

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ

На правах рукопису

**ЩЕЧКІН Ігор Євгенович**

**Теоретичний пошук продуктивних конформерів гнучких  
молекулярних ланцюгів**

02.00.10-біоорганічна хімія, хімія природних та фізіологічних речовин

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук

Київ - 1997

116 20,700  
Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук

професор В.К. Кібірев

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук

професор А.Я. Ільченко

кандидат хімічних наук

В.Ю. Танчук

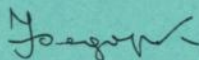
Провідна організація - Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Захист відбудеться 26 вересня 1997 р. на засіданні спеціалізованої вченої ради  
Д01.80.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (253660, Київ,  
вул. Мурманська, 1)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та  
нафтохімії НАН України (253660, Київ, вул. Мурманська, 1)

Автореферат розісланий 26. серпня 1997 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради



Д.М. Федоряк

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00751240 (J)

# 1. Загальна характеристика роботи

## Актуальність

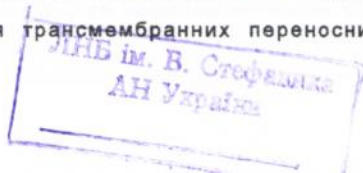
Біологічна дія хімічних речовин що належать до різних класів і виконують у організмі найрізноманітніші функції пов'язана з присутністю в них конформаційно гнучких ланцюгів, що мають значну кількість одинарних зв'язків, навколо яких можливе вільне обертання.

Саме за рахунок обертання навколо цих зв'язків на різних стадіях протікання біомолекулярного процесу молекула може пристосовуватися до виконання своєї функції, переходячи з одного конформаційного стану до іншого. Визначення просторової структури продуктивних конформерів таких систем є ключовою задачею на шляху вивчення процесу на молекулярному рівні.

У зв'язку з тим, що в багатьох важливих випадках відповідні експериментальні дані відсутні, теоретичне дослідження часто залишається єдиним шляхом пошуку просторової структури продуктивних конформерів.

Існуючі зараз підходи щодо теоретичного пошуку у конформаційному просторі багатьох ступенів свободи або низько ефективні, або вимагають надзвичайно великих обчислювальних ресурсів, особливо у тих випадках, коли досліджуються молекулярні об'єкти значного розміру. Тому створення більш швидкозбіжних методів обчислення пошукової просторової структури дозволить більш широко використовувати теоретичні методи дослідження за рахунок застосування комп'ютерів не тільки надзвичайної, але і середньої потужності.

Двома важливими випадками функціонування гнучких молекулярних ланцюгів є дія трансмембранних переносників



іонів та процес впізнавання-зв'язування субстрату ферментом. Тому розроблені методи пошуку були застосовані для побудови комплексних конформацій відповідних речовин. Сідерофор ентеробактин був взятий як приклад мембрано-активних речовин, а комплекс впізнавання між додатковим аніон-зв'язуючим центром тромбіну та комплементарним сайтом фібриногену був прикладом фермент-субстратної взаємодії.

### **Ступінь дослідженості тематики**

Пошук продуктивних конформерів молекулярного процесу до цього часу виконувався за допомогою загальноматематичних методів розв'язання багатоекстремальних задач. Ці методи не аналізують функцію, що досліджується і не враховують її індивідуальних особливостей. Хоча такий підхід робить ці методи універсальними, він не дозволяє використати властивості конкретної функції для полегшення та прискорення процесу обчислень. Досі практично відсутні дослідження, в яких оптимізація геометрії молекулярних ланцюгів у межах методу атом-атомних потенціалів виконувалась би на підставі аналітичного розгляду енергетичної функції молекулярної системи. Одиночні ж праці не створили систематичного підходу і не запропонували системи обчислень, придатної для практичного застосування.

### **Мета роботи**

Метою роботи була розробка швидкозбіжних методів оптимізації геометрії гнучких молекулярних ланцюгів та їх комплексів, які можна реалізувати за допомогою доступних комп'ютерів, розробка відповідного пакету програм та дослідження за допомогою цих програм просторової структури біологічно важливих молекулярних систем.

### Основні завдання дослідження

1) Виділення кола задач конформаційного аналізу гнучких молекулярних ланцюгів, що найчастіше виникають при вивченні біомолекулярних процесів.

2) Теоретичний аналіз енергетичної функції, що застосовується у методі атом-атомних потенціалів.

3) Розробка алгоритмів дослідження багатоекстремальної потенціальної поверхні, що ґрунтуються на швидкозбіжному методі градієнтного спуску.

4) Програмна реалізація алгоритмів.

5) Використання розроблених програм для побудови просторової структури комплексу ентеробактину з іоном заліза та оцінки просторових та енергетичних характеристик комплексу впізнавання, що утворюється між додатковим аніон-зв'язуючим центром тромбіну та комплементарним сайтом фібриногену.

### Наукова новизна

Запропоновано наближення для енергетичної функції атом-атомних потенціалів та визначено властивості її компонент, що впливають на перебіг процесу мінімізації енергії. З урахуванням визначених властивостей на основі обраного наближення вперше запропоновано підхід до побудови продуктивних конформерів гнучких молекулярних ланцюгів при якому пошук мінімумів енергії провадиться виключно за допомогою швидкозбіжних методів градієнтного спуску.

За допомогою розроблених методик побудовано просторову структуру комплексу ентеробактину з іоном заліза та комплексу впізнавання, що утворюється між додатковим аніон-зв'язуючим центром тромбіну та комплементарним сайтом фібриногену.

Проведено аналіз зміни конформації аніон-зв'язуючого сайту тромбіну що відбулась завдяки комплексоутворенню з аніонним сайтом фібриногену, та на основі цього аналізу висунуто низку гіпотез щодо можливих механізмів впливу означених змін на каталітичну активність.

#### **Теоретична цінність**

Зроблено внесок до розробки напіваналітичних стратегій дослідження конформаційного простору конформаційно гнучких молекул та їхніх ділянок, які визначаються багатьма ступенями свободи. Отримані результати, які прояснюють можливі механізми третинної специфічності молекули тромбіну.

#### **Практична цінність**

Розроблена система пошуку продуктивних конформерів може буде застосована для досліджень широкого класу молекулярних систем, що діють у процесах мембранного транспорту, ферментативного каталізу, взаємодії гормонів з клітинними рецепторами, та як складова частина методів комп'ютерного конструювання біологічно активних речовин.

#### **Рівень реалізації**

Розроблена система пошуку продуктивних конформерів реалізована в пакеті програм для персонального комп'ютера, який може і далі використовуватися для подібних досліджень.

#### **Апробація роботи**

Основні результати роботи доповідалися на I-й (1989) та II-й (1991) конференціях з теоретичної органічної хімії (Волгоград), на 3-му симпозіумі "Хімія протеолітичних ферментів" (Москва, 1993), на 16-му Міжнародному Конгресі з біохімії та молекулярної біології (Нью-Делі, Індія, 1994), на Симпозіумі з молекулярного моделювання в генетиці та білковій інженерії (Сопрон, Угорщина, 1994), на 17-му Всесвітньому Конгресі Міжнародної Спільноти з Ангіології (Лондон, 1995), на 24-

ій зустрічі європейських біохімічних товариств (Барселона, Іспанія, 1996).

### **Публікації**

Основні результати роботи викладено в 7 статтях та 4 тезах доповідей.

### **Структура та обсяг роботи**

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, 5 розділів, висновків та списку літератури. Роботу викладено на 100 аркушах машинописного тексту та ілюстрована 8 малюнками та 2 таблицями. Список літератури нараховує 90 джерел.

### **Конкретний особистий внесок дисертанта**

Всі основні результати отримані автором.

### **Методологія**

Комп'ютерне моделювання просторової структури органічних молекул.

## **2. Основні результати роботи**

### **2.1 Підхід до дослідження конформаційного простору гнучких молекулярних ланцюгів**

#### **2.1.1 Вплив особливостей функції, що досліджується, на перебіг процесу мінімізації.**

Енергетичну функцію біомолекулярної системи можна представити як суму головної частини, що визначає основний архітектурний мотив її поверхні та складової, що створює дрібні деталі рельєфу. Саме ці деталі є головними чинниками, що перешкоджають процедурам мінімізації енергії: зупиняють градієнтний спуск та уповільнюють рух стохастичних методів. За таких обставин спочатку доцільно знайти мінімуми головної компоненти, а потім провести уточнення структури,

використовуючи отримані точки як початкове наближення для мінімізації повної функції. Якщо головну частину потенціальної функції, в свою чергу, можна поділити на компоненти, що відрізняються за своєю частотністю, то мінімізацію головної частини також доцільніше провадити у два етапи, при цьому спочатку треба знайти мінімуми низькочастотної складової.

При застосуванні такого підходу прискорення процесу пошуку відбувається по-перше, за рахунок значного спрощення рельєфу на проміжних етапах мінімізації, а по-друге за рахунок того, що на проміжних етапах обчислюється функція, яка є лише частиною повної функції, що вимагає менших витрат машинного часу.

### 2.1.2 Аналітичні властивості компонент, що складають енергетичну функцію в методі атом-атомних потенціалів.

Зважаючи на вищевикладені міркування, розглянемо компоненти, з яких складається енергетична функція в методі атом-атомних потенціалів. (Далі скрізь  $r_{ij}$  - відстань між двома атомами  $i$  та  $j$ ).

1. Ван-дер-ваальсова взаємодія  $U_v = \sum(-A/r_{ij}^6 + B/r_{ij}^{12})$ .

Взаємодію кожної пари атомів можна представити у вигляді суми:

$$U_v = U_{vr} + U_{va},$$

де  $U_{vr} = U_v$  якщо  $U_v > 0$  та  $U_{vr} = 0$  якщо  $U_v < 0$ ,

а  $U_{va} = 0$  якщо  $U_v > 0$  та  $U_{va} = U_v$  якщо  $U_v < 0$ .

Називатимемо  $\sum U_{vr}$  складовою ван-дер-ваальсового відштовхування, а  $\sum U_{va}$  - складовою ван-дер-ваальсового притягання.

2. Кулонівська енергія  $E_q = \sum q_i q_j / \epsilon r_{ij}$ ,

3. Критеріальний потенціал. Вивчаючи процес дослідник частіше за все уявляє собі можливий механізм його протікання і

зданен сформулювати структурний критерій продуктивності конформеру, який в більшості випадків може бути представлений модельним атом-атомним потенціалом:

$U_{crit} = \sum p_{ij} r_{ij}^2$ , де  $r_{ij}$  - відстані між вибраними парами силових центрів.

Торсіонний потенціал  $U_t = \sum U_0/2[1-\cos(\varphi_k)]$ , де  $\varphi_k$ ,  $k = 1, 2, \dots, N$  - множина торсіонних кутів ланцюгу таких, що дозволяють вільне обертання.

Аналіз амплітуди зміни кожної з цих компонент дозволяє зробити висновок, що головну частину потенціальної функції складають електростатичні взаємодії між атомами іонізованих та сильно полярних груп, критеріальний потенціал та відштовхуюча частина ван-дер-ваальсового потенціалу. Амплітуда зміни потенціалу електростатичних взаємодій між слабополярними групами, притягуючої частини ван-дер-ваальсового потенціалу та торсіонного потенціалу для більшості типів зв'язків значно менша за таку для компонент першої групи. Тому ці компоненти є відповідальними лише за дрібні деталі рельєфу енергетичної поверхні.

Розглянемо тепер характер залежності від довільного торсіонного кута компонент, що складають головний архітектурний мотив енергетичної функції. Кожний з потенціалів, що розглядаються, залежить від торсіонного кута відповідно до виразу:

$$U = U(r_{ij}(\varphi_k))$$

Легко показати, що залежність  $r_{ij}(\varphi_k)$  виражається формулою:

$$r_{ij}(\varphi_k) = f_1(\varphi') - 2 f_2(\varphi') \cos(\varphi_k + f_3(\varphi')),$$

де  $\varphi_k$  - торсіонний кут, що розглядається,  $\varphi'$  - множина торсіонних кутів, що відповідають зв'язкам, які лежать на шляху в молекулярному графі між атомами  $i$  та  $j$  за виключенням кута

$\phi_k$ . Ця функція в діапазоні зміни кута  $\phi_k$  має лише один максимум та один мінімум. Виходячи з того, що для всіх компонент, які розглядаються, функція  $U(r_{ij})$  монотонно залежить від  $r_{ij}$ , можна стверджувати, що залежність  $U(r_{ij}(\phi_k))$  енергії взаємодії кожної пари атомів також буде мати не більше чим один максимум і один мінімум в означеному діапазоні.

Ван-дер-ваальсова взаємодія має місце між усіма атомами незалежно від їх хімічної природи, а електростатична і критеріальна - обчислюється лише між деякими парами атомів. З огляду на це можемо стверджувати, що ван-дер-ваальсова компонента  $\epsilon$ , взагалі, більш високочастотною, ніж електростатична та критеріальна. Називатимемо далі електростатичну та критеріальну компоненти складовими першої групи.

Введення ван-дер-ваальсової компоненти простим додаванням відповідного потенціалу з подальшою мінімізацією функції не завжди виявляється успішним. Іноді у стерично "тісних" молекулах окремі ван-дер-ваальсові піки збираються у об'єднаний кластер. Такий елемент рельєфу вміщує вже низькочастотну компоненту, на яку накладаються окремі піки, що зупиняють процес градієнтного спуску у конформаційному стані, який відповідає надто великим стеричним напругам. Враховуючи те, що отримані на першому етапі конформери відносно "дешеві" з точки зору витрат машинного часу, в принципі, задовільним буде просте відкидання таких невдалих конформацій.

Але автором запропоновано спеціальні алгоритми які дозволяють подолати вищевказані перешкоди.

Ці алгоритми передбачають заміну на первинних стадіях дослідження реальних атом-атомних потенціалів на модельні:

кожна модельна парна взаємодія виражається параболічним потенціалом за формулою:

$$U_{ij} = r_{ij}r_{ij}^2,$$

де  $r_{ij}$  - відстань між атомами  $i$  та  $j$ , а  $r_{ij} < 0$  для відштовхуючих взаємодій,  $r_{ij} > 0$  для притягуючих. При цьому для моделювання відштовхуючої складової ван-дер-ваальсового потенціалу  $U_{ij}$  приймається рівним нулю, якщо  $U_{ij} < 0$ .

### 2.1.3 Алгоритм конкуренції компонент.

Перший з цих алгоритмів передбачає проведення серії процесів мінімізації таких, що кожний наступний процес починається з точки, де закінчився попередній. Перший з цих процесів починається у такому конформаційному стані, коли процес мінімізації низькочастотної складової дещо не дійшов свого кінця. У кожному сеансі мінімізації протидіючі компоненти поперемінно підсилюються та послаблюються за рахунок відповідних змін коефіцієнтів  $r_{ij}$  модельних потенціалів. Початкова амплітуда цих змін обирається дослідним шляхом та поступово зменшується по мірі наближення до стерично ненапруженої конформації.

### 2.1.4 Алгоритм поступової розбірки кластеру стеричної напруги.

Алгоритм, що його описано у п.1.1.3., у деяких випадках не є ефективним. Це відбувається тоді, коли електростатичні взаємодії та структурні критерії продуктивності не є тими чинниками, що визначають положення продуктивних мінімумів у конформаційному просторі, а також у тих випадках, коли стартова точка для процедури конкуренції компонент розташована надто близько до мінімуму складової першої групи.

Припустимо, що градієнтний спуск зупинився у потенціальній ямі, що відповідає значним стеричним напругам. Тоді

$$\mathbf{g} = \sum \mathbf{g}_{ij} = 0,$$

де  $\mathbf{g}$  - вектор градієнту, а  $\mathbf{g}_{ij}$  - його парні складові.

Виберемо таку пару атомів, якій відповідає  $\mathbf{g}_{ij}$  з найменшою абсолютною величиною, послабимо ван-дер-ваальсову відштовхуючу складову цієї пари за рахунок тимчасового зменшення відповідного коефіцієнту  $\rho_{ij}$  і продовжимо процес мінімізації, стартуючи з точки, де зупинився попередній сеанс. Якщо спуск знову зупинився у стані із значною стеричною напругою, повторимо означену процедуру. Легко показати, що такий алгоритм фактично відповідає спуску першого порядку згідно рельєфу зглаженої функції, що її утворює кластер піків ван-дер-ваальсової відштовхуючої компоненти. При цьому величина гладкої компоненти кластеру у даній точці оцінюється як щільність точок ван-дер-ваальсових піків у довкіллі точки що розглядається.

### 2.1.5 Схеми дослідження

Виходячи з виконаного аналізу та зважаючи на викладений у п. 1.1.1. принцип пошуку, запропонуємо таку загальну схему дослідження конформаційного простору гнучких молекулярних ланцюгів:

- Виконується мінімізація функції, складеної з модельних критеріального потенціалу та сильної електростатичної компоненти. Стартові точки для градієнтного спуску обираються у вершинах прямокутної сітки в просторі підмножини торсійних кутів ланцюга, що вивчається.
- До кожного з отриманих конформерів на другому етапі додається відштовхуюча ван-дер-ваальсова компонента та

мінімізація енергії повторюється. При цьому можуть використовуватися спеціальні алгоритми, що їх викладено у п.2.1.3 та 2.1.4.

- Нарешті провадиться мінімізація повної енергетичної функції.

Проте треба відмітити, що немає жодного шляху дослідження, що є універсальним. Тому необхідність та ефективність застосування того чи іншого алгоритму залежить від властивостей молекулярного ланцюга, що вивчається. Створений пакет алгоритмів є набором інструментів для конформаційного аналізу, які треба використовувати динамічно, в залежності від конкретного перебігу процесу мінімізації.

## **2.2 Побудова продуктивних конформерів біологічно активних речовин.**

### **2.2.1 Формування конформації комплексу ентеробактину з іоном заліза.**

Ентеробактин - основний представник групи катехінових сидерофорів, які здатні утворювати міцний комплекс з іоном заліза. Припускається, що в стані рівноваги атоми кисню пірокатехінових кілець взаємодіють з шестикоординованим тривалентним залізом і утворюють сильно зіпсовану октаедричну координацію. Конформація всього комплексу близька до симетрії групи  $C_3$ .

При побудові конформації комплексу, октаедрична координація лігандів іону заліза та симетрія  $C_3$  усієї молекули були структурними критеріями пошукової конформації. Перша з цих вимог була реалізована за допомогою жорстких фіктивних структур, що були побудовані для кожного з бокових ланцюгів молекули і моделювали положення іона заліза по відношенню до пірокатехінових кілець.

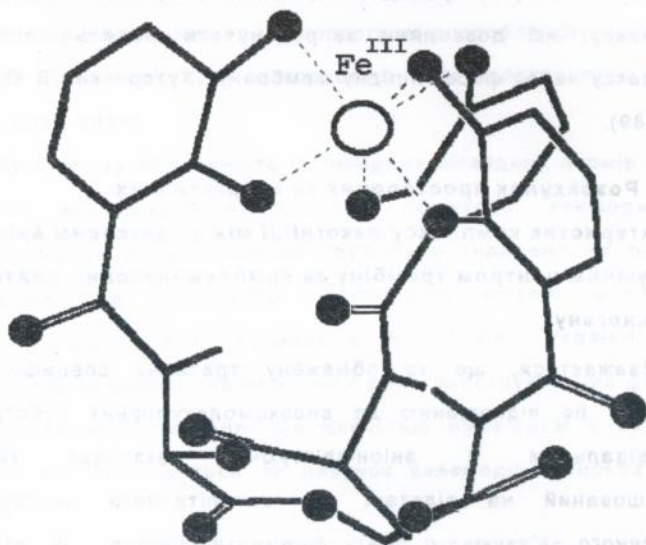
Для того, щоб задовільнити вимогу про симетрію комплексу, торсіонні кути лише для однієї з трьох структурних одиниць були вибрані незалежними, а інші - встановлювались рівними до відповідних на ведучому елементі.

На першому етапі було проведено пошук у конформаційному просторі 6-ти незалежних двограних кутів молекули, при цьому цільова функція складалась лише з критеріального потенціалу, що відповідає зв'язуванню та координації іона заліза, а також потенціалу, що стягує краї трилактонового циклу. З отриманої множини конформерів були відібрані 100 з найменшою енергією для яких була проведена мінімізація повної енергії із збереженням у цільовій функції критеріальних членів, але без вимоги рівності відповідних торсіонних кутів різних субодиниць.

Якісний аналіз досліджуваної молекули показує, що гнучкість її ланцюгів є обмеженою, тому довжини зв'язків та валентні кути відрізняються від їхніх стандартних значень. Тому у дослідження був включений етап уточнення валентної геометрії та зарядів комплексу за допомогою напівемпіричних квантовомеханічних методів. Валентна геометрія була розрахована за методом MINDO/3, а заряди - за методом CNDO/2. Квантовомеханічні розрахунки виконувались за допомогою програм, створених в Інституті органічної хімії НАН України О.М.Нестеренком. Початковим наближенням для цих розрахунків було взято найкращу з оптимізованих конформацій. Після виконання квантово-хімічних розрахунків була проведена остаточна мінімізація енергії атом-атомних потенціалів з урахуванням нових значень валентної геометрії та зарядів.

Результати конформаційного аналізу показали, що різні стабільні конформації як зарядженого так і електронейтрального (трипротонованого) комплексу є схожими

за своєю просторовою будовою і практично не виходять за межі групи симетрії  $C_3$ .



**Мал. 1. Просторова будова комплексу ентеробактину з іоном заліза.**

Оптимальним конформаціям комплексу притаманні такі характерні риси: пептидні та складноефірні карбонільні групи орієнтовані атомами кисню на зовнішнє середовище. Лігандні кисні орієнтовані до осі симетрії комплексу, а катехоламідні залишки - вздовж осі симетрії (мал.1). Отримана інформація про положення карбонільних груп дозволяє зробити припущення, що ці групи є відповідальними за зв'язування ентеробактину з мембранним рецептором за рахунок утворення

водневих зв'язків між карбонільними групами сідерофору і амідними групами білка-рецептора.

Грунтуючись на отриманих автором результатах в ІБОНХ НАН України було проведено детальні розрахунки гідратації комплексу, які дозволили запропонувати модель переносу комплексу через фосфоліпідну мембрану (Хуторський В.Ю., та ін. 1989).

### **2.2.2 Розрахунок просторових та енергетичних характеристик комплексу рекогніції між додатковим аніон-зв'язуючим центром тромбіну та комплементарним сайтом фібриногену.**

Вважається, що за обмежену третинну специфічність тромбіну по відношенню до високомолекулярних субстратів відповідальним є аніон-зв'язуючий екзосайт (АЗЕ), розташований на відстані від каталітичного центру та первинного зв'язуючого сайту ферменту (Fenton J.W. et. al., 1988, Серейська А.О., 1980). Цей екзосайт утворюється здебільшого за рахунок  $\beta$ - та  $\gamma$ -петель Б-ланцюгу тромбіну.

АЗЕ впізнається аніонним комплементарним сайтом (КС) фібриногену, що розташований на ланцюгу молекули на відстані від точки розриву (Hogg D.H., Blomback B., 1978). Експерименти (De Cristofaro, R. Fenton J.W., di Cera E., 1992, di Cera E. et. al., 1993) свідчать, що це впізнавання відбувається за рахунок іонних взаємодій між протилежно зарядженими групами.

Для моделювання зв'язування було досліджено систему, яка складалась з двох об'єктів, що розглядались у вакуумі - ділянки ланцюгу Arg 66 - Lys 82 молекули тромбіну та ділянки Asp 38 - Lys 44 фібриногену. Решта ланцюгів обох молекул не розглядалася. Вибір вищезначеної ділянки додаткового центру

був пов'язаний з тим, що її краї зв'язані водневим зв'язком, в той час, як всередині ділянки такі зв'язки відсутні. Автор отримав ці дані, досліджуючи відстані між усіма можливими донор-акцепторними парами водневого зв'язку молекули тромбіну за допомогою однієї з програм розробленого автором пакету. При цьому були використані рентгеноструктурні дані (Bode et al. 1989).

Просторову зближеність відповідних лігандних атомів було вибрано як структурний критерій пошукової конформації. Кандидатів на роль лігандних груп було знайдено на основі досліджень за допомогою просторової моделі молекули тромбіну, що була побудована в ІБОНХ НАН України Л.В. Карабутом на основі вищезгаданих рентгеноструктурних даних. Ці дослідження показали, що найбільш ймовірним є варіант зв'язку, що реалізується за рахунок взаємодії чотирьох пар груп:

NH Arg 66 - COO Asp 40,

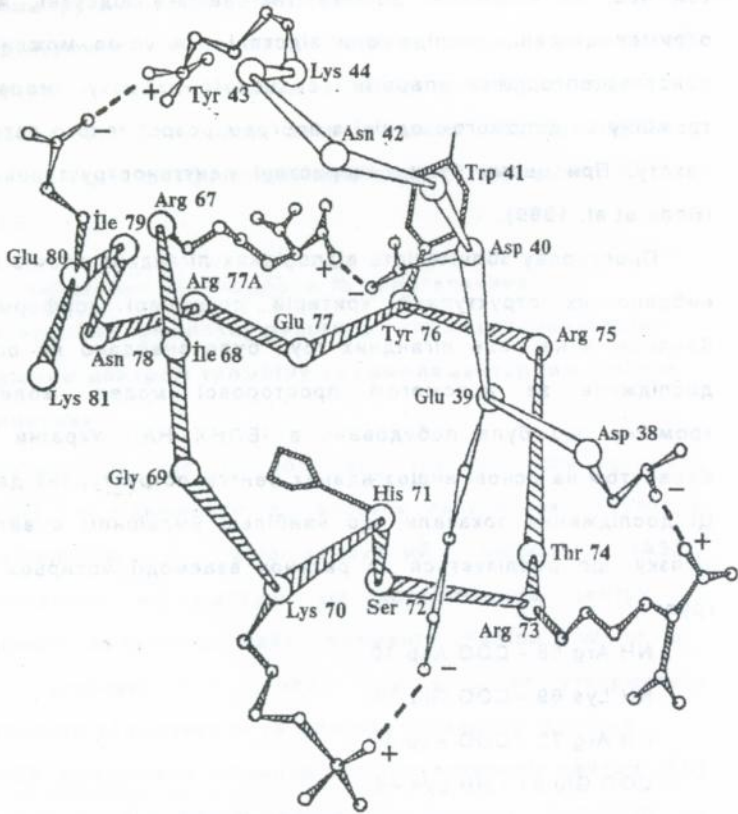
NH Lys 69 - COO Glu 39,

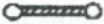

NH Arg 72 - COO Asp 38,

COO Glu 81 - NH Lys 44.

(В кожній парі першим поданий залишок, що належить молекулі тромбіну, а другим - молекулі фібриногену).

Внаслідок проведених обчислень була отримана стерично ненапружена конформація комплексу, в якій вищевказані групи утворили міцні зв'язки (мал.2). Відстань між донорними та акцепторними атомами в комплексі становлять від 2.1 до 2.5 Å (табл.1). На взаємодію лігандних груп припадає 128.4 кДж/моль з загальної внутрішньої енергії комплексу 283.6 кДж/моль. До внутрішньої енергії комплексу також додають свій внесок притягання інших груп (загальна енергія притягання складає 264.8 кДж/моль). Варто відмітити відсутність стеричних



-  Аніон зв'язуючий сайт тромбіну  
 Комплементарний сайт фібриногену

**Мал.2** Просторова будова комплексу аніон зв'язуючого сайту тромбіну з комплементарним сайтом фібриногену

ускладненень у взаємодіях фібриноген-тромбін: енергія ван-дер-ваальсових взаємодій навіть негативна і становить мінус 19.6 кДж/моль. При об'єднанні в комплекс внутрішні енергії кожного з об'єктів збільшились: А3Е - на 42.5 а КС - на 54.2 кДж/моль. При цьому збільшення відбувається за рахунок всіх компонент енергії. Таким чином, енергія зв'язку становить мінус 187.7 кДж/моль.

Таблиця 1

Акцепторно-донорні пари атомів	Відстань, А
OD1 Asp38 Fg - NH1 Arg77 Thr	2.0
OE1 Glu39 Fg - NZ Lys70 Thr	2.2
OD1 Asp40 Fg - NH1 Arg67 Thr	2.1
NZ Lys44 Fg - OE1 Glu80 Thr	2.2

### 2.2.3 Можливі механізми алостеричного впливу аніон-зв'язуючого екзосайту на каталітичний центр тромбіну.

Зв'язування КС з ДЦ призвело до суттєвої зміни конформації останнього (мал.2). Вона відрізняється від вихідної значно меншим згином і приймає дещо гвинтоподібну форму. Такі зміни у конформації  $\beta$ -петлі дозволяють запропонувати декілька можливих механізмів впливу на каталітичний центр.

По-перше, це може бути вплив безпосередньо на головний каталітичний центр, що поліпшить його каталітичну якість, зокрема шляхом переходу від двопротонного до трьохпротонного механізму. Це може статися, якщо буде задіяно додатковий залишок гістидину, або площина імідазольного кільця гістидину 57 повернеться таким чином, що відстань між N2 His 57 та O<sub>γ</sub> Ser 195 зменшиться, що є більш сприятливим для системи переносу заряду.

По-друге, цей вплив може здійснюватися через поліпшення умов входу фібриногену до каталітичної щілини. Розгляд на

просторовій моделі, що згадувалась вище, показав, що інтактна  $\beta$ -петля своєю вершинною частиною взаємодіє з іншою петлею, вершина якої нависає над каталітичною щілиною. На цій вершині розташований об'ємний залишок Trp 148, що заважає субстратові вільно входити до каталітичної щілини. Ланцюги обох означених петель розташовані на поверхні молекули на протязі значної відстані, починаючи від їхніх вершин. Прикріплення вершини  $\beta$ -петлі до ланцюгу другої петлі робить таку систему жорсткою. Зміна конформації  $\beta$ -петлі, що відбувається при зв'язуванні, безумовно призведе до розриву цього зв'язку, результатом чого буде значне підвищення рухомості обох петель. Це, напевне, дасть змогу відбутися частковому анфолдінгу молекули тромбіну, що збільшить доступність каталітичної щілини для молекули субстрату.

Взагалі кажучи, петлі, що лежать на поверхні глобули, при частковому анфолдінгу молекули ферменту можуть відігравати роль "щупалець", які полегшують захват субстрату та зв'язування його додатковим центром.

## **Висновки**

1. Запропоновано нову систему теоретичного дослідження конформаційного простору гнучких молекулярних ланцюгів, що базується на наближенні енергетичної функції, яке враховує аналітичні властивості її компонент.
2. Створено алгоритми для реалізації вищезначеної системи дослідження.
3. Розроблено пакет комп'ютерних програм для конформаційного аналізу гнучких молекулярних ланцюгів.
4. Побудовано просторову структуру комплексу ентеробактину з іоном заліза.

5. Обчислені просторові та енергетичні параметри комплексу аніон-зв'язуючого екзосайту тромбіну з комплементарним сайтом фібриногену.
6. На основі отриманих параметрів комплексу АЗЕ - КС запропоновано гіпотезу, щодо механізму алостеричного впливу аніон-зв'язуючого сайту на каталітичний центр.

## Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Хуторский В.Е., Каменчук А.А., Щёчкин И.Е. Теоретическое исследование пространственной структуры и гидратации валиномицина // Теор. и эксп. химия.- 1987.- N3. - с.360-365
2. Хуторский В.Е., Щёчкин И.Е., Каменчук А.А., Кухарь В.П. Корреляция между гидратацией и ионофорной активностью лейкотриена В4 // Теор. и эксп. химия.- 1988.- N3. - с.357-361
3. Хуторский В.Е., Щёчкин И.Е., Каменчук А.А., Кухарь В.П. Связь между гидратацией и ионофорной активностью энтеробактина // Теор. и эксп. химия.- 1989.- N2. - с.254-255
4. A.A.Sereyskaya, L.V.Karabout, I.E.Shchekhin On the efficiency and selectivity of thrombin catalysis // Thrombosis Research, 1994, V.74, N5, pp.549-550
5. I.E.Shchekhin, L.V.Karabut, S.N.Chetyrkina, A.A.Sereyskaya Theoretical conformational investigation of thrombin-fibrinogen recognition complex // The Ukrainian Biochemical Journal, 1995, V.67, N5, pp.110-114
6. Серейская А.А., Карабут Л.В., Смирнова И.В., Щёчкин И.Е. Взаимодействие между дополнительным центром тромбина и комплементарным сайтом фибриногена // Доклады Академии Наук Украины 1991. - N11, с.140-143.
7. Карабут Л.В., Щёчкин И.Е., Серейская А.А. Моделирование комплекса рекогниции фибриногена тромбином // Биополимеры и клетка 1994. - т.10, №6. - с.80-84.
8. Karabout L.V., Schechkin I.E., Sereyskaya A.A., Chetyrkina S.N. / Peculiarity of thrombin interaction with fibrinogen and specific low molecular substrates // Presented at 3rd Symposium "Chemistry of proteolytic enzymes", p.77 Apr. 26-27, 1993, Moscow.
9. A.A.Sereyskaya, L.V.Karabout, I.E.Shchekhin On creation and functions of fibrinogen thrombin recognition complex // Presented at the 17th World Congress of the International Union of Angiology, London 3-7 April 1995, p.356
10. Karabout L.V., Shchekhin I.E., Sereyskaya A.A., Chetyrkina S.N. / Modeling of fibrinogen thrombin complex // Presented at Symposium of Molecular modeling in Genetics and Protein Engineering. 1994, Sopron, Hungary. P.28.
11. Karabout L.V., Shchekhin I.E., Chetyrkina S.N., Sereyskaya A.A. Modeling of fibrinogen thrombin recognition complex // Presented at the 16th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Sept. 19-22, 1994, New Delhi, India. V.2, P.310.

Щёчкин И.Е. Теоретический поиск продуктивных конформаций гибких молекулярных цепей. Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности - 02.00.10 - биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины.  
Киев, 1997.

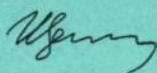
Защищается 11 работ, в которых описаны новые методы теоретического исследования конформационного пространства гибких молекулярных цепей, рассчитана пространственная структура комплекса энтеробактина с ионом железа и определены пространственные и энергетические параметры комплекса рекогниции фибриногена тромбином, а также предложена гипотеза относительно структурного механизма влияния анион-связывающего экзосайта тромбина на его главный каталитический центр.

Shcheckin I.E. Theoretical constructing of flexible molecular chains productive conformations. Manuscript.

Ph.D. thesis in speciality 02.00.10 - Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active compounds.

11 scientific publications are defended. They include new approach to flexible molecular chain conformational space search, its application to build conformation of enterobactine molecule coupled with ferric ion, to calculate spatial and energetic characteristics of thrombin-fibrinogen recognition complex. Hypothesis is suggested as concerns anion-binding exosite influence on to catalytic center.

Ключові слова: теоретичний конформаційний аналіз, продуктивні конформери, сідерофори, фермент-субстратний комплекс, тромбін, фібриноген.



**АВ 38.438**

Підписано до друку 19.08.1997 р.  
Формат 60x84 1/16 Папір KumNova.  
Друк ризографічний. Умовно-друкованих аркушів 1,4.  
Обліково-видавничих аркушів 1,2. Тираж 100 прим.  
Видавництво та друк типографії ІПРІ НАН України