

Л. В. Карабут, И. Е. Щечкин, А. А. Серейская

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА УЗНАВАНИЯ ФИБРИНОГЕНА ТРОМБИНОМ

Комплекс узнавания фибриногена тромбином, состоящий из дополнительного центра (ДЦ) связывания фермента и комплементарного ему сайта (КС) на Аα-цепи фибриногена, изучали с помощью молекулярного моделирования и конформационного анализа. Показано возникновение четырех водородных связей между ДЦ и КС, расстояние между донорскими и акцепторными атомами находится в пределах 2,0—2,2 Å. Конформационные расчеты свидетельствуют о том, что подобные взаимодействия могут обеспечить образование энергетически выгодного и стерически разрешенного комплекса recognition фибриноген—тромбин вне границ активного центра последнего.

Предлагается гипотеза об усилении каталитического процесса вследствие конформационных изменений, сопровождающих формирование комплекса узнавания.

Введение. Узкая специфичность тромбина, проявляемая им при выполнении основных физиологических функций, зависит от дополнительного центра (ДЦ) узнавания — связывания высокомолекулярных субстратов, отделенного от активного. ДЦ имеет катионную природу и сформирован, в основном, за счет структурных петель β и γ Б-цепи тромбина [1—3]. «Узнавая» специфический субстрат, ДЦ связывается с неким анионным участком субстрата, удаленным от расщепляемой связи, которая вследствие этого попадает в активный центр фермента. На фибриногене человека этот участок, называемый комплементарным сайтом (КС), находится в пределах последовательности 34—51 Аα-цепи (расщепляемая связь 16—17) [4]. По нашей гипотезе, ДЦ не только обеспечивает высокую селективность гидролиза, но и усиливает действие каталитического аппарата. Основанием для этой гипотезы послужило то, что 1) фибриноген весьма эффективно расщепляется тромбином, но его строение в области гидролизуемой связи не соответствует структуре вторичной связывающей зоны активного центра [5]; 2) формы тромбина с поврежденными ДЦ практически не свертывают фибриноген, хотя их активный центр не нарушен [6—9].

К настоящему моменту проведен рентгеноструктурный анализ комплексов тромбина с низко- и высокомолекулярными ингибиторами [10—11]. Наша задача состояла в изучении механизма связывания тромбина с фибриногеном вне области активного центра и выяснении возможности влияния взаимодействия ДЦ—КС на каталитический процесс в целом.

Материалы и методы. С помощью методов молекулярного моделирования и конформационных расчетов была исследована модельная система, состоящая из двух компонентов: β-петли Arg67—Lys81 ДЦ тромбина и основного участка КС фибриногена Asp38—Lys44 Аα-цепи. Исходная структура тромбина была взята, согласно данным РСА тромбина, в комплексе с низкомолекулярным ингибитором (координаты любезно предоставлены др. Боде, Германия), а для КС фибриногена принимали стандартную структуру β-листа.

Для предварительного представления о пространственном строении тромбина использовали сконструированную ранее скелетно-проволочную модель [12]. Затем из набора, выпускаемого Тартуским университетом (Др. Микельсаар, Эстония), была собрана прецизионная атомно-моле-

кулярная модель, позволяющая провести анализ возможных вариантов связывания ДЦ—КС. При поиске оптимальных структур использовали пакет конформационных программ И. Е. Щечкина и В. Е. Хуторского.

Задачу построения комплекса решали в два этапа: сначала генерировали структуру, в которой рассматриваемые пары атомов были бы пространственно сближены и в то же время не имелось стерически недопустимых контактов между атомами. Для генерации таких структур была разработана специальная методика. Полученную приближенную структуру комплекса подвергали процедуре минимизации энергии по методу атом-атомных потенциалов Элинжера.

Результаты и обсуждение. Анализировали структуру β -петли Б-цепи тромбина в составе свободного фермента и в качестве ДЦ в комплексе с КС фибриногена. Детальное строение остальных частей молекулы не рассматривалось. Такое упрощение, связанное, прежде всего, с ограниченностью наших вычислительных ресурсов, привело к расширению множества возможных вариантов связывания. Однако это не помешало решить вопрос в принципе, т. е. определить энергию связывания и оценить, достаточна ли она для формирования устойчивого комплекса ДЦ—КС. Используемые нами методы позволили из полученного множества вариантов связывания отобрать наиболее вероятные, установить, какие именно группы и в какой степени вносят вклад в энергию связи.

В результате проведенной работы найдено структурное состояние системы ДЦ—КС, которое отличает значительная энергия взаимодействия между частями комплекса ($-68,0$ ккал/моль). В этой системе образуются четыре водородные связи между атомами заряженных групп боковых радикалов аминокислотных остатков ДЦ—КС (табл. 1). Энергия их взаимодействия составляет $-30,8$ ккал/моль. В энергию связи комплекса существенный вклад вносят также притяжения других заряженных групп системы ДЦ—КС ($-32,7$ ккал/моль), так что общая энергия электростатического притяжения составляет $-63,5$ ккал/моль.

Следует отметить отсутствие стерических затруднений во взаимодействии фибриноген—тромбин (энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий составляет $-4,7$ ккал/моль), что объясняется большой длиной боковых цепей взаимодействующих остатков, позволяющих основным цепям молекул свободно располагаться вдали друг от друга.

Естественно, что при соединении в комплекс внутренние энергии составляющих его частей увеличиваются, поскольку на каждую из частей накладываются дополнительные ограничения. В нашем случае энергия ДЦ в комплексе возросла на $10,2$ ккал/моль, а энергия КС — на $13,0$ ккал/моль. При этом увеличение энергии в обеих молекулах происходит за счет увеличения всех компонент энергии. Таким образом, уменьшение энергии при связывании фибриноген—тромбин составляет $45,0$ ккал/моль. Такое значение энергии связи, по-видимому, слишком велико. Однако следует принять во внимание, что оно получено без учета, во-первых, возможных взаимодействий между ДЦ и основной глобулой тромбина (энергия которого, вероятно, увеличится при деформации ДЦ); во-вторых, возможного существования более энергетически выгодных состояний свободной молекулы фибриногена и, в-третьих, влияния гидратации молекул.

Следовательно, можно считать обоснованным тот факт, что образование четырех водородных связей между β -петлями тромбина и участ-

Таблица 1
Образование водородных связей в комплексе ДЦ—КС

Фибриноген	Тромбин	Расстояние, Å	Фибриноген	Тромбин	Расстояние, Å
OD1 Asp38	NH1 Arg73	2,0	OD1 Asp40	NH1 Arg67	2,1
OE1 Glu39	NZ Lys70	2,2	NZ Lys44	OE1 Glu80	2,2

ком 38—44 А α -цепи фибриногена приводит к формированию энергетически выгодного и стерически разрешенного комплекса тромбина и фибриногена вне области активного центра.

Образование комплекса сопровождается изменением начальной структуры как КС фибриногена, так и ДЦ тромбина. Структура ДЦ тромбина (его β -петли) значительно модифицировалась. Интактный ДЦ имел вид изогнутой петли (рис. 1). Ее верхняя и нижняя ветви располагались одна под другой, а изгиб был направлен вперед. В результате взаимодействия с фибриногеном петля разогнулась, повернулась приблизительно на 90° и приобрела винтообразную форму (рис. 2). Наибольшие изменения коснулись участка, находящегося на изгибе петли (Arg73—Glu77), наименьшие — геометрии остатков возле «основания» петли (Arg67—Gly69, Ile79—Lys81) (рис. 1, 2). Другая группа атомов, значительно сместившихся пространственно, относится к атомам боковых радикалов аминокислотных остатков, вокруг С α -атомов которых происходило вращение при разгибании и повороте петли Arg67—Lys81 (табл. 2, пп. 1, 3, 5, 6). Заряженные атомы боковых радикалов аминокислотных

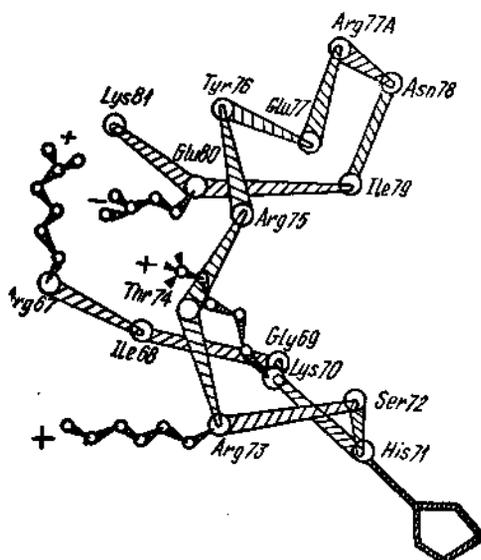


Рис. 1. Строение β -петли дополнительного центра тромбина

остатков ДЦ, формирующих ионный кластер и образующих водородные связи с остатками КС фибриногена (Arg67, Lys70, Arg73, Glu80), не подверглись значительному пространственному смещению (рис. 1, 2; табл. 2, пп. 2, 4).

Сближение обоих лигандов в результате связывания их дальнедействующими взаимодействиями сопровождается изменением конформации и делает возможным гидрофобные и иного рода ближние взаимодействия. Это хорошо видно при сравнении компьютерных изображений свободной β -петли и в составе комплекса ДЦ—КС. В таких гидрофобных взаимодействиях может участвовать и остаток Trp148 γ -петли тромбина, по данным РСА, затрудняющий вход расщепляемой связи высокомолекулярного субстрата в каталитическую щель [10]. При об-

Таблица 2

Расстояния между основными заряженными группами ДЦ тромбина до и после взаимодействия с КС фибриногена

Пары заряженных атомов боковых радикалов аминокислотных остатков ДЦ тромбина	Расстояние, Å		Пары заряженных атомов боковых радикалов аминокислотных остатков ДЦ тромбина	Расстояние, Å	
	Интактный тромбин	Тромбин в комплексе		Интактный тромбин	Тромбин в комплексе
1. NH1 Arg67 — NZ Lys70	5,6	11,4	4. NH1 Arg67 — OE1 Glu80	5,9	7,9
2. NZ Lys70 — NH1 Arg73	10,4	10,0	5. NZ Lys70 — OE1 Glu80	3,3	16,8
3. NH1 Arg73 — NH1 Arg67	10,9	14,9	6. NH1 Arg73 — OE1 Glu80	12,5	20,1

разовании комплекса ДЦ—КС вероятно переориентация заряженных групп, водородных связей и т. д. из района контакта КС фибриногена и ДЦ тромбина на внутримолекулярные области фермента: сначала между петлями β и γ , а затем и на активный центр. В результате индуцируются изменения в активном центре, благодаря которым гидролиз фибриногена идет так же эффективно, как и адекватных по вторичной

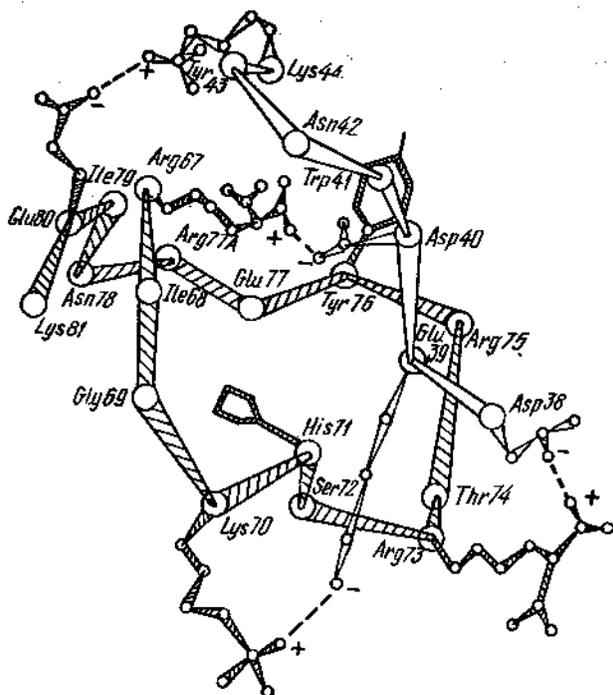


Рис. 2. Структура комплекса ДЦ тромбина—КС фибриногена

специфичности субстратов. Этому индукционному процессу способствуют особенности строения β - и γ -петель — они относительно подвижны, не имеют жесткой вторичной структуры, связаны со всей глобулой только у основания, остальная же часть их выступает над поверхностью.

Изучение локализации реакционно способных групп аминокислотных остатков β - и γ -петель на модели тромбина и энергетические расчеты дают основание предложить три варианта сопряжения ДЦ с активным центром:

1) оттягивание остатка Trp148 от входа в каталитическую щель активного центра в результате прямого гидрофобного контакта с ароматическими остатками КС фибриногена (например с Trp33) или перераспределение водородных связей в ДЦ с участием ароматических остатков триптофана β -петли;

2) переключение каталитического механизма с однопротонного на двухпротонный вследствие смещения каких-либо остатков (например, His71 ДЦ) в направлении активного Ser195, что дает им возможность принять на себя функцию дополнительного (наряду с His57) донора-акцептора протона системы переноса заряда;

3) изменение конформации, смещение какого-либо из остатков каталитической триады (например, поворот плоскости имидазольного кольца His57), которое сокращает расстояние между ними и облегчает функционирование релейной системы переноса протона.

МОДЕЛЮВАННЯ КОМПЛЕКСУ ВПІЗНАВАННЯ ФІБРИНОГЕНА ТРОМБІНОМ

Резюме

Комплекс впізнавання фібриногена тромбіном, що складається з додаткового центра (ДЦ) зв'язування ферменту та комплементарного йому сайта (КС) на α -ланцюзі фібриногена, вивчали за допомогою молекулярного моделювання та конформаційного аналізу. Показано утворення чотирьох водневих зв'язків між ДЦ та КС, відстань між донорськими та акцепторними атомами лежить у межах 2,0—2,2 А. Конформаційні розрахунки стверджують, що ці взаємодії спроможні забезпечити створення енергетично вигідного та стерично дозволеного комплексу рекогніції фібриноген—тромбін поза межами активного центру останнього.

Пропонується гіпотеза щодо підсилення каталітичного процесу внаслідок конформаційних змін, які супроводжують формування комплексу рекогніції.

L. V. Karabut, I. E. Shchekhin, A. A. Serejskaya

MODELLING OF THROMBIN-FIBRINOGEN RECOGNITION COMPLEX

Summary

Fibrinogen-thrombin recognition complex consisting of enzyme additional binding exosite (ABE) and complementary site (CS) in fibrinogen α -chain has been investigated by means of molecular modelling and conformational computer simulations. It is revealed that four hydrogen bonds between ABE and CS occur the distance between donor and acceptor atoms being 2.0—2.2 Å. Energy estimations show that these interactions can ensure creation of energetically reliable complex of the thrombin with fibrinogen beyond the enzyme active center. Hypothesis is proposed that conformational changes arising in consequence of recognition complex formation may lead to promotion of catalytical process.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fenton J. W. Thrombin specificity // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1981.—370.—P. 468—495.
2. Серейська А. А. О суперспецифичности тромбина // *Молекуляр. биология.*—Киев: Наук. думка, 1980.—27.—С. 68—79.
3. Fenton J. W., Olsson T., Zabinski M. et al. Anion-binding exosite of human α -thrombin and fibrin(ogen) recognition // *Biochemistry.*—1988.—27, N 18.—P. 7106—7112.
4. Blomback B. Specificity of thrombin and its action on fibrinogen // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1986.—485.—P. 120—123.
5. Fenton J. W. Thrombin bioregulatory functions // *Adv. Clin. Enzymol.*—1988.—6.—P. 186—193.
6. Seegers W., Hassouna H., Walz G. et al. Prothrombin and thrombin. Selected aspects of thrombin formation, properties, inhibition and immunology // *Semin. Thr. Hemost.*—1975.—1.—P. 211—283.
7. Hofsteenge J., Braun P. J., Stone S. R. Enzymatic properties of proteolytic derivatives of human α -thrombin // *Biochemistry.*—1988.—27.—P. 2144—2151.
8. Henriksen R. A., Mann K. G. Identification of primary structural defect in dysthrombin Quick I // *Ibid.*—N 26.—P. 9161—9165.
9. Le Bonniec B. F., Quinto E. R., MacGillivray R. T. A. et al. Role of thrombin's Tyr-Pro-Trp motif in interaction with fibrinogen, thrombomodulin, protein C, AT 3 and Kunitz inhibitors // *J. Biol. Chem.*—1993.—268, N 25.—P. 19055—19061.
10. Bode W., Mayr I., Baumann U. et al. Refined 1,9 Å crystal structure of human α -thrombin // *EMBO J.*—1989.—8.—P. 3467—3475.
11. Rydel T. J., Tulinsky A., Bode W., Huber R. Refined structure of hirudin-thrombin complex // *J. Mol. Biol.*—1991.—221.—P. 583—601.
12. Серейська А. А., Карабуг Л. В., Смирнова І. В., Щечкін І. Є. О взаємодії додаткового центра тромбіна з комплементарним сайтом фібриногена // *Докл. АН України.*—1991.—№ 11.—С. 140—143.
13. Карабуг Л. В., Серейська А. А. Особливості строєння контактної зони тромбіна. Возможные механизмы взаимодействия его с низко- и высокомолекулярными субстратами // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 5.—С. 31—35.