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 315—322.
27. Gerig J. T. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 2681—2686.
28. Руми Л. Д. (1970) *Канд. дис. «Субстраты  $\alpha$ -химотрипсина с ограниченной конформационной подвижностью»*, М.
29. Rühlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R. (1973) *J. Mol. Biol.*, **77**, 417—436.
30. Huber R., Kukla D., Bode W., Schwager P., Bartels K., Deisenhofer J., Steigemann W. (1974) *J. Mol. Biol.*, **89**, 73—101.
31. Blow D. M., Janin J., Sweet R. M. (1974) *Nature*, **249**, 54—57.
32. Sweet R. M., Wright H. T., Janin J., Chothia C. H., Blow D. M. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4212—4228.
33. Ramachandran G. N., Sasisekharan V. (1968) *Advances Protein Chem.*, **23**, 283—437.

Поступила в редакцию  
30.XII.1975

CONFORMATIONAL ANALYSIS OF  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN NONCOVALENT  
COMPLEXES WITH N-ACETYL-L-TRYPTOPHAN METHYLAMIDE AND WITH  
N-ACETYL-L-ALANYL-L-ALANYL-L-TRYPTOPHANYL-L-ALANINE

■ LIPKIND G. M., MAKUMOV I. S., POPOV E. M.

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

Conformational aspects of  $\alpha$ -chymotrypsin interactions with N-acetyl-L-tryptophan methylamide and with N-acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-tryptophanyl-L-alanine were investigated. The productive binding is shown to take place only in the lowest energy conformation of the complex. The dependence of the -Ser-<sup>195</sup> side chain position on the orientation of a group to be cleaved is discussed.