



УДК 577.156.3.02 : 541.63

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ  
ТЕТРАЭДРИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ, ОБРАЗУЕМЫХ  
 $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНОМ С МЕТИЛАМИДОМ  
N-АЦЕТИЛ-*L*-ФЕНИЛАЛАНИНА  
И N-АЦЕТИЛ-*L*-ФЕНИЛАЛАНИНОМ

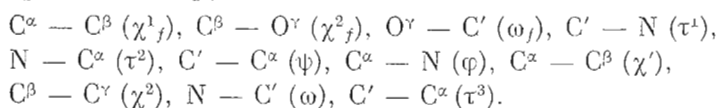
*Дипкин Г. М., Максумов И. С., Касумова Л. И.,  
Попов Е. М.*

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

На основе механической модели молекулы проведен расчет продуктивной ориентации субстратных компонент тетраэдрических комплексов, образующихся при взаимодействии  $\alpha$ -химотрипсина с метиламидом N-ацетил-*L*-фенилаланина и N-ацетил-*L*-фенилаланином. Показана близость конформационных параметров ацильного и тетраэдрического производных фермента. Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными по тетраэдрическим аддуктам трипсина с его ингибиторами.

Для описания каталитического акта, состоящего из ряда взаимообусловленных стадий, помимо геометрии и энергии исходного невалентного комплекса, промежуточных и конечных продуктов необходимо выяснить соответствующие параметры для переходных состояний. Ранее нами были рассмотрены невалентный комплекс N-формил-*L*-триптофана с  $\alpha$ -химотрипсином [1] и ацилферменты N-ацетил-*L*-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсин и N-ацетил-*L*-триптофан- $\alpha$ -химотрипсин [2]. Ниже излагаются результаты исследования методом теоретического конформационного анализа структур тетраэдрических производных, образуемых  $\alpha$ -химотрипсином с метиламидом N-ацетил-*L*-фенилаланина и N-ацетил-*L*-фенилаланином соответственно на стадиях ацилирования и деацилирования [3]. Результаты проведенного расчета сравниваются с рентгеноструктурными данными по тетраэдрическим аддуктам трипсина и ингибиторов из поджелудочной железы быка (PTI) [4] и соевых бобов (STI) [5].

*Расчетная модель и потенциальные функции.* На рис. 1 показана субстратная компонента тетраэдрического комплекса на стадии ацилирования  $\alpha$ -химотрипсина и определяющие ее конформацию двугранные углы вращения вокруг связей



Отсчет углов производится согласно стандартной номенклатуре [6]. Углы  $\omega_f$ ,  $\psi$  и  $\tau^1$  равны нулю при *цис*-ориентации следующих связей:  $O^{\gamma} - C^{\beta}$  и  $C' - C^{\alpha}$ ,  $C' - O^{\gamma}$  и  $N - C^{\alpha}$ .

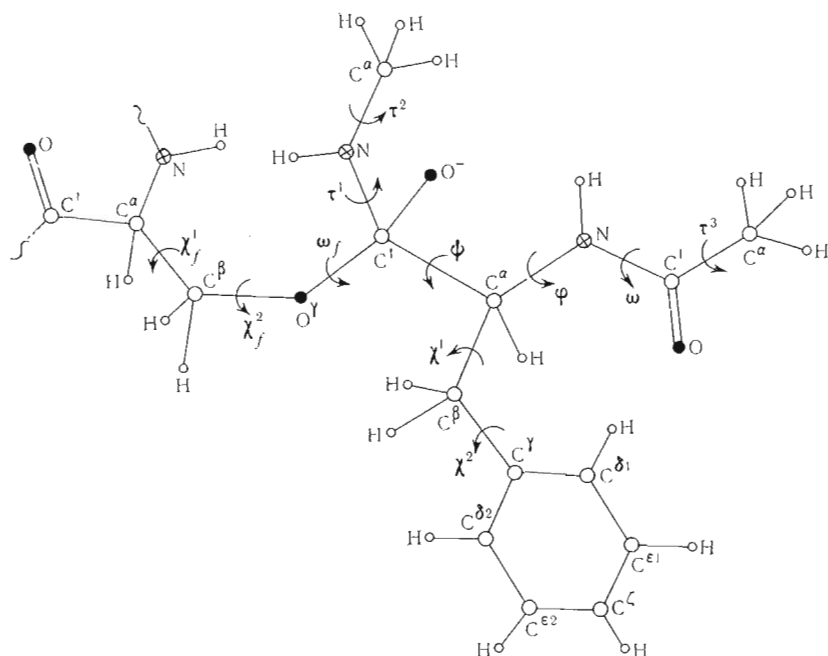
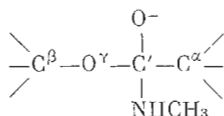


Рис. 1. Расчетная модель тетраэдрического комплекса  $\alpha$ -химотрипсина с метиламидом  $\text{N}$ -ацетил- $L$ -фенилаланина

Расчет проведен при выборе двух наборов значений валентных углов группы



ввиду отсутствия экспериментальных данных по идентичным низкомолекулярным соединениям. В первом случае использованы усредненные значения для углов  $\text{C}^\beta\text{---O}^\gamma\text{---C}^\delta = 110^\circ$  и  $\text{C}^\delta\text{---N---C}^\alpha = 124^\circ$  [7] и идеальные значения для углов при тетраэдрическом атоме углерода  $\text{C}^\delta$  субстрата, равные  $109,5^\circ$ , а во втором — значения, найденные из координат атомов аддукта трипсина с STI [5].

Такое сопоставление позволяет выявить зависимость результатов от значений валентных углов. По этим же координатам были определены длины связей в рассматриваемой группе. Они близки к общепринятым значениям соответствующих валентных связей. Для  $\text{N}$ -ацетил- $L$ -фенилаланина в основной цепи использованы усредненные параметры пептидов [8], в боковой цепи — рентгеноструктурные данные [9].

В расчет включены все остатки активного центра  $\alpha$ -химотрипсина, которые, согласно модели и расчету [10], могут взаимодействовать с субстратной компонентой при различных ее конформациях. К ним относятся остатки 35, 39—43, 55—60, 94, 96—102, 142—143, 189—197, 212—222, 224—228 (всего 676 атомов). Эти остатки, кроме боковой цепи  $\text{---Ser}^{195}$ , были жестко фиксированы в соответствии с координатами, приведенными Бирктофтом и Блоу [11]. Исходя из этих координат, определены положения атомов водорода. В соответствии с механизмом химотрипсинового катализа [3] атом  $\text{N}^{\epsilon 2}$ -His<sup>57</sup>-протонырован. Поиск продуктивной конформации субстратной компоненты производился путем построения сечений потенциальной поверхности с последующей минимизацией энергии по двугранным углам  $\chi^1_f, \chi^2_f, \omega_f, \tau^1, \tau^2, \psi, \phi, \chi^1, \chi^2, \omega, \tau^3$ .

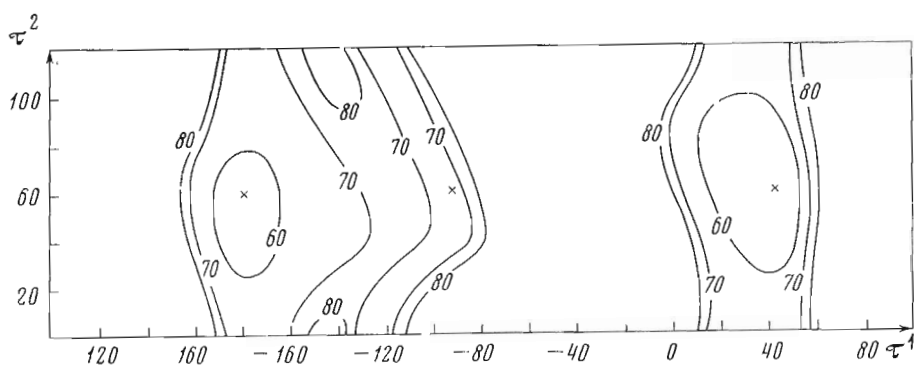
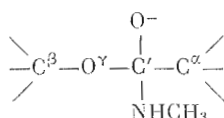


Рис. 2. Сечение потенциальной поверхности  $\tau^1 - \tau^2$  отходящей группы тетраэдрического комплекса

Потенциальная энергия субстратной компоненты и фермент-субстратных взаимодействий определялась при учете невалентных [12] и электростатических [13] взаимодействий, а также торсионного вклада [14] и водородных связей [15]. Более подробно выбор потенциальных функций описан в работе [2]. Заряды на атомах группы



взяты из квантовохимических расчетов аналогичных структур [16].

*Обсуждение результатов расчета.* В основу поиска конформационных параметров тетраэдрических производных  $\alpha$ -химотрипсина были положены результаты теоретического расчета N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина [2]. Анализ потенциальной поверхности связывания ацильной части ацилфермента указывает на ее единственную продуктивную конформацию  $R_1$ , в которой ароматическое кольцо остатка  $P_1^*$  субстрата оптимально связано с ферментом. В этой конформации атом  $O^\gamma$ -Ser<sup>195</sup> повернут от нативного положения примерно на  $180^\circ$ , положение карбонила сложноэфирной группы допускает нуклеофильную атаку молекулой воды, бензольное кольцо располагается в гидрофобной полости приблизительно параллельно ее стенкам. При выборе приближений для минимизации потенциальной энергии мы исходили из предположения минимальных различий в тех элементах структур аддукта и ацилфермента, которые являются общими.

Параметры отходящей метиламинной группы  $\tau^1$  и  $\tau^2$  и представление о ее конформационной свободе были получены из сечения потенциальной поверхности  $\tau^1 - \tau^2$  (рис. 2). При построении этого сечения углы вращения субстратной компоненты с учетом изменения гибридизации карбонильного углерода были фиксированы при значениях углов в варианте  $R_1$  N-ацетил-L-фенилаланин- $\alpha$ -химотрипсина [2]. Из трех допустимых по энергетическому критерию углов  $\tau^1$ , равных  $180^\circ$ ,  $-100^\circ$  и  $40^\circ$ , интерес представляет только угол, равный  $-100^\circ$ . В этом случае метилиминная группа ориентирована продуктивно. Атомы водорода при N<sup>ε2</sup> остатка His<sup>57</sup> и азота отходящей группы находятся друг от друга на расстоянии ван-дер-ваальсовых контактов. Кроме того, вектор, соединяющий эти атомы, совпадает с направлением неподеленной пары азота. Таким образом, по стереохимическим соображениям протонирование этого атома

\* Для обозначения взаимодействующих между собой остатков фермента и субстрата используется номенклатура Шехтера и Бергера [17].

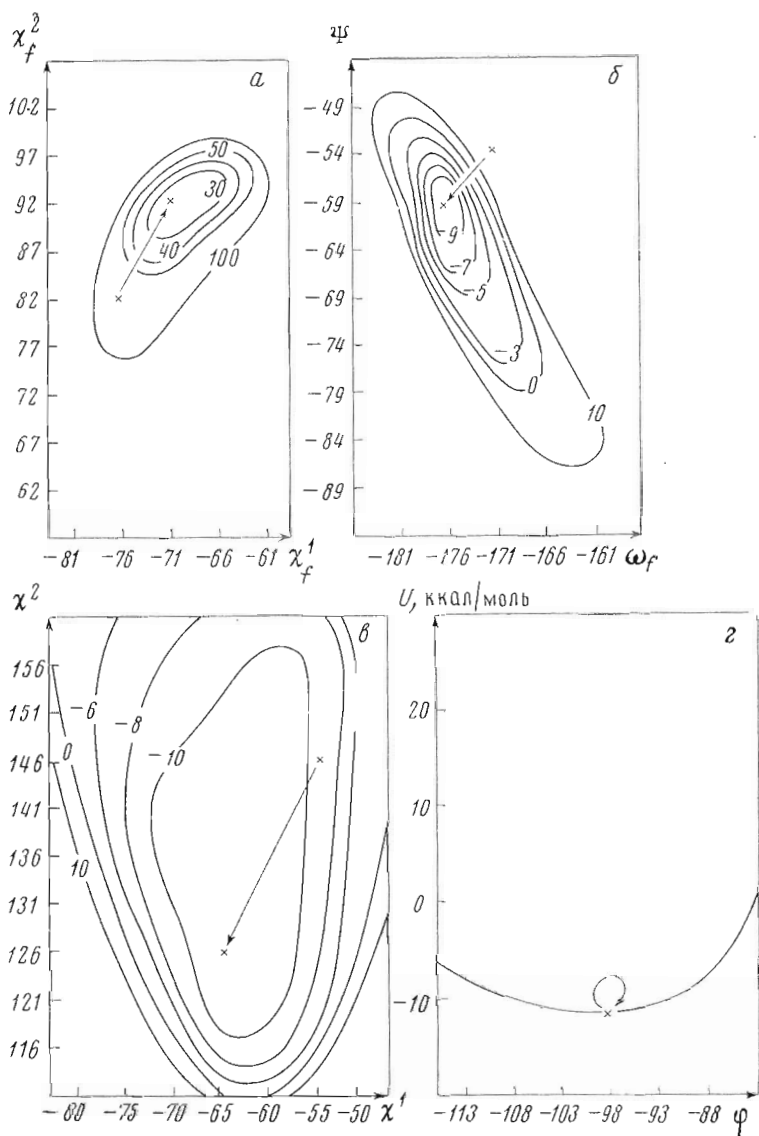


Рис. 3. Сечения потенциальной поверхности  $\chi_f^1 - \chi_f^2$  (а),  $\omega_f - \Psi$  (б),  $\chi^1 - \chi^2$  (в),  $U(\varphi)$  (г) тетраэдрического комплекса  $\alpha$ -химотрипсина с метиламидом N-ацетил-L-фенилаланина

виолне возможно. Папротив, при  $\tau^1 40^\circ$  с His<sup>57</sup> сближен метил отходящей группы. При  $\tau^1 180^\circ$  химическая реакция также нереальна.

Уточнение нулевого приближения для минимизации потенциальной энергии проведено путем последовательного построения конформационных карт  $\chi_f^1 - \chi_f^2$ ,  $\omega_f - \Psi$ ,  $\chi^1 - \chi^2$ ,  $U(\varphi)$ ,  $\tau^1 - \tau^2$ . Сечения потенциальной поверхности приведены на рис. 3, а — г. Каждая последующая карта построена, в соответствии с положениями локальных минимумов на предыдущих картах. Для валентных углов использован указанный выше первый набор параметров. Как и для ацилферментов, наиболее жесткими являются параметры  $\chi_f^1$ ,  $\chi_f^2$ ,  $\omega_f$  и  $\Psi$ , об этом свидетельствует узость эквипотенциалей на рис. 3, а, б. Отклонения этих углов от соответствующих значений в варианте  $R_1$  N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсина (на рисунках к ним проведены стрелки) не превышает 10—15°. Ароматическое кольцо в гидрофобной полости зажато нежестко (рис. 3, в), отклонения

Геометрические и энергетические параметры тетраэдрического комплекса  $\alpha$ -химотрипсина, найденные на основе теоретических ( $R_a$ ) и экспериментальных [5] ( $R_b$  и  $R_c$ ) данных

Вариант	Двугранные углы, град								
	$\chi_f^1$	$\chi_f^2$	$\omega_f$	$\tau^1$	$\psi$	$\varphi$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\omega$
$R_a$	-61	108	-176	-123	-74	-106	-58	141	-179
$R_b$	-61	109	-168	117	-88	-93	-51	145	-178
$R_c$	-37	94	-157	-132	-64	-92	-22	143	173

Продолжение

Вариант	$U$ , ккал/моль	$\theta$ , град	Расстояния, Å			
			C'O...HN (193)	C'O...HN (195)	NH...OC' (214)	N <sup>ε</sup> 2 (57) → N
$R_a$	-36,4	0	2,4	1,8	3,0	3,7
$R_b$	-36,6	8	2,6	1,8	3,6	3,7
$R_c$	-26,0	16	2,6	2,7	3,8	3,4

Примечание. Отсчет энергии  $U$  производится по абсолютной шкале.  $\theta$  — относительная ориентация плоскости атомов C'NHC<sup>α</sup> отходящей группы.

значений угла  $\chi^2$  допустимы в пределах 50°. Угол  $\varphi$  (рис. 3, *г*) также лабилен, однако при генерации субстратной цепи с N-конца диапазон возможных значений должен резко сократиться. Наконец, были уточнены углы  $\tau^1$  и  $\tau^2$ , для которых значения -120 и 100° использовались как наиболее приемлемые. Найденное для конформации  $R_a$  субстратной компоненты аддукта приближение было использовано при минимизации энергии. В таблице приведены оптимизированные параметры этого варианта.

В конформации  $R_a$  тетраэдрического комплекса  $\alpha$ -химотрипсина с метиламидом N-ацетил-L-фенилаланина отрицательно заряженный атом кислорода эфирной группы образует две водородные связи с основными цепями остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup> (расстояния O...N равны соответственно 2,4 и 1,8 Å, таблица). Такие водородные связи имеют место и в ацилферментах [2]. Однако то обстоятельство, что в тетраэдрическом аддукте в водородной связи участвует атом кислорода с избыточным отрицательным зарядом, приводит к ее дополнительной энергетической стабилизации. Это качественное рассуждение в данном расчете не подтверждено количественно, ибо ввиду трудностей аппроксимации параметров водородные связи C=O...H-N и C-O...H-N описывались одним и тем же потенциалом, с оптимальным значением энергии связи, равным 3 ккал/моль. Что касается водородной связи между амидной группой остатка  $P_1$  субстрата и карбонильной группой -Ser<sup>214</sup> фермента, которой придается существенное значение в каталитическом действии  $\alpha$ -химотрипсина [18], то ее отклонение от оптимальной длины составляет 1 Å. Тенденция к образованию этой водородной связи максимальна в тетраэдрическом аддукте. В невалентном комплексе N-формил-L-триптофана с  $\alpha$ -химотрипсином [1] и в ацилферменте N-ацетил-L-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсине [2] эти отклонения равны соответственно 2 и 1,5 Å. Таким образом, полученный результат согласуется с предположением других авторов о стабилизирующей роли водородной связи  $P_1 - S_1$  в тетраэдрическом комплексе [19]. Ее «разрыхленность» в данном расчете может быть обусловлена выбором идеализированных значений валентных углов и отсутствием пептидной цепи с N-конца субстратной компоненты (остатков  $P_2, P_3 \dots$ ). Как уже отмечалось, атом азота отходящей группы в конформации  $R_a$  предрасположен к протонированию остатком -His<sup>57</sup> фермента. Ароматическая боковая цепь

субстратной<sup>7</sup> компоненты располагается глубоко в гидрофобной полости  $\alpha$ -химотрипсина, причем наблюдается небольшое смещение по сравнению с ее положением в ацилферменте: сдвиг центра тяжести бензольного кольца составляет 0,4 Å, но угловая ориентация кольца осталась прежней.

Проведенный расчет показывает, что конформация субстратной компоненты в тетраэдрическом аддукте на стадии деацилирования (комплекс фермента с *N*-ацетил-*L*-фенилаланином) практически совпадает с ее конформацией в аддукте на стадии ацилирования (вариант  $R_a$  таблицы). Замена метилиминогруппы на гидроксильную группу приводит лишь к большей лабильности угла  $\tau^1$ . Если при оптимальном значении этого угла вместо гидроксила отходящей группы поместить молекулу воды, она будет образовывать водородную связь с атомом  $N^{\epsilon 2}$ -His<sup>57</sup> в соответствии с ее ролью нуклеофильного агента на стадии деацилирования [11]. Полная энергия аддукта на стадии деацилирования на 1,5 ккал/моль выше, чем на стадии ацилирования.

Помимо теоретически найденного приближения ( $R_a$ ) для минимизации потенциальной энергии аддукта на стадии ацилирования нами дополнительно были выбраны два приближения ( $R_b$  и  $R_c$ ) на основе экспериментальных значений двугранных углов, полученных в рентгеноструктурном исследовании аддукта трипсина с его ингибитором STI [5]. Поскольку в STI центральным остатком является Arg, для боковой цепи -Phe- исходные параметры  $\chi^1$  и  $\chi^2$  приняты такими же, как в *N*-ацетил-*L*-фенилаланил- $\alpha$ -химотрипсине [2]. Два варианта расчета различаются только тем, что в одном ( $R_b$ ) значения валентных углов сохранены такими же, как в конформации  $R_a$ , а в другом ( $R_c$ ) валентные углы рассчитаны по координатам атомов STI в аддукте с трипсином [5]. После минимизации значения двугранных углов в варианте  $R_b$  с точностью до  $10^\circ$  совпадают со значениями углов в конформации  $R_a$ , а для наиболее жестких углов  $\chi^1_f$ ,  $\chi^2_f$ ,  $\omega_f$  эти различия еще меньше. Полные энергии в обоих случаях одинаковы, а длины некоторых важных водородных связей близки (таблица). Таким образом, конформации  $R_a$  и  $R_b$  соответствуют одному локальному минимуму потенциальной поверхности связывания субстратной компоненты. Этот факт указывает на правильность найденной геометрии для субстратной компоненты тетраэдрического аддукта  $\alpha$ -химотрипсина. Различия в значениях двугранных углов конформеров  $R_a$  и  $R_c$  более существенны, и, что особенно важно, полная энергия у  $R_c$  на 10 ккал/моль выше, чем у  $R_a$  (таблица). Следовательно, экспериментальное приближение для валентных углов субстратной компоненты значительно хуже, чем выбранное нами. Действительно, из значений координат, приведенных в работе [5], следует, что  $C^{\beta}C^{\gamma}C^{\delta}$   $152^\circ$  и  $O^{\gamma}C^{\delta}C^{\epsilon}$   $142^\circ$ , т. е. валентные углы имеют явно аномальные значения. Поскольку в расчетном эксперименте результат зависит от значений всех геометрических параметров, ошибки в величинах отдельных валентных углов приводят к неудачной упаковке всей молекулы субстрата в активном центре.

В конформации  $R_a$  субстратная компонента аддукта не является напряженной по внутримолекулярным взаимодействиям, так как найденные геометрические параметры оптимальны и для субстрата в свободном состоянии [20]. То обстоятельство, что некоторые контакты меньше суммы ван-дер-ваальсовских радиусов (например, расстояния между атомами  $C^{\beta}$ -Ser<sup>195</sup> и N отходящей группы или O<sup>-</sup> фермента равны 2,7 Å), не указывает на относительный проигрыш энергии, так как при других значениях угла  $\omega_f$  адекватные контакты будут возникать с атомом  $C^{\alpha}$ -Phe-. Поэтому вывод Полгара и Асбота [24] о напряженности тетраэдрического аддукта  $\alpha$ -химотрипсина, сделанный на примере расчета абсолютной энергии невалентных отталкиваний групп  $C^{\beta}H_2$ -Ser<sup>195</sup> и  $C^{\alpha}H$ ,  $C^{\beta}H_2$  остатка Phe субстрата (которые, по нашим данным, отсутствуют), необоснован. Как следствие, неверно и предположение о роли водородной связи  $P_1 - S_1$ , которая, по мнению авторов, снимает напряженность в аддукте.

Проведенный расчет показал, что в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина переход тетраэдрический аддукт  $\rightarrow$  ацилфермент  $\rightarrow$  тетраэдрический аддукт происходит с минимальными конформационными перестройками.

В заключение мы хотим выразить искреннюю благодарность проф. В. К. Антонову за постоянное внимание к работе и ценные замечания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Липкинд Г. М., Максумов И. С., Попов Е. М. (1975) Биоорг. химия, 1, 973—984.
2. Максумов И. С., Липкинд Г. М., Попов Е. М. (1976) Биоорг. химия, 2, 632—647.
3. Bender M. L., Kezdy F. J. (1964). J. Amer. Chem. Soc., 86, 3704—3714.
4. Rühlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R. (1973) J. Mol. Biol., 77, 417—436.
5. Sweet R. M., Wright H. T., Janin J., Chothia C. H., Blow D. M. (1974) Biochemistry, 13, 4212—4228.
6. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) Biochim. et biophys. acta, 229, 1—17.
7. Sutton L. E. (Ed.) (1958) Tables of Interatomic Distances and Configurations in Molecules and Ions, The Chemical Soc., London.
8. Попов Е. М., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Дашевский В. Г. (1968) Молекулярн. биология, 2, 622—630.
9. Гурская Г. В. (1966) Структура аминокислот, «Наука», М.
10. Platzer K. E. V., Momany F. A., Scheraga H. A. (1972) Int. J. Peptide Protein Res., 4, 201—219.
11. Birktoft J. J., Blow D. M. (1972) J. Mol. Biol., 68, 187—240.
12. Scott R. A., Scheraga H. A. (1966) J. Chem. Phys., 45, 2091—2101.
13. Poland D., Scheraga H. A. (1967) Biochemistry, 6, 3791—3800.
14. Scheraga H. A. (1968) Adv. Phys. Org. Chem., 6, 103—184.
15. Попов Е. М., Дашевский В. Г., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф. (1968) Молекулярн. биология, 2, 612—620.
16. Бурштейн К. Я., Хурин Ю. И. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 579—584.
17. Schechter I., Berger A. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 157—162.
18. Peterson R. L., Hubele K. W., Niemann C. (1963) Biochemistry, 2, 942—946.
19. Blow D. M., Janin J., Sweet R. M. (1974) Nature, 249, 54—57.
20. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. (1970) Изв. АН СССР. Сер. хим., 315—322.
21. Polgar L., Asboth B. (1974) J. Theor. Biol., 46, 543—558.

Поступила в редакцию  
14.VIII.1975

#### THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF TETRAHEDRAL COMPLEXES FORMED BY $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN WITH N-ACETYL-*L*-PHENYLALANINE AND N-ACETYL-*L*-PHENYLALANINE METHYLAMIDE

LIPKIND G. M., MAKUMOV I. S., KASUMOVA L. I.,  
ПОПОВ Е. М.

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

The productive orientation of the substrate component of tetrahedral complexes formed by  $\alpha$ -chymotrypsin with N-acetyl-*L*-phenylalanine and N-acetyl-*L*-phenylalanine methylamide was calculated basing on the mechanical model. A similarity in conformational parameters of acyl and tetrahedral enzyme derivatives was shown. The results obtained are in agreement with the experimental data on tetrahedral complexes of trypsin inhibitors.