

22. Nishikawa K., Ooi T. Amino acid sequence homology applied to the prediction of protein secondary structures, and joint prediction with existing methods // *Biochim. et biophys. acta.*—1986.—871, N 1.— P. 45—54.
23. Nishikawa K., Noguchi T., Konishi Y. Highly reliable secondary structure prediction of proteins by a new joint method // *Prot. Engng.*—1990.—3, N 4.— P. 283—284.
24. Ptitsyn O. B., Finkelstein A. V. Theory of protein secondary structure and algorithm of its prediction // *Biopolymers.*—1983.—22, N 1.— P. 15—25.
25. Ptitsyn O. B., Finkelstein A. V. Prediction of protein secondary structure based on physical theory. Histones // *Prot. Engng.*—1989.—2.— P. 443—447.
26. Qian N., Sejnowski T. J. Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models // *J. Mol. Biol.*—1988.—202.— P. 865—884.
27. Schiffer M., Edmundson A. B. Use of helical wheels to represent the structures of protein and a identify segments with helical potential // *Biophysics.*—1967.—7, N 1.— P. 121—135.
28. Sternberg M. J. E., Islam S. A. Local protein sequence similarity does not imply a structural relationship // *Prot. Engng.*—1990.—4, N 2.— P. 125—131.
29. Sweet R. M. Evolutionary similarity among peptide segments is a basis for prediction of protein folding // *Biopolymers.*—1986.—25.— P. 1565—1577.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН Украины, Киев

Получено 22.05.92

УДК 577.344

Л. В. Карабут, А. А. Серейская

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ КОНТАКТНОЙ ЗОНЫ ТРОМБИНА. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЕГО С НИЗКО- И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ СУБСТРАТАМИ

Показаны особенности строения активного центра тромбина и его вторичного связывающего участка. Рассмотрены альтернативные механизмы взаимодействия тромбина с низко- и высокомолекулярными субстратами, а также возможная роль так называемого дополнительного центра в образовании продуктивного фермент-субстратного комплекса.

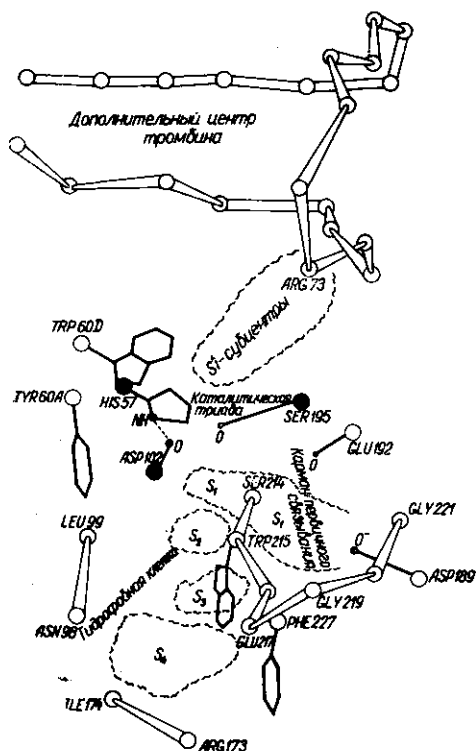
Тромбин (КФ 3.4.21.5) — ключевой фермент системы свертывания крови, является сериновой протеиназой трипсиноподобного действия. В ходе субстратного и ингибиторного анализа нативного и модифицированного тромбина были обнаружены характерные черты строения активного центра (АЦ) фермента и особенности взаимодействия его с различными лигандами [1—3]. Полученные результаты нашли свое подтверждение и дальнейшую детализацию при рентгеноструктурном анализе (РСА) комплекса тромбина с низкомолекулярным ингибитором [4]. В работах [5, 6] обсуждалась роль так называемого дополнительного центра (ДЦ) тромбина в эффективном гидролизе специфического высокомолекулярного субстрата — фибриногена. Конструирование и рассмотрение атомно-молекулярной и скелетно-проволочной модели фермента [7] позволило нам сформулировать некоторые гипотезы, касающиеся сопряжения указанного дополнительного центра с активным центром.

На основании этих данных можно представить себе структуру АЦ фермента следующим образом. Субцентры фермента, т. е. участки белка, взаимодействующие с конкретным аминокислотным остатком субстрата, формируются за счет нескольких аминокислотных остатков белковой молекулы, причем один и тот же остаток может участвовать в создании различных субцентров. Например, его боковой радикал может находиться в составе одного субцентра, а участок главной цепи — в составе другого.

Карман первичного связывания тромбина входит в субцентр S₁. На его дне находится остаток Asp189, боковой радикал которого своим карбоксилем ориентирован навстречу гуанидиновой группе остатка

© Л. В. Карабут, А. А. Серейская, 1992

аргинина субстрата (P_1) (рис. 1). Стенки кармана формируются остатками Гли221, Цис220, Гли219, Гли216, Трп215, Фен227, расположенными так, что гуанидиновый радикал аргинина (P_1) оказывается в гидрофобном окружении. По сравнению с трипсином карман первичного связывания тромбина менее «глубок» и поэтому в нем способна разместиться лишь гуанидиновая часть боковой цепи аргинина



(P_1), а его углеводородная часть выступает из кармана и не фиксируется. Помимо солевой связи с карбоксилем Асп189, гуанидиновая группа связывается с аминокислотами обеих стенок кармана: водородными связями — с Гли219 и через молекулу воды — с Гли216. Ионные взаимодействия с Асп189 у тромбина, возможно, ослаблены из-за близости положительно заряженной вставки Арг187-Гли188. По своей форме карман первичного связывания представляет собой узкую, слегка изогнутую, закрытую полость.

Аргининовый участок основной цепи субстрата фиксируется на ферменте (вне пределов кармана первичного связывания) двумя водородными связями: от атома кислорода карбонильной группы расщепляемой связи к

Рис. 1. Схема строения функциональных участков тромбина

гидроксилу реакционноспособного Сер195 и от NH-группы аргинина к карбонильному кислороду Сер214. Последний входит в субцентр S_1 . От него начинается сегмент $S_1 - S_3$ (Сер214-Трп215-Гли216) полипептидной цепи тромбина, образующий антипараллельный складчатый лист с участком $P_1 - P_3$ субстрата. В то же время остатки Трп215 (S_2) и Гли216 (S_3) организуют стенку кармана первичного связывания (см. рис. 1), которая как бы «отделяет» боковую цепь аргинина (P_1) от расщепляемой части основной цепи субстрата, а также от подцентров P_2 , P_3 . Ароматическая часть Трп215 участвует в создании аполярной полости — так называемой гидрофобной клетки, которую формируют также боковые цепи Иле174, Гис57, Тир60А, Трп60Д и Асн98, Лей99. Эта структура представляет собой одну из главных архитектурных особенностей АЦ тромбина (у трипсина ее нет).

Образую β -складчатый лист с участком $S_1 - S_3$ фермента, главная цепь субстрата огибает стенку кармана первичного связывания и располагается почти параллельно боковому радикалу аргинина (P_1). Для реализации такой конформации необходимо, чтобы остаток в P_2 субстрата был способен к изгибу и имел бы не слишком большие размеры, иначе возникнут неблагоприятные контакты со стенкой кармана, что может отрицательно сказываться на эффективности катализа. Этому условию удовлетворяют остатки Про или Гли. По сравнению с ними Вал в P_2 менее эффективен.

Гидрофобная клетка включает также следующий субцентр S_3 . Он тоже пространственно ограничен и не может размещать заместители субстрата больших размеров. Благодаря изгибу пептидной цепи тромбина Гли216 (S_3) располагается достаточно близко от Асп189. Кроме

того, между карбонильной группой Гли216 и NH-группой остатка, локализованного в подцентре P_2 субстрата, возникает водородная связь.

Гидрофобная клетка включает в себя и субцентр S_4 (см. рис. 1). В нем также имеется остаток, отсутствующий у трипсина, — Глу217. Взаимодействия в этом субцентре, по-видимому, не столь чувствительны к размерам остатка в P_4 , так как здесь нет тесного контакта с субстратом. Это обстоятельство и является причиной меньшей чувствительности S_4 к природе заместителей соответствующих подцентров пептида, чем субцентров S_2 и S_3 .

На модели видно, что субцентры S_2 — S_4 направлены вниз от входа в карман первичного связывания. На выходе из кармана располагается О⁻-атом остатка Сер195 каталитической триады АЦ. Вблизи от него находятся остальные элементы триады — Гис57 и Асп102. Вместе с Сер195 они образуют систему переноса заряда, которая и осуществляет химическое расщепление чувствительной связи. Справа и несколько вверх от Сер195 субцентры тромбина S'_1 — S'_2 ... формируют открытую бороздку, простирающуюся от входа в карман к ДЦ. Возможно, что некоторые аминокислотные остатки ДЦ (например, Арг-73) участвуют в образовании S'_i субцентра фермента (см. рис. 1).

Таким образом, зона связывающего центра тромбина может быть представлена как бы двумя участками. Сверху размещены субцентры, с которыми контактирует правая часть субстрата (уходящая группа). Снизу располагаются участки гидрофобной природы, с которыми взаимодействует ациламидная часть пептида. Между ними находится щель АЦ. Сам карман ориентирован так, что одна из его стенок лежит ниже другой. Можно предположить, что для эффективного гидролиза связи Арг — X(P_1 — P'_1) необходимо выполнение следующих условий: а) относительно беспрепятственное продвижение субстрата к каталитической триаде; б) фиксирование расщепляемой связи в оптимальной конформации относительно реакционноспособных групп фермента; в) достаточно быстрое удаление продуктов реакции.

Рассмотрим, как реализуются эти условия при гидролизе тромбином низко- и высокомолекулярных субстратов. Существуют по крайней мере две возможности выполнения условий а) и б): движение субстрата «сверху» вдоль борозды, т. е. вдоль участка S' -субсайтов, и «снизу», вдоль зоны S-субсайтов. Каждая из этих возможностей имеет свои преимущества и недостатки. Мы предполагаем, что связывание тромбином высоко- и низкомолекулярных субстратов осуществляется по-разному.

Результаты моделирования свидетельствуют о том, что из-за особого расположения кармана первичного связывания вхождение в него и фиксирование там бокового радикала Арг(P_1) не всегда происходит беспрепятственно при движении субстрата «сверху вниз». Поскольку структура даже такого специфического субстрата, как фибриноген, не оптимальна для контакта с аполярным участком S_2 — S_4 тромбина [8], можно допустить, что первичное узнавание — связывание физиологического субстрата происходит не на этом участке, а сначала в зоне ДЦ (см. рис. 1). Лишь после указанного контакта боковая цепь Арг(P_1) фиксируется в кармане первичного связывания (S_1).

При образовании фермент-субстратного комплекса можно, следовательно, предложить такую последовательность событий: сначала происходит контакт комплементарного участка фибриногена, удаленного от расщепляемой связи примерно на 20 аминокислотных остатков [7], с ДЦ тромбина за счет ионных взаимодействий. Такое фиксирование субстрата приводит к некоторому изменению конформации пептида и функциональных участков фермента, а также к резкому ограничению степеней свободы пептида и обуславливает возможность появления продуктивного комплекса. При этом между белками могут образовываться следующие ионные пары: Арг67 и Асп38, Лиз70 и Глу39, Арг73 и Асп40, Глу77 (80) и Лиз44 (рис. 2). Не исключены также гидрофобные контакты между Тир76 и Тир43, а также формирова-

ние водородных связей (например, между карбонильным кислородом Тре74 и ND₂-атомом Асн42). Судя по результатам моделирования, при этом возможно весьма заметное смещение остатка Арг73, что, по-видимому, имеет функциональное значение, так как, по данным РСА [4], он входит в субцентр S'_i тромбина. В настоящее время производятся расчеты вероятности такого связывания.

Благодаря указанным взаимодействиям субстрат «укладывается» в открытую бороздку, и возникают взаимодействия между подцентрами P'_i субстрата и соответствующими субцентрами S'_i фермента. По

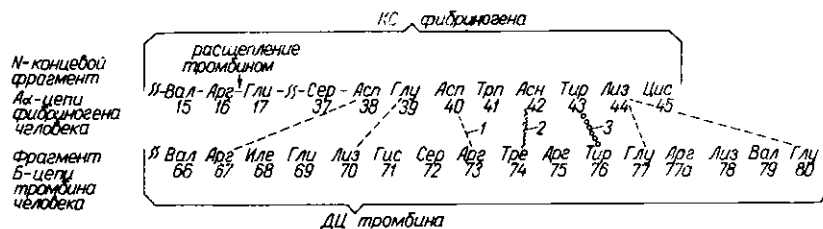


Рис. 2. Схема возможных взаимодействий ДЦ тромбина и КС фибриногена: 1 — ионные взаимодействия; 2 — водородная связь; 3 — гидрофобные взаимодействия

мере укладки сверху вниз боковой радикал Арг(P₁) входит в карман первичного связывания и строго фиксируется там. При такой последовательности событий протяженная правая часть (уходящая группа) субстрата не служит помехой для правильной фиксации гуанидина в кармане первичного связывания, а, наоборот, способствует и даже предопределяет образование продуктивного комплекса, при котором гидролизующая связь оказывается в благоприятном для катализа положении. Формирование такого комплекса приводит, по-видимому, также к определенному изменению конформации тромбина в АЦ.

В противоположность этому, взаимодействие с низкомолекулярными субстратами происходит, очевидно, по-другому. Поскольку у этих пептидов отсутствует участок, комплементарный ДЦ тромбина, для них возможно образование различных непродуктивных комплексов, прежде чем боковая цепь Арг(P₁) попадает в щель АЦ. На компьютерно-графической модели АЦ тромбина было установлено, что в этом случае отсутствие протяженной правой части субстрата (P'_i-подцентры) создает стерические возможности для выбора варианта связывания, что в конечном итоге приводит к появлению продуктивного комплекса. Комплементарное взаимодействие подцентров P₁ — P₄ низкомолекулярного субстрата с гидрофобной клеткой зоны вторичного связывания тромбина (S_i-субсайты) (см. рис. 1) приводит к окончательной фиксации оптимальной структуры продуктивного комплекса.

При этом не исключена альтернатива — движение субстрата «снизу вверх». Сначала взаимодействуют субцентры P₂ — P₄ субстрата с субсайтами S₂ — S₄ тромбина, что создает условия для надлежащей фиксации гуанидиновой группы Арг(P₁) в кармане первичного связывания и расщепляемой связи в каталитическом центре.

Таким образом, данные изучения пространственной структуры тромбина и его АЦ позволяют предположить, что при взаимодействии фермента с высокомолекулярным физиологическим субстратом (фибриногеном) и низкомолекулярными пептидами реализуются различные механизмы образования продуктивного комплекса: укладка полипептидной цепи фибриногена «сверху вниз» и низкомолекулярного субстрата — «снизу вверх». Высокая эффективность катализа может быть достигнута в обоих случаях, но использование дополнительного центра (движение сверху вниз) значительно усиливает селективность отбора расщепляемой связи.

Авторы выражают искреннюю признательность В. К. Кибиреву за ценные замечания, высказанные в ходе обсуждения статьи.

Summary. The peculiarities of active site structure and second binding site structure of thrombin is revealed. Alternative mechanisms of thrombin interaction with highmolecular or lowmolecular substrates are supposed. Also it is shown putative function of the additional center of thrombin in productive enzyme-substrate complex formation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sonder S. A., Fenton J. W.* Proflavin binding within the fibrinopeptide groove adjacent to catalytic site of human α -thrombin // *Biochemistry*.—1984.—23, N 8.— P. 1818—1823.
2. *Active-site topography of human coagulant (α) and noncoagulant (γ) thrombin / L. J. Berliner, R. S. Bauer, T.-L. Chang et al. // *Ibid.*—1981.—20, N 7.— P. 1831—1837.*
3. *Кибирев В. К., Романова В. П., Серебряный С. Б.* Структурные основы специфичности тромбина. Роль вторичных взаимодействий // *Биохимия*.— 1983.— 48, № 6.— № 6.— С. 937—943.
4. *The refined 1,9 Å crystal structure of human α -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment / W. Bode, I. Mayr, U. Baumann et al. // *EMBO J.*—1989.—8, N 11.— P. 3467—3475.*
5. *Blombäck B.* Specificity of thrombin and its action on fibrinogen // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*—1986.—485.— P. 120—123.
6. *Серейская А. А., Смирнова И. В.* Действие нативного и модифицированного тромбина на N-концевые фрагменты фибриногена быка // *Биополимеры и клетка*.— 1991.—7, № 3.— С. 82—88.
7. *О взаимодействии дополнительного центра тромбина с комплементарным сайтом фибриногена / А. А. Серейская, Л. В. Карабут, И. В. Смирнова, И. Щечкин // Докл. АН Украины*.—1991.— № 11.— С. 140—143.
8. *Fenton J. W., II.* Regulation of thrombin generation and function // *Semin. Thromb. Hemost.*—1988.—14, N 3.— P. 234—240.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии
АН Украины, Киев

Получено 17.03.92

УДК 577.161.2:577.112.828

Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, В. К. Бауман

КОЛЛАГЕН ХРЯЩА ЦЫПЛЯТ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ Ca И ВИТАМИНОМ D₃

В экспериментах на цыплятах изучено влияние витамина D₃ и избытка Ca в рационе на аминокислотный состав и содержание углеводного компонента коллагена хряща. Установлено, что витамин D₃ и Ca оказывают на данные показатели сходное действие. Однако совместное введение витамина D₃ и избытка Ca приводит к взаимному ослаблению их эффектов.

Введение. Нарушение формирования скелета в растущем организме служит одним из классических проявлений недостатка витамина D. В эпифизах трубчатых костей при рахите происходит расширение хрящевой зоны, не подверженной кальцификации, ширина которой является количественным критерием оценки степени развития рахита [1]. Характер влияния Ca и витамина D₃ на хрящ отличается определенным своеобразием по сравнению с их эффектами на костную и другие типы соединительной ткани. В частности, для нормального течения процессов кальцификации хондроцитам ростовой пластинки необходимо присутствие сразу двух метаболитов витамина D₃ — 1,25-(OH)₂D₃ и 24,25-(OH)₂D₃ [2]. При гипокальциемическом рахите содержание мРНК коллагена в хондроцитах эпифизарного хряща снижается на 80 %, тогда как при нормокальциемическом — на 50 % [3].

Помимо непосредственного влияния на обмен коллагена в культурах хондроцитов, витамин D₃ и его метаболит 24,25-(OH)₂D₃ влия-

© Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, В. К. Бауман, 1992