



УДК 577.156.3.02 : 541.63

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ  
N-АЦЕТИЛ-*L*-ФЕНИЛАЛАНИЛ- И N-АЦЕТИЛ-*L*-  
-ТРИПТОФАНИЛ- $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА

Макумов И. С., Липкин Г. М., Попов Е. М.

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

В рамках механической модели молекулы проведен анализ всех конформационных состояний ацилферментов N-ацетил-*L*-фенилаланил- и N-ацетил-*L*-триптофанил- $\alpha$ -химотрипсина. Показано, что только две конформации субстратной компоненты комплекса продуктивны. В одной сохраняется пассивное положение -Ser<sup>195</sup>-, а основная цепь центрального остатка субстрата имеет форму *B*, в другой боковая цепь -Ser<sup>195</sup>- повернута до положения, совпадающего с экспериментально найденным в ряде ацилферментов, а основная цепь центрального остатка субстрата находится в форме *R*. В субстратной компоненте отсутствуют внутримолекулярные напряжения. Показано, что оптимальная посадка боковой цепи ароматического остатка субстрата в гидрофобный карман  $\alpha$ -химотрипсина автоматически обуславливает продуктивную ориентацию расщепляемой группы.

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

Ранее [1] нами был рассмотрен невалентный комплекс N-формил-*L*-триптофана с  $\alpha$ -химотрипсином и исследовано взаимодействие фермента с простейшей основной цепью субстрата. В данном сообщении изложены результаты исследования конформационных состояний субстратных компонент N-ацетил-*L*-фенилаланил- и N-ацетил-*L*-триптофанил- $\alpha$ -химотрипсина — промежуточных продуктов энзиматического гидролиза. Основное внимание уделено изучению первичной специфичности  $\alpha$ -химотрипсина, т. е. выяснению стереохимических особенностей его активного центра, которые проявляются при связывании боковой цепи центрального остатка  $P_1^*$  субстрата.

Рентгеноструктурные исследования ряда комплексов  $\alpha$ -химотрипсина [3—5] показали наличие в активном центре фермента гидрофобной полости  $S_1$ , ответственной за связывание ароматической боковой цепи субстрата и определяющей избирательность гидролитического действия фермента к природе остатка  $P_1$ . Поскольку на протяжении всего каталитического акта положение ароматического кольца в полости  $S_1$  не претерпевает существенных изменений, при теоретическом изучении первичной специфичности наиболее удачным объектом является ацилфермент, в ко-

\* Здесь и далее для обозначения взаимодействующих между собой участков фермента и субстрата используется номенклатура Шехтера и Бергера [2].

тором реализована ковалентная связь между  $O^\gamma$ -атомом остатка  $Ser^{195}$  и карбонильным углеродом остатка  $P_1$ . Исследование с этой же целью, например, комплекса Михаэлиса усложнило бы задачу, так как потребовало бы рассмотрения конформационных возможностей всего субстрата и введения для его координации в активном центре дополнительных шести переменных [6].

Чтобы установить причины уникального связывания  $\alpha$ -химотрипсин-ом субстратов с ароматическими остатками  $P_1$  и выяснить влияние взаимодействия  $P_1-S_1$  на геометрию ацильной части, нами выполнен конформационный анализ ацилферментов как с  $P_1 = -L-Phe-$  и  $-L-Trp-$ , так и с  $P_1 = -L-Ala-$  и  $-L-Val-^*$ . В работе исследуется взаимодействие субстратной компоненты при ее различных конформационных состояниях не только с полостью  $S_1$ , но и с другими возможными участками связывания фермента [6].

При изучении первичной специфичности  $\alpha$ -химотрипсина весьма актуален вопрос о состоянии боковой цепи  $-Ser^{195}$ . Согласно рентгеноструктурному анализу ряда ацилферментов [4, 5, 7], атом  $O^\gamma$  остатка  $Ser^{195}$  повернут приблизительно на  $120^\circ$  относительно его нативного положения. Такой же поворот наблюдается в тетраэдрических аддуктах трипсина с природными ингибиторами [8—10]. В связи с этим было предположено [4], что ацилирование  $\alpha$ -химотрипсина сопровождается движением боковой цепи остатка серина. Однако это мнение не является общепринятым. Недавно при анализе моделей, построенных на основе тех же рентгеноструктурных данных, авторы работы [11] пришли к заключению, что образование продуктивного комплекса  $\alpha$ -химотрипсина с истинными субстратами возможно только при нативном положении  $-Ser^{195}$ .

Учитывая исключительную роль  $-Ser^{195}$  в каталитическом действии  $\alpha$ -химотрипсина, в настоящей работе мы детально исследовали конформационные возможности боковой цепи серина, не постулируя необходимости ее поворота. Особо следует подчеркнуть, что теоретический подход позволяет анализировать конформационные состояния моделей комплексов фермента с природными субстратами, тогда как рентгеноструктурные исследования, несмотря на несомненную ценность их результатов, всегда имеют дело с ингибиторными комплексами. Структура последних точно не соответствует промежуточным продуктам, которые образуются в процессе каталитического воздействия фермента на истинные субстраты.

Теоретическое рассмотрение конформационных особенностей ацилфермента представляет собой составную часть исследования всего механизма каталитического действия  $\alpha$ -химотрипсина. В конечном счете цель теоретического подхода к изучению фермент-субстратных взаимодействий заключается в описании природного катализа как взаимообусловленного на всех стадиях спонтанно протекающего процесса. В этом плане анализ ацил- $\alpha$ -химотрипсина необходим для выяснения стереохимии его перехода в тетраэдрический аддукт с последующим деацилированием.

*Расчетная модель и потенциальные функции.* Конформационные возможности субстратной компоненты  $N$ -ацетил- $L$ -фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина и  $N$ -ацетил- $L$ -тринтофанил- $\alpha$ -химотрипсина определяются восемью углами вращения вокруг связей  $C^\alpha-C^\beta$  ( $\chi^1$ ),  $C^\beta-O^\gamma$  ( $\chi^2$ ),  $O^\gamma-C'$  ( $\omega_1$ ),  $C'-C^\alpha$  ( $\psi$ ),  $C^\alpha-N$  ( $\varphi$ ),  $C^\alpha-C^\beta$  ( $\chi^1$ ),  $C^\beta-C^\gamma$  ( $\chi^2$ ) и  $N-C'$  ( $\omega$ ) (рис. 1). Отсчет углов соответствует стандартной номенклатуре [12]. Для длин связей и валентных углов боковых цепей  $-Phe-$  и  $-Trp-$  использованы рентгеноструктурные данные [13], а для основных цепей — усредненные параметры пептидов и сложных эфиров [14, 15].

В расчет были включены все аминокислотные остатки фермента, которые могут иметь контакты с субстратной компонентой при любой ее

\* Результаты расчета  $N$ -ацетил- $L$ -аланил- и  $N$ -ацетил- $L$ -валил- $\alpha$ -химотрипсина будут изложены в следующем сообщении.

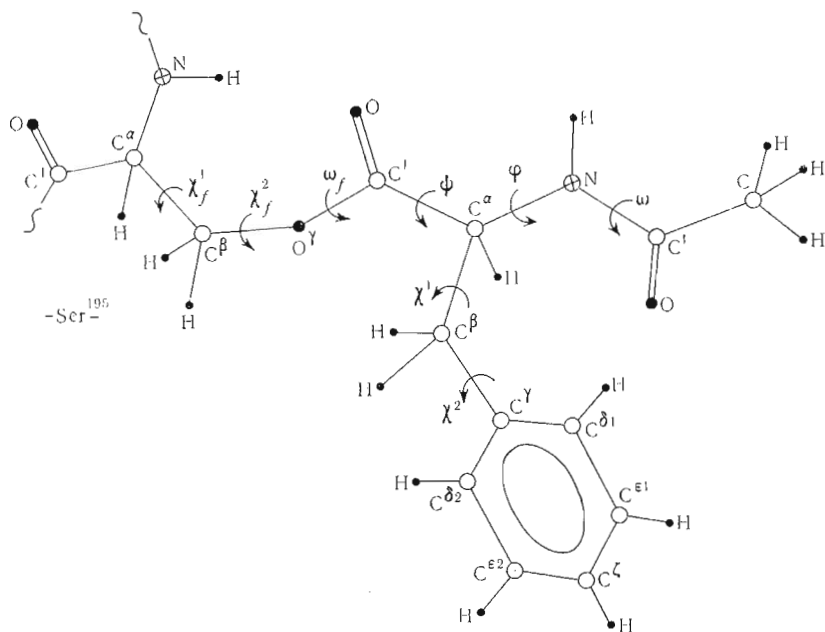


Рис. 1. Расчетная модель субстратной компоненты N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина

конформации. К ним относятся остатки 35, 39—43, 55—60, 94, 96—102, 142, 143, 189—197, 212—222, 224—228 (всего 676 атомов). Дальнейшее расширение модели в данном случае нецелесообразно, так как оно не приводит к изменению результатов расчета [6].

Ацилирование  $\alpha$ -химотрипсина не сопровождается существенным изменением геометрии его активного центра [4, 5]; исключение составляет лишь  $\text{-Ser-}^{195}$ . Поэтому весь активный центр, кроме серина, жестко фиксировался в соответствии с координатами, полученными Бирктофтом и Блоу [16]. В соответствии с механизмом химотрипсинового катализа, предложенным в работе [17], атом  $\text{N}^{\epsilon 2}$  боковой цепи  $\text{-His-}^{57}$  считался депротонированным. Положения атомов водорода были рассчитаны на основе рентгеноструктурных координат атомов C, N, O, S. Поиск оптимальных конформаций производился путем минимизации энергии по первым производным с переменным шагом при вариации восьми двугранных углов.

Конформационная энергия субстратной компоненты и энергия ее взаимодействия с ферментом определялись при учете невалентных и электростатических взаимодействий, торсионного вклада и водородных связей. Энергия невалентных взаимодействий оценивалась по потенциалу Леннарда — Джонса с параметризацией Скотта и Шераги [18]. Энергия электростатических взаимодействий рассчитывалась в монопольном приближении с зарядами на атомах, предложенными Поландом и Шерагой [19], при значении эффективной диэлектрической проницаемости  $\epsilon_4$ , соответствующей слабополярной среде. Водородная связь описывалась потенциалом типа Морзе [20], в котором параметры были подобраны таким образом, чтобы оптимальная энергия связи  $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$  при  $r_{\text{O}\cdots\text{H}}$  1,80 Å составляла 3 ккал/моль. Торсионные потенциалы и барьеры вращений вокруг связей взяты из работы [21]. В описанной расчетной схеме энергетические различия между конформерами определяются прежде всего невалентными взаимодействиями. Однако известно [22, 23], что связывание субстрата, и особенно его ароматической боковой цепи  $\text{P}_1$  в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина, имеет гидрофобный характер, т. е. обусловлено не только энтальпийной, но и энтропийной составляющей свободной энер-

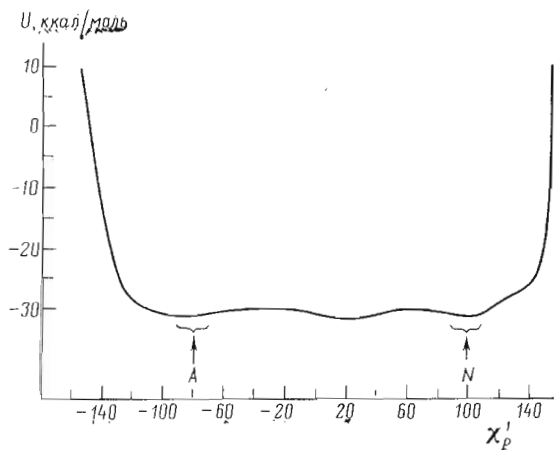


Рис. 2. Потенциальная кривая  $U(\chi_f^1)$  боковой цепи -Ser<sup>195</sup> в поле нативного  $\alpha$ -химотрипсина

гии системы. Поэтому рассчитанные нами значения энергии отражают не истинное распределение конформеров ацилфермента по величинам свободной энергии, а только вклад, вносимый в эти уровни атом-атомными взаимодействиями. Имеющиеся результаты расчетов комплексов Михаэлиса  $\alpha$ -химотрипсина [1, 6] тем не менее указывают на обоснованность такой оценки. По-видимому, это связано с симбатным характером изменений энергии невалентных и гидрофобных взаимодействий, обусловленным зависимостью этих вкладов от площади контактирования.

*Обсуждение результатов расчета.* 1. N-ацетил-L-фенилаланил-L- $\alpha$ -химотрипсин. Для определения конформационных возможностей боковой цепи -Ser<sup>195</sup> нами было построено сечение потенциальной поверхности  $U(\chi_f^1)$  в поле  $\alpha$ -химотрипсина (рис. 2). Характер полой кривой показывает, что вращение атома O<sup>γ</sup> в свободном ферменте происходит без каких-либо внутримолекулярных затруднений в очень широком интервале изменений угла  $\chi_f^1$ . Одно из крайних оптимальных значений ( $\chi_f^1 \sim 90^\circ$ ) соответствует нативному состоянию (N) фермента [16], другое ( $\chi_f^1 \sim -90^\circ$ ) — состоянию (A), обнаруженному в индоллакрилоил- и тозил- $\alpha$ -химотрипсине [4, 5]. Поэтому поиск исходных для минимизации конформационных параметров ацилфермента был начат нами с выбора (в качестве начальных) двух оптимальных значений угла  $\chi_f^1$ , отвечающих найденным экспериментально состояниям A и N остатка Ser<sup>195</sup>. Выбор значений других переменных проведен на основе анализа сечений потенциальной поверхности  $\chi_f^2 - \omega_f$ ,  $\omega_f - \psi$ ,  $\psi - \chi^1$ ,  $\chi^1 - \chi^2$ ,  $\phi$  и  $\chi_f^1 - \chi_f^2$ , которые были построены без учета электростатических взаимодействий, слабо зависящих от расстояний между атомами.

Для согласования значений всех конформационных параметров использована процедура последовательных приближений. Исследование потенциальной поверхности начиналось с построения конформационной карты  $\chi_f^2 - \omega_f$ , которая рассчитывалась при угле  $\chi_f^1$ , закреплённом в одном из отмеченных выше состояний (A и N), и при фиксации основной цепи -Phe- в области R ( $\phi - 90^\circ$ ,  $\psi - 60^\circ$ ) и в двух точках области B ( $\phi - 90^\circ$ ,  $\psi 40^\circ$ ;  $\phi - 90^\circ$ ,  $\psi 140^\circ$ ) [24]. Боковая цепь -Phe- при этом фиксировалась при трех значениях угла  $\chi^1$  (60, 180 и  $-60^\circ$ ) и значении угла  $\chi^2$   $90^\circ$ , соответствующих минимумам торсионных потенциалов. При построении последующих конформационных карт ( $\omega_f - \psi$  и т. д.) учитывались результаты предшествующего анализа. Первый этап завершился построением семейства карт  $\chi_f^1 - \chi_f^2$  при оптимальных значениях других углов, полученных ранее из карт  $\chi_f^2 - \omega_f$ ,  $\omega_f - \psi$ ,  $\psi - \chi^1$ ,  $\chi^1 - \chi^2$  и  $\phi$ .

Найденные таким образом ориентировочные значения конформационных параметров субстратной компоненты служили исходными данными для их последующего уточнения путем повторного построения в том же порядке всех сечений потенциальной поверхности. На основе конформационных карт, полученных на втором этапе согласования, был сделан выбор нулевых приближений для минимизации энергии при одновременной вариации всех двугранных углов субстратной компоненты.

Наиболее жесткими параметрами ацилфермента являются углы  $\chi_f^1$ ,  $\chi_f^2$ ,  $\omega_f$  и  $\psi$ . Разрешенные области их изменений представляют собой на конформационных картах узкие потенциальные ямы, занимающие незначительную площадь потенциальной поверхности. Положение минимумов на картах, их число и оптимальная энергия весьма чувствительны к геометрии остальной части субстратной компоненты. При формах *R* и *B* остатка Phe значения угла  $\chi_f^1$  группируются вблизи величин  $-90$  (*A*) и  $+90$  (*N*) или, в более редких случаях, являются промежуточными между *A* и *N* (рис. 2), а угол  $\chi_f^2$  может принимать одно из четырех значений в областях  $\pm 90$  и  $\pm 150^\circ$ . Угол  $\omega_f$ , как правило, имеет значение, близкое  $180^\circ$ , что соответствует *транс*-конфигурации сложноэфирной группы. Значение  $\omega_f \sim 0^\circ$  (*цис*-конфигурация) ни в одном случае не встречается. Допустимые значения угла  $\psi$  всегда соответствуют низкоэнергетическим значениям этого угла в свободном метиламиде *N*-ацетил-*L*-фенилаланина [24]. Наиболее лабильны углы  $\chi^1$ ,  $\chi^2$  и  $\varphi$  субстратной компоненты. Легкость изменения угла  $\varphi$ , отклонение которого от оптимального значения может достигать нескольких десятков градусов, обусловлена отсутствием в рассматриваемой модели *N*-концевой части субстрата (остатки  $P_2$ ,  $P_3$ ...). Что же касается углов  $\chi^1$ ,  $\chi^2$ , то их лабильность существенно зависит от заданных параметрами  $\chi_f^1$ ,  $\chi_f^2$ ,  $\omega_f$ ,  $\psi$  ориентации субстратной компоненты относительно активного центра. Как правило, в конформациях формы *R* свобода изменения  $\chi^1$ ,  $\chi^2$  меньше, чем в формах *B*. Комбинации всех оптимальных значений двугранных углов были приняты в качестве нулевых приближений и проминимизированы с учетом всех составляющих энергии. В табл. 1 представлены результаты минимизации энергии конформационных состояний субстратной компоненты с отрицательной энергией взаимодействия.

При отборе конформаций ацилфермента, удовлетворяющих условиям протекания энзиматического гидролиза, очевидно, необходимо кроме энергетического фактора принять во внимание критерии продуктивности связывания. Будем считать продуктивными те конформации, которые удовлетворяют следующим требованиям:

1) ориентация сложноэфирной группы в ацилферменте не должна создавать стерических затруднений для нуклеофильной атаки карбонильного углерода субстрата молекулой воды [4]. Для выполнения этого требования вполне достаточно образования водородных связей между карбонильным кислородом и группами *N*-H остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup>. Геометрическим критерием выполнения этого условия могут служить расстояния между карбонильным кислородом и амидными протонами остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup>, а также расстояние между углеродом карбонильной группы и атомом  $N^{\epsilon 2}$  остатка His<sup>57</sup>;

2) иминогруппа остатка  $P_1$  должна быть предрасположена к образованию водородной связи с карбонилем остатка Ser<sup>214</sup> [25], а ориентация *N*-ацетиламидной группы  $P_1$  должна допускать образование антипараллельной  $\beta$ -структуры между участком  $P_1$ - $P_3$  субстрата и сегментом 214—216 фермента при генерации субстратной цепи [26]. Геометрическим критерием выполнения этого условия может служить расстояние между амидным протоном субстрата и карбонилем остатка Ser<sup>214</sup>.

Рассмотрим, в какой степени найденные оптимальные конформации ацилфермента удовлетворяют условиям продуктивного связывания. Остановимся на случаях с повернутым положением боковой цепи  $-\text{Ser}^{195}-$ .

Геометрические и энергетические параметры оптимальных конформаций субстратной компоненты N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина

Конформация	Углы вращения, град								Энергия, ккал/моль	Расстояния, Å			
	$\chi_f^1$	$\chi_f^2$	$\omega_f$	$\psi$	$\varphi$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\omega$		C=O...HN <sup>(193)</sup>	C=O...HN <sup>(195)</sup>	N <sup>ε2</sup> → C=O <sup>(87)</sup>	NH...OC <sup>(214)</sup>
R <sub>1</sub>	-76	82	-171	-54	-99	-55	146	180	-35,3	2,5	1,8	4,8	3,5
R <sub>2</sub>	-84	84	178	-68	-94	-85	21	180	-31,7	2,8	1,8	4,7	3,3
R <sub>3</sub>	-81	93	138	-66	-151	-146	67	179	-26,8	2,9	1,7	4,6	4,0
R <sub>4</sub>	-92	80	102	-44	-150	-60	81	180	-17,8	4,3	2,5	4,7	4,4
R <sub>5</sub>	-87	156	-101	-26	-133	158	62	163	-13,8	5,7	4,8	3,3	5,3
R <sub>6</sub>	-20	-148	-168	-70	-123	174	84	179	-26,0	5,5	4,3	3,5	6,1
R <sub>7</sub>	-12	148	121	-55	-149	-54	93	180	-17,8	3,7	3,6	3,4	3,1
R <sub>8</sub>	4	178	-132	-106	-92	-60	113	-179	-15,8	4,9	4,2	3,2	7,5
B <sub>1</sub>	-86	99	146	156	-126	57	80	-178	-28,0	2,9	2,0	4,5	6,3
B <sub>2</sub>	-85	93	136	151	-149	-66	89	180	-24,6	3,0	1,8	4,6	6,3
B <sub>3</sub>	-92	72	129	148	-128	-145	49	178	-22,0	4,0	2,1	4,9	6,1
B <sub>4</sub>	-84	102	144	149	-120	63	81	180	-27,9	2,8	2,0	4,4	6,3
B <sub>5</sub>	-82	154	-172	55	-85	179	33	-178	-26,3	4,5	3,9	3,4	5,6
B <sub>6</sub>	-84	153	-169	54	-85	-52	160	-178	-26,1	4,6	4,0	3,4	5,6
B <sub>7</sub>	-84	142	147	132	-91	-45	154	-179	-15,8	3,5	3,2	3,6	5,2
B <sub>8</sub>	4	84	152	150	-148	-32	90	-179	-27,3	3,7	2,8	4,3	8,8
B <sub>9</sub>	-10	146	158	180	-164	43	90	180	-24,8	4,3	3,9	3,4	6,4
B <sub>10</sub>	18	-119	-141	4	-68	-178	29	-178	-21,8	3,8	2,8	4,1	6,4
B <sub>11</sub>	14	-116	-130	-9	-81	-35	140	-179	-19,1	3,8	2,8	4,2	6,1
B <sub>12</sub>	-39	157	158	-151	-121	-82	80	180	-20,9	4,1	3,8	3,4	4,2
B <sub>13</sub>	76	-93	-161	73	-111	-53	150	-175	-20,6	2,1	1,8	4,1	6,6
B <sub>14</sub>	62	-101	-156	37	-105	47	90	178	-15,6	2,2	1,9	4,2	6,1
B <sub>15</sub>	72	-143	167	145	-96	-53	156	180	-13,7	4,1	3,7	3,1	7,2
B <sub>16</sub>	72	-145	170	143	-118	46	92	178	-12,6	4,1	3,7	3,1	6,6
H	-77	95	146	-84	80	-154	59	177	-25,9	2,6	1,7	4,6	5,8

Длины водородных связей между карбонилем субстратной компоненты и группами N—H остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup>, расстояния N<sup>ε2</sup> → C=O, а также анализ атомных моделей ацилфермента показывают, что при  $\chi_f^1 \sim -90^\circ$  первое условие продуктивности выполняется, когда  $\chi_f^2 \sim 90^\circ$  и  $\omega_f \sim 180^\circ$  (табл. 1). Среди конформаций с R-формой -Phe- такая комбинация углов имеется у R<sub>1</sub> — R<sub>4</sub>. Для самой низкоэнергетической конформации R<sub>1</sub> на рис. 3 схематически дано расположение субстратной компоненты в активном центре, а на рис. 4 приведены сечения потенциальной поверхности  $\chi_f^1$ — $\chi_f^2$ ,  $\omega_f$ — $\psi$ ,  $\chi^1$ — $\chi^2$  и  $\varphi$ , построенные при оптимальных для этой конформации параметрах (табл. 1). В случае конформации R<sub>1</sub> карбонил сложноэфирной группы направлен в сторону групп N—H остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup> и образует с ними водородные связи на расстояниях соответственно 2,5 и 1,8 Å. При такой ориентации углерод карбонильной группы остается открытым для атаки молекулой воды. Продуктивное положение сложноэфирной группы в активном центре является достаточно жестким. Как видно из карт  $\chi_f^1$  —  $\chi_f^2$  и  $\omega_f$ — $\psi$  (рис. 4, а, б), допустимая вариация углов  $\chi_f^1$  и  $\omega_f$  не превышает 10—15°; несколько более подвижны параметры  $\chi_f^2$  и  $\psi$ . Ароматическое кольцо -Phe- в конформации R<sub>1</sub> находится глубоко в гидрофобной полости и располагается приблизительно параллельно ее стенкам. Однако положение боковой цепи -Phe- в полости S<sub>1</sub> не строго фиксировано (рис. 4, в); особенно большие изменения ( $\sim 50^\circ$ ) возможны по углу  $\chi^2$ . Группа N—H остатка -Phe- ориентирована в сторону карбонила остатка Ser<sup>214</sup>. Это обстоятельство, а также возможность изменения угла  $\varphi$  в широком интервале значений (от  $-30$  до  $-120^\circ$ , рис. 4, г) обеспечивают, в случае продолжения субстратной цепи с N-конца, образование β-структуры с сегментом 214—216 фермента. Таким образом, кон-

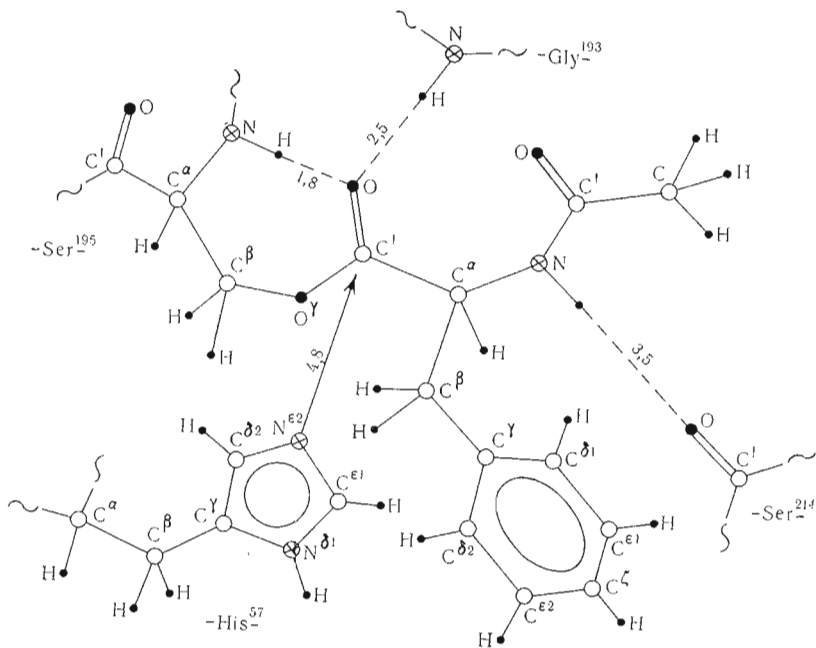


Рис. 3. Субстратная компонента N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина в конформации  $R_1$  (расстояния даны в Å). Пунктиром показаны водородные связи

формация  $R_1$  удовлетворяет и второму условию продуктивного связывания.

Дополнительному подминимуму отвечает конформация  $R_2$ , которая в отношении всех углов, кроме  $\chi^2$ , практически идентична  $R_1$ . Однако положение боковой цепи -Phe- в конформации  $R_2$  малореально, так как она имеет энергию на  $\sim 4$  ккал/моль выше, чем в  $R_1$ . Значительно более высокоэнергетические варианты  $R_3$  и  $R_4$  отвечают, хотя и не столь удовлетворительно, как  $R_1$ , продуктивной ориентации сложноэфирной группы. Но большие отклонения этой группы от трансoidной конфигурации ( $\omega_j$ ) и изменение угла  $\phi$  нарушают второе условие продуктивности. В конформации  $R_3$  ( $\chi^1 \sim -150^\circ$ ) боковая цепь -Phe- направлена не во внутрь гидрофобной полости, а в сторону ионной пары Ile<sup>16</sup>: Asp<sup>194</sup>. В  $R_4$  ( $\chi^1 \sim -60^\circ$ ) боковая цепь вообще не входит в полость, а располагается у входа, прикрывая доступ к ней и взаимодействуя с остатком Trp<sup>215</sup>. Удовлетворительной для нуклеофильной атаки является конформация с H-формой основной цепи -Phe-. Однако здесь тоже нарушается второе условие продуктивности, поскольку невозможно образование  $\beta$ -структуры с сегментом 214—216 фермента из-за направленности N-концевой части субстратной компоненты во внешнюю среду. Переход угла  $\chi_j^2$  из минимума в области  $\sim 90^\circ$  в минимум в области  $\sim 150^\circ$  при сохранении  $\chi_j^1 \sim -90^\circ$  (конформация  $R_3$ ) приводит к резкому нарушению продуктивного расположения как сложноэфирной, так и амидной групп. Боковая цепь -Phe- в  $R_5$  направлена на поверхность активного центра к остатку His<sup>57</sup>, а в гидрофобную полость попадает амидная группа субстратной компоненты.

Перейдем к рассмотрению конформаций субстратной компоненты в том случае, когда основная цепь -Phe- находится в форме B. На рис. 5 приведены сечения потенциальной поверхности  $\chi_j^1 - \chi_j^2$ ,  $\omega_j - \phi$ ,  $\chi^1 - \chi^2$  и  $\phi$  для наиболее энергетически предпочтительной конформации этого типа  $B_1$ . Карты показывают, что конформационная свобода  $B_1$  в отношении углов  $\chi_j^1$ ,  $\chi_j^2$ ,  $\omega_j$  и  $\phi$  (рис. 5, а, б) очень ограничена. Наиболее комбина-

ция этих углов соответствует продуктивному ориентированию карбонила сложноэфирной группы. Очень большие изменения у  $B_1$  возможны по углам  $\chi^1$ ,  $\chi^2$  и  $\varphi$  (рис. 5, в, г). Это связано с тем, что в гидрофобной полости оказывается N-ацетиламидная группа, а боковая цепь -Phe- ( $\chi^1 \sim 60$ ,  $\chi^2 \sim 80^\circ$ ) располагается на поверхности активного центра около остатка Met<sup>192</sup>. Конформации  $B_2$ ,  $B_3$  и  $B_4$  отличаются от  $B_1$  в основном ориентацией боковой цепи. При углах  $\chi^1 \sim -60$ ,  $\chi^2 \sim 90^\circ$  (конформация  $B_2$ ) она прикрывает гидрофобную полость и направлена к участку связывания субстрата в области остатка Trp<sup>215</sup>, а при углах  $\chi^1 \sim -150^\circ$ ,  $\chi^2 \sim 50^\circ$  (конформация  $B_3$ ) направлена наружу между остатком His<sup>57</sup> и дисульфидным мостиком Cys<sup>42</sup> — Cys<sup>58</sup>. При углах  $\chi^1 \sim 60$ ,  $\chi^2 \sim 90^\circ$  (конформация  $B_4$ ) боковая цепь находится на поверхности около остатков Gly<sup>193</sup> и Met<sup>192</sup>. Таким образом, конформации  $B_1 - B_4$  полностью не удовлетворяют второму условию продуктивного связывания. Конформации  $B_5 - B_7$  имеют угол  $\chi_f^1$ , соответствующий повернутому положению атома O $\gamma$ -Ser<sup>195</sup> ( $\sim -90^\circ$ ), а значения угла  $\chi_f^2$  расположены в области  $\sim 150^\circ$ . Как и у рассмотренного выше аналогичного по  $\chi_f^1$ ,  $\chi_f^2$  варианта  $R_5$ , это приводит к существенному нарушению обоих условий продуктивности.

К конформациям, в которых угол  $\chi_f^1$  принимает значения, промежуточные между состояниями  $A$  и  $N$  на потенциальной кривой  $U(\chi_f^1)$  свободного фермента (рис. 2), относятся  $R_6 - R_8$  и  $B_8 - B_{12}$ . Все они непродуктивны, так как в них весьма неудовлетворительны условия для нуклеофильной атаки карбонильного углерода субстрата. Амидная группа направлена в растворитель или внутрь полости, а боковая цепь -Phe- располагается вне гидрофобной полости, вблизи участков связывания, образуемых остатками Trp<sup>215</sup>, His<sup>57</sup>, Met<sup>192</sup> и дисульфидным мостиком Cys<sup>42</sup> — Cys<sup>58</sup>.

Остановимся на конформациях, в которых угол  $\chi_f^1$  отвечает нагивному положению боковой цепи -Ser<sup>195</sup> ( $\chi_f^1 \sim 90^\circ$ ). В ацилферменте такое положение возможно только при форме  $B$  основной цепи Phe- субстратной компоненты, так как форма  $R$  в этом случае из-за очень высокой потенциальной энергии оказывается нереальной. При  $\chi_f^1 \sim 90^\circ$  продуктивная ориентация сложноэфирной группы осуществляется, когда  $\chi_f^2 \sim -90^\circ$  и  $\omega_f \sim 180^\circ$ .

Первому условию продуктивности удовлетворяют конформации  $B_{13}$  и  $B_{14}$ , причем  $B_{14}$  лучше. Карбонил сложноэфирной группы направлен в сторону групп N—H остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup> и образует с ними водородные связи (в  $B_{14}$  — на расстоянии 2,2 и 1,9 Å соответственно). При этом карбонильный углерод открыт для атаки молекулой воды. В этом отношении конформация  $B_{14}$  аналогична  $R_1$ . Различие, однако, заключается в разной ориентации плоскости атомов O $\gamma$ C $\gamma$ C $\alpha$  в активном центре, которая в  $B_{14}$  по сравнению с  $R_1$  повернута на  $\sim 120^\circ$ , что приводит к смещению атома углерода карбонильной группы на  $\sim 1,7$  Å. Поэтому деацилирование N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина для случаев  $R_1$  и  $B_{14}$  требует различных конформационных состояний боковой цепи -His<sup>57</sup>, ответственной за активацию атакующей молекулы воды.

Амидная группа в конформациях  $B_{13}$  и  $B_{14}$  располагается далеко от остатка Ser<sup>214</sup>, однако при удлинении цепи может включиться в  $\beta$ -структуру. Боковая цепь -Phe- в  $B_{14}$  находится в гидрофобной полости, но ориентирована не параллельно ее стенкам, как в  $R_1$ , а под углом. Такое расположение менее эффективно с точки зрения энергии невалентных взаимодействий. В конформации  $B_{13}$  боковая цепь не входит в полость, а находится на поверхности, взаимодействуя с -Met<sup>192</sup>-. В конформациях  $B_{15}$  и  $B_{16}$  карбонил сложноэфирной группы находится далеко от остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup> и не образует с ними водородных связей. Амидная группа в  $B_{15}$  и  $B_{16}$  имеет тенденцию к образованию водородной связи с остатком Ser<sup>214</sup>, и ее положение при наращивании субстратной цепи с N-конца не препятствует созданию  $\beta$ -структуры. Боковая цепь в этих конформациях располагается у входа в гидрофобную полость и под углом к ее стенкам.



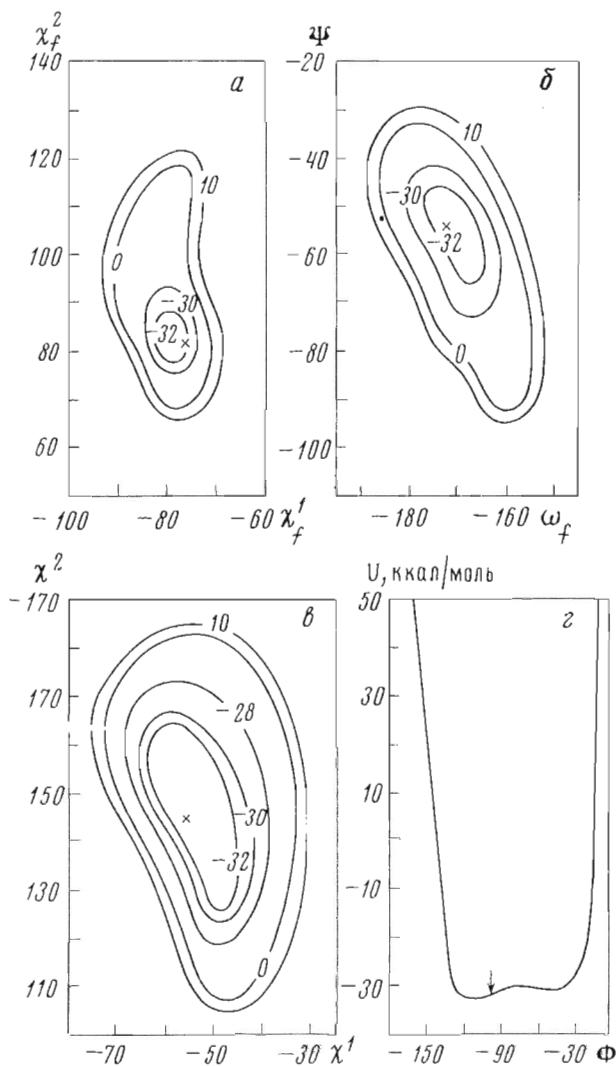


Рис. 4. Сечения потенциальной поверхности субстратной компоненты N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина в конформации  $R_1$

Таким образом, из всего многообразия возможных конформационных состояний субстратной компоненты с отрицательной энергией сорбции в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина лишь два —  $R_1$  и  $B_{14}$  — удовлетворяют (правда, в разной степени) условиям продуктивности. Конформация  $R_1$  реализуется при повернутом положении боковой цепи  $-\text{Ser}^{195}$  ( $\chi_f^1 \sim -90^\circ$ ), наблюдаемом в ацильных ингибиторных комплексах фермента [4, 5], и при  $R$ -форме основной цепи остатка Phe. Положение боковой цепи  $-\text{Ser}^{195}$  в конформации  $B_{14}$  соответствует нативному  $\alpha$ -химотрипсину [16]. При этом основная цепь  $-\text{Phe}$  имеет форму  $B$ . Энергия взаимодействия субстратной компоненты с активным центром в этих двух случаях существенно различна ( $-35,3$  ккал/моль в  $R_1$  и  $-15,6$  ккал/моль в  $B_{14}$ ). Это обстоятельство, а также то, что поворот атома  $O^\gamma$   $-\text{Ser}^{195}$  осуществляется практически свободно (рис.2), позволяют заключить, что когда  $R$ -форма центрального остатка  $P_1$  не запрещена, стадия ацилирования будет осуществляться через единственное конформационное состояние субстратной компоненты  $R_1$ . Эта конформация не только лучше всего отвечает продуктивному связыванию, но является наиболее энергетически предпочтитель-

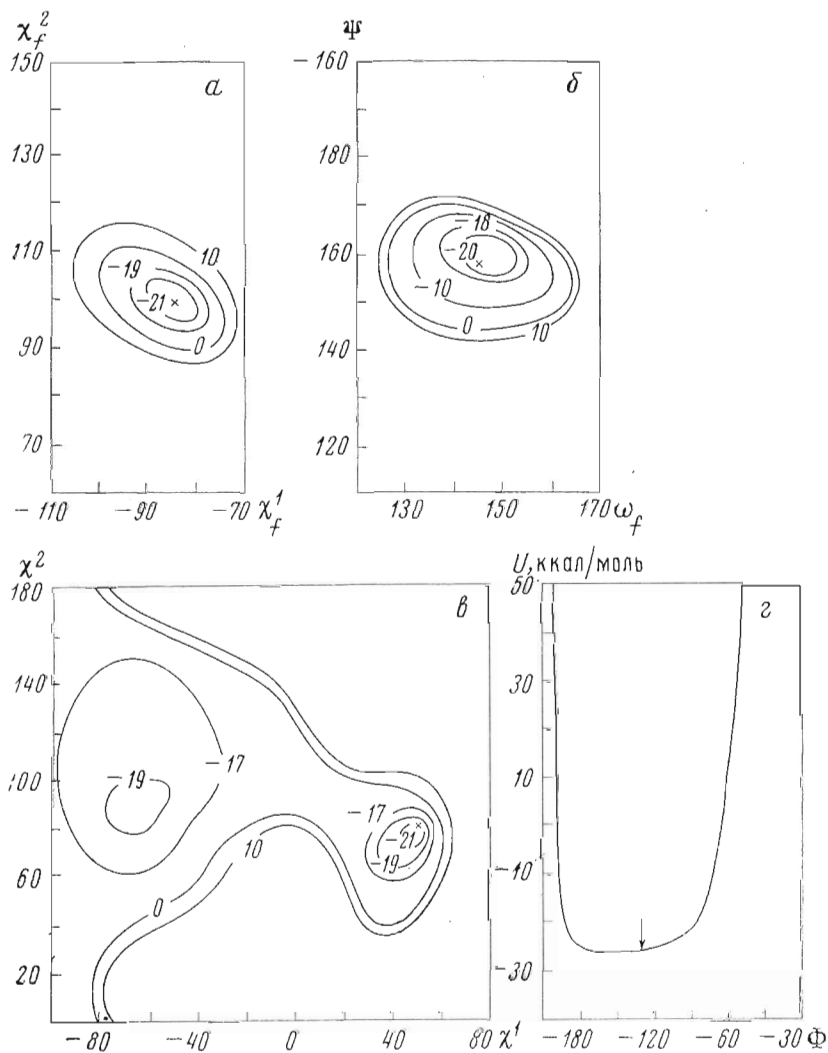


Рис. 5. Сечения потенциальной поверхности субстратной компоненты N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина в конформации  $B_1$

ной, т. е. оптимальная посадка ароматической боковой цепи в гидрофобный карман автоматически обуславливает продуктивную ориентацию расщепляемой группы.

Сопоставление геометрических параметров ацильной части фермента в случае варианта  $R_1$  с соответствующими параметрами метиламида N-ацетил-L-фенилаланина в изолированном состоянии приводит к важному выводу, что остаток Phe субстратной компоненты находится практически в глобальной конформации свободной молекулы [24]. Кроме того, сложноэфирная группа и N-концевая амидная группа имеют более предпочтительную *транс*-конфигурацию ( $\omega \sim 180^\circ$ ). Боковая цепь -Ser<sup>195</sup> находится в конформации, соответствующей низкоэнергетическому состоянию свободного остатка. Следовательно, в субстратной компоненте в случае конформации  $R_1$ , несмотря на резкий характер потенциального поля, не возникает каких-либо внутримолекулярных напряжений. Обеспечивая продуктивное связывание, конформационное состояние  $R_1$  является наилучшим как в отношении свободного субстрата, так и в отношении его взаимодействия с активным центром. Можно полагать, что проявля-

емая при взаимодействии с истинными субстратами избирательность  $\alpha$ -химотрипсина к природе центрального остатка  $P_1$  (первичная специфичность) объясняется тем, что наиболее предпочтительное по энтальпии и энтропии расположение субстратной компоненты с ароматической боковой цепью в гидрофобной полости предопределяет продуктивную ориентацию расщепляемой группы. В то же время сама по себе такая ориентация сложноэфирной группы, как показывает расчет, строго не детерминирует положения боковой цепи -Phe- в активном центре фермента. Однако и в этом отношении наилучшая для нуклеофильной атаки ситуация осуществляется при вхождении ароматической цепи фенилаланина  $P_1$  внутрь гидрофобной полости.

Правильная ориентация субстратной компоненты со стороны N-конца центрального остатка  $P_1$  возможна только при продуктивном связывании сложноэфирной группы и расположении в полости  $S_1$  боковой цепи -Phe-. При соблюдении этих условий в низкоэнергетических конформациях ацильной части образования  $\beta$ -структуры между остатками  $P_1$  —  $P_3$  природного субстрата с сегментом белка 214—216 представляется, таким образом, неизбежным следствием. Сам же по себе факт создания в ацилферменте системы водородных связей и четкая фиксация конформационного состояния субстратного участка  $P_1$  —  $P_3$  не являются необходимым условием для последующего деацилирования. Ни в одной из рассмотренных нами конформаций эффективной водородной связи между N—H-группой -Phe- и C=O-группой -Ser<sup>214</sup>- не образуется, а наблюдается лишь, как это имеет место в  $R_1$ , предрасположенность к ее образованию в случае наращивания субстратной цепи с N-конца.

Однако имеются экспериментальные данные, которые непосредственно указывают на важную роль водородной связи между амидной группой центрального остатка  $P_1$  и карбонилем -Ser<sup>214</sup>. Так, замена амидной группы на ацетоксигруппу приводит к резкому снижению скорости гидролиза [25]. Поскольку конформационные возможности субстратных компонент с амидной и ацетоксигруппой в ацилферменте практически идентичны, причину резкого уменьшения скорости гидролиза во втором случае, очевидно, следует искать в конформационной специфике предшествующих переходных состояний. По сравнению с расстоянием между атомами водорода иминогруппы ароматического остатка субстрата и кислотодом карбонила -Ser<sup>214</sup> в расчетном невалентном комплексе с N-формил-L-триптофаном [4] в ацилферменте это расстояние меньше на  $\sim 1$  Å. Водородная связь между группой N—H -Phe- и группой C=O -Ser<sup>214</sup>, как предполагают Блоу и соавт. [9, 10], играет существенную роль при переходе комплекса Михаэлиса в тетраэдрический аддукт.

Сравним рассчитанные конформационные расстояния  $R_1$  N-ацетил-L-фенилаланил- и N-ацетил-L-триптофанил- $\alpha$ -химотрипсина (относительно второго ацилфермента подробно см. ниже) с результатами рентгеноструктурного анализа ряда ацильных производных: индолилаланил-, тозил- и карбамил- $\alpha$ -химотрипсина [4, 5, 7] (табл. 2). Такое сопоставление позволит не только обнаружить определенное сходство в пространственном строении фермент-субстратных и фермент-ингибиторных комплексов, но и выявить различие между ними, что не менее важно для правильного понимания как функционирования  $\alpha$ -химотрипсина, так и причин его ингибирования.

Общим для соединений, приведенных в табл. 2, является значительный поворот боковой цепи -Ser<sup>195</sup> от нативного положения, а также глубокое проникновение в гидрофобную полость и весьма близкая ориентация по отношению к ее стенкам боковых цепей остатков  $P_1$ . Об этом свидетельствуют координаты центров тяжести ароматических колец и значения относительных углов  $\theta_2$  наклона их плоскостей. Существенное различие между теоретической продуктивной конформацией  $R_1$  субстратной компоненты и структурой опытных ингибиторных комплексов обнаруживается

Рассчитанные и экспериментальные значения геометрических параметров ацильных комплексов  $\alpha$ -химотрипсина

Комплекс	Углы, град			Относительная ориентация плоскости атомов $O^{\gamma}C^{\alpha}C^{\beta}$ , $\theta_1$ , град	Координаты центра тяжести ароматического кольца, Å			Относительная ориентация плоскости ароматического кольца, $\theta_2$ , град	Расстояния, Å		
	$\chi_f^1$	$\chi_f^2$	$\omega_f$		X	Y	Z		C'O...HN(193)	C'O...HN(195)	N <sup>62</sup> (57)→C'O
N-Ацетил-L-триптофанил- $\alpha$ -химотрипсин *	-72	88	179	0	19,5	-3,4	4,9	0	2,4	1,8	4,7
N-Ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсин *	-76	82	-171	10	19,6	-3,4	5,1	11	2,5	1,8	4,8
Индолил-акрилоил- $\alpha$ -химотрипсин [4]	-86	132	-122	70	19,4	-3,3	5,8	14	3,9	3,4	4,1
Тозил- $\alpha$ -химотрипсин [5]	-64	106	-161	—	18,6	-2,2	5,0	12	2,4	2,1	4,6
Карбамил- $\alpha$ -химотрипсин [7]	-179	123	171	-40	—	—	—	—	2,7	2,2	4,2

\* Расчетные данные.

в ориентации сложноэфирной группы в активном центре, на что указывают большие отклонения (от  $+70$  до  $-40^\circ$ ) плоскостей  $O^{\gamma}C^{\alpha}C^{\beta}$  ( $\theta_1$ ) от значений в  $R_1$ . Это не может не сказаться на эффективности нуклеофильной атаки  $C'$ -атома молекулой воды. Поскольку это имеет место при эффективном связывании ароматического кольца внутри гидрофобной полости, предположение Гендерсона [4] о том, что правильное взаимодействие в ацилферменте между  $P_1$  и  $S_1$  обеспечивает корректную ориентацию сложноэфирной группы, верно только для истинных субстратов.

Рассчитанная конформация  $R_1$  близка предложенной Сегалем и сопр. [27] модели реального связывания ацильной части N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина (рис. II в Приложении к [27]). В ней также остаток  $P_1$  находится в форме  $R$ , а  $\chi_f^1 \sim -90$ ,  $\chi_f^2 \sim 90$ ,  $\omega_f \sim 180$ ,  $\chi^1 \sim -90$ ,  $\chi^2 \sim 0^\circ$ .

Недавно Полгар и Асбот [11] подвергли сомнению механизм каталитического действия  $\alpha$ -химотрипсина, предложенный Блоу и соавт. [28]. На основе анализа молекулярных моделей авторы [11] предложили новый механизм катализа, в котором все стадии процесса проходят при нативном положении боковой цепи -Ser<sup>-195</sup>. Однако доводы Полгара и Асбота неубедительны. Прежде всего неверно утверждение, что поворот атома  $O^{\gamma}$ -Ser<sup>-195</sup> нереален по стерическим причинам (см. рис. 2). Во-вторых, ошибочно заключение о том, что ацил- $\alpha$ -химотрипсин представляет собой стереохимически напряженный комплекс. Как было показано, продуктивная конформация субстратной компоненты — одна из наиболее предпочтительных форм соответствующей свободной молекулы, т. е. имеется весьма совершенная комплементарность между потенциальной поверхностью активного центра  $\alpha$ -химотрипсина и необходимой для протекания каталитического акта ориентацией всех структурных элементов субстрата. В-третьих, несправедливо также утверждение, что ацилирование фермента в А-состоянии -Ser<sup>-195</sup> приводит к разрыву водородной связи между -His<sup>-57</sup> и -Ser<sup>-195</sup> и, следовательно, к невозможности атаки гистидином уходящей группы субстрата. Например, в тетраэдрических аддуктах трипсина с природными ингибиторами остаток His<sup>57</sup> изменяет свое положение и по-прежнему сохраняет водородную связь с атомом  $O^{\gamma}$ -Ser<sup>-195</sup> [8, 10].

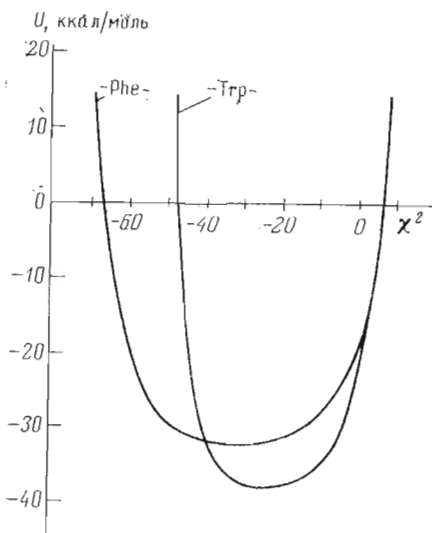


Рис. 6. Потенциальные кривые  $U(\chi^2)$  для боковых цепей -Phe- и -Trp- субстратных компонент N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина и N-ацетил-L-триптофанил- $\alpha$ -химотрипсина

рещен низкоэнергетический конформационный переход  $B \rightarrow R$ , что практически всегда возможно в олигопептидах, наиболее предпочтителен гидролиз с вращением боковой цепи -Ser-<sup>195</sup>. Таким образом, поворот боковой цепи -Ser-<sup>195</sup>, очевидно, обусловлен не невалентными напряжениями в комплексе Михаэлиса [29], а требованием оптимального соответствия между структурами субстратной компоненты и активного центра  $\alpha$ -химотрипсина. Дополнительный путь катализа с сохранением нативного положения боковой цепи -Ser-<sup>195</sup> значительно менее эффективен. Однако он становится актуальным, когда остаток  $P_1$  находится в форме  $B$  и невозможен его переход в форму  $R$ . Следовательно, не исключено, что  $\alpha$ -химотрипсин способен катализировать гидролиз пептидной связи по двум механизмам — с вращением и без вращения боковой цепи Ser<sup>195</sup>. Окончательный вывод о реализации одного из этих механизмов требует расчета на всех стадиях катализа. В настоящей работе это сделано только для ацильного промежуточного продукта.

**II. N-ацетил-L-триптофанил- $\alpha$ -химотрипсин.** Как было показано, размеры гидрофобной полости  $S_1$  активного центра  $\alpha$ -химотрипсина допускают некоторую свободу движения боковой цепи фенилаланина, особенно по углу  $\chi^2$  (рис. 4, в). Представляло интерес выяснить ситуацию, складывающуюся в этом отношении у субстрата с центральным остатком  $P_1$ -Trp-, гидролиз которого  $\alpha$ -химотрипсином при прочих равных условиях протекает наиболее эффективно [30]. Кроме того, исследование субстратной компоненты с -Trp- позволяет непосредственно сопоставить расчетные координаты атомов индольного кольца с найденными экспериментальными значениями.

Переход от -Phe- к -Trp- с его более объемной боковой цепью может привести лишь к уменьшению конформационной свободы субстратной компоненты, но не вызвать появления каких-либо новых, специфических только для индольной боковой цепи пространственных форм. Поэтому при расчете N-ацетил-L-триптофанил- $\alpha$ -химотрипсина в качестве исходной была выбрана продуктивная конформация N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина  $R_1$ . Изменение параметров конформации  $R_1$  в пределах ее низкоэнергетических областей, построение карт для индольной части и последующая минимизация энергии при вариации всех переменных приве-

Возможность гидролиза пептидной связи  $\alpha$ -химотрипсином при нативном положении боковой цепи -Ser-<sup>195</sup> в принципе не исключена. Об этом свидетельствует наличие среди оптимальных форм субстратной компоненты продуктивной конформации  $B_{14}$  с  $\chi^1_j$  62° и отрицательной энергией сорбции (табл. 1). Такой путь гидролиза, однако, никак не вызван невозможностью или энергетической невыгодностью поворота боковой цепи -Ser-<sup>195</sup>. Напротив, состояние  $A$  обеспечивает продуктивное связывание субстратной компоненты в глобальной конформации  $R_1$ . Но каталитический акт при  $A$ -состоянии -Ser-<sup>195</sup> ограничен тем, что его реализация осуществима только при одной ( $R$ ) из двух встречающихся в пептидах и белках пространственных форм ароматических аминокислотных остатков ( $R$  и  $B$ ). Если центральный остаток  $P_1$  находится в форме  $R$  или не запрещен

Таблица 3  
Координаты субстратов N-ацетил-L-триптофан- $\alpha$ -химотрипсина (а) и N-формил-L-триптофана в комплексе с  $\alpha$ -химотрипсином [3] (б)

Атом	Координаты, А						Атом	Координаты, А					
	X		Y		Z			X		Y		Z	
	а	б	а	б	а	б		а	б	а	б	а	б
Боковая цепь -Ser- <sup>105</sup>													
C <sup><math>\beta</math></sup>	15,0	—	0,8	—	7,7	—	C <sup><math>\beta</math></sup>	17,4	16,6	-2,1	-0,5	5,6	5,3
H <sup><math>\beta 1</math></sup>	15,4	—	1,8	—	8,2	—	H <sup><math>\beta 1</math></sup>	17,9	—	-1,6	—	6,5	—
H <sup><math>\beta 2</math></sup>	14,0	—	4,2	—	7,0	—	H <sup><math>\beta 2</math></sup>	16,7	—	-2,8	—	6,0	—
O <sup><math>\gamma</math></sup>	16,0	—	0,4	—	7,0	—	C <sup><math>\gamma</math></sup>	18,4	18,0	-2,7	-1,4	4,8	4,6
Карбонильная группа суб- страта													
C <sup><math>\gamma</math></sup>	15,6	14,8	-0,3	0,9	5,8	4,9	H <sup><math>\delta 1</math></sup>	17,8	—	-2,3	—	2,7	—
O	14,4	13,9	-0,5	0,2	5,5	5,2	N <sup><math>\epsilon 1</math></sup>	19,7	19,3	-3,5	-2,4	3,1	3,1
Основная цепь субстрата													
C <sup><math>z</math></sup>	16,6	16,2	-4,0	0,4	4,9	4,2	H <sup><math>\epsilon 1</math></sup>	20,0	—	-3,7	—	2,1	—
H <sup><math>z</math></sup>	16,1	—	-4,4	—	4,0	—	C <sup><math>\epsilon 2</math></sup>	20,3	19,8	-3,9	-2,8	4,2	4,4
N	17,5	17,1	0,1	4,3	4,4	3,5	H <sup><math>\epsilon 2</math></sup>	21,4	20,8	-4,7	-3,7	4,3	4,8
H	18,1	—	0,4	—	5,1	—	C <sup><math>\eta 2</math></sup>	22,0	—	-5,0	—	3,5	—
C <sup><math>\gamma</math></sup>	17,6	16,9	0,5	1,9	3,2	2,6	H <sup><math>\eta 2</math></sup>	21,8	20,8	-5,0	-3,8	5,6	6,2
O	16,8	16,0	0,4	4,6	2,3	1,7	C <sup><math>\epsilon 3</math></sup>	22,7	—	-5,6	—	5,8	—
C	18,6	—	4,6	—	2,8	—	H <sup><math>\epsilon 3</math></sup>	21,1	20,0	-4,5	-3,4	6,7	7,2
H <sup><math>\gamma</math></sup>	18,5	—	1,9	—	1,8	—	C <sup><math>\epsilon 3</math></sup>	21,5	—	-4,8	—	7,7	—
H <sup><math>\eta</math></sup>	18,4	—	2,5	—	3,4	—	H <sup><math>\epsilon 3</math></sup>	20,0	18,9	-3,8	-2,6	6,5	6,6
H <sup><math>\zeta</math></sup>	19,6	—	4,2	—	3,0	—	H <sup><math>\epsilon 3</math></sup>	19,4	—	-3,4	—	7,4	—
							C <sup><math>\delta 2</math></sup>	19,6	18,8	-3,5	-2,2	5,2	5,4

Примечание. Координаты даны в единой системе с координатами  $\alpha$ -химотрипсина.

ли к следующим значениям двугранных углов субстратной компоненты:  $\chi_f^1 - 72$ ,  $\chi_f^2$  88,  $\omega_f - 179$ ,  $\psi - 57$ ,  $\phi - 110$ ,  $\chi^1 - 60$ ,  $\chi^2 - 21$  и  $\omega$  180°. Сопоставление с данными для  $R_1$  фенилаланинового ацилфермента показывает, что изменения всех углов при замене -Phe- на -Trp- происходят в очень узком интервале значений (ср. с табл. 1). На рис. 6 приведены потенциальные кривые  $U(\chi^2)$  для -Phe- и -Trp-производных, дающие представление о конформационной свободе ароматических частей боковых цепей этих двух остатков. Пределы возможных изменений  $\chi^2$  при  $P_1 = -\text{Trp-}$  по сравнению с  $P_1 = -\text{Phe-}$  сокращаются приблизительно вдвое, хотя по-прежнему остаются достаточно большими ( $\sim 30^\circ$ ). Энергия субстратной компоненты в случае -Trp- составляет  $-37,0$  ккал/моль. Ее понижение на 1,7 ккал/моль по сравнению с -Phe- вызвано дополнительным дисперсионным взаимодействием индольного кольца с гидрофобной полостью фермента. Результаты расчета хорошо согласуются с экспериментом: величины свободной энергии связывания амидов N-ацетил-L-фенилаланина и N-ацетил-L-триптофана  $\alpha$ -химотрипсином равны соответственно  $-1,5$  и  $-2,3$  ккал/моль [31].

В литературе опубликованы данные о координатах атомов индольного кольца в двух комплексах  $\alpha$ -химотрипсина — с N-формил-L-триптофаном [3] и с индолил-акрилоилом [4]. Первый представляет собой невалентный комплекс, у которого ориентация боковой цепи остатка  $P_1$  в гидрофобной полости в принципе может отличаться от таковой в ацилферменте. Второй комплекс является ацильным производным  $\alpha$ -химотрипсина. Однако и в этом случае положение боковой цепи центрального остатка может не совпадать с ее положением в продуктивном комплексе. Боковая цепь индолил-акрилоила имеет лишь одну степень свободы ( $\chi^2$ ), иную длину связи  $C^\alpha-C^\beta$  и другие валентные углы при атоме  $C^\beta$ ; угол  $\chi^1$  закреплен при 180° (в конформации  $R_1$   $\chi^1 \sim -60^\circ$ ). В табл. 3 рассчитанные координаты атомов индола сопоставлены нами с координатами, наблюдающимися в невалентном комплексе [3]. Теоретические и экспериментальные значения  $X$  и  $Z$  практически идентичны; различия по  $Y$  не превышают 1,5 Å и в среднем составляют 1,1 Å, имея одинаковый знак. Следовательно, и в том и другом случае кольцо расположено на одинаковых расстояниях от параллельных стенок гидрофобной полости, но у рассчитанного ацилфермента оно входит в полость приблизительно на 1 Å глубже. Лучшее совпадение имеет место между координатами атомов индольного кольца, рассчитанными для конформации  $R_1$  N-ацетил-L-триптофанил- $\alpha$ -химотрипсина и полученными экспериментально для индолил-акрилоил- $\alpha$ -химотрипсина [4]. Таким образом, проведенный расчет указывает на более глубокое проникновение ароматической боковой цепи субстрата в гидрофобную полость  $\alpha$ -химотрипсина в случае ацилфермента по сравнению с невалентным комплексом Михаэлиса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Липкинд Г. М., Максумов И. С., Попов Е. М. (1975) Биоорган. химия, **1**, 973—984.
2. Schechter I., Berger A. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun., **27**, 157—162.
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. Platzer K. E. B., Momany F. A., Scheraga H. A. (1972) Int. J. Peptide Protein Res., **4**, 201—219.
7. Robillard G. T., Powers J. C., Wilcox P. E. (1972) Biochemistry, **11**, 1773—1784.
8. Rühlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R. (1973) J. Mol. Biol., **77**, 417—436.
9. Blow D. M., Janin J., Sweet R. M. (1974) Nature, **249**, 54—57.
10. Sweet R. M., Wright H. T., Janin J., Chothia C. H., Blow D. M. (1974) Biochemistry, **13**, 4212—4228.
11. Polgar L., Asboth B. (1974) J. Theoret. Biol., **46**, 543—558.
12. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) Biochim. et biophys. acta, **229**, 1—17.

13. Гурская Г. В. (1966) Структура аминокислот, «Наука», М.
14. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Дашевский В. Г. (1968) Молекулярн. биология, 2, 622—630.
15. Плетнев В. З. (1970) Канд дис. «Конформации олигомерных циклических депептидов», М.
16. Birktoft J. J., Blow D. M. (1972) J. Mol. Biol., 68, 187—240.
17. Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S. (1969) Nature, 221, 337—340.
18. Scott R. A., Scheraga H. A. (1966) J. Chem. Phys., 45, 2091—2101.
19. Poland D., Scheraga H. A. (1967) Biochemistry, 6, 3791—3800.
20. Попов Е. М., Дашевский В. Г., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф. (1968) Молекулярн. биология, 2, 612—620.
21. Scheraga H. A. (1968) Adv. Phys. Org. Chem., 6, 103—184.
22. Knowles J. R. (1965) J. Theoret. Biol., 9, 213—221.
23. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. (1971) FEBS Lett., 15, 125—128.
24. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1970) Изв. АН СССР. Сер. хим., 315—322.
25. Cohen S. G., Weinstein S. Y. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 5326—5330.
26. Segal D. M., Powers J. C., Cohen G. H., Davies D. R., Wilcox P. E. (1971) Biochemistry, 10, 3728—3738.
27. Segal D. M., Cohen G. H., Davies D. R., Powers J. C., Wilcox P. E. (1972) Cold Spring Harbor Symp. on Quantitative Biol., 36, 85—90.
28. Blow D. M. (1971) The Enzymes, Third Ed., 3, 185—212.
29. Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J. (1973) Biochemistry, 12, 2035—2041.
30. Zerner B., Bond R. P. M., Bender M. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3674—3679.
31. Foster R. J., Niemann C. (1955) J. Amer. Chem. Soc., 77, 1886—1892.

Поступила в редакцию  
11.VIII.1975

## THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF N-ACETYL-*L*-PHENYLALANYL- AND N-ACETYL-*L*-TRYPTOPHANYL- $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN

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

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

The analysis of all conformational states of two acylenzymes, N-acetyl-*L*-phenylalanyl- and N-acetyl-*L*-tryptophanyl- $\alpha$ -chymotrypsin has been carried out. Only two substrate component conformations are shown to be productive. One retains the native orientation of Ser-195, the backbone of central substrate residue having *B*-form. In the other conformation the main chain is in *R*-form and the Ser-195 side chain orientation coincides with that found experimentally for a number of acyl-enzymes. There is no intramolecular strain in the substrate component. The optimal binding of the substrate aromatic chain in hydrophobic cavity of  $\alpha$ -chymotrypsin is shown to result automatically to the productive orientation of the cleaved group.

---