



Биолог. журн. Армении, 4 (64), 2012

ВЛИЯНИЕ НЕБЕЛКОВЫХ АМИНОКИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ТРИПСИНА И ПРОТЕИНАЗЫ К

Н.А. ОГАНЕСЯН, М.Б. ЧИТЧЯН, А.М. ОГАНЕСЯН,
М.А. МЕЛКУМЯН, Г.Г. ОГАНЕЗОВА, Н.С. АВЕТИСЯН

НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА
arm_biotech@yahoo.com, nelliog@yahoo.fr

Исследовано взаимодействие небелковых аминокислот с трипсином и протеиназой К. Методом докинг анализа выявлено, что (2R,3S)-β-гидроксильцин связывается с аспарагиновой кислотой¹⁸⁹ трипсина, входящей в центр связывания с субстратом фермента, и показано, что активность трипсина в присутствии 2 мМ (2R,3S)-β-гидроксильцина подавляется на 56,9%. Добавление в реакционную смесь (S)-β-(N-бензиламино)-аланина, (S)-α-метил-β-фенилаланина или (R)-α-метил-β-фенилаланина приводит к усилению ингибирующего действия (2R,3S)-β-гидроксильцина на трипсин. (R)-β-имидазол-ил-(S)-аланин снижает процент ингибирования трипсина (2R,3S)-β-гидроксильцином на 38,4. Согласно данным докинг анализа, (S)-аллил-аланин образует водородные связи с серином¹³², входящим в центр связывания с субстратом протеиназы К, а (R)-α-метил-β-фенилаланин связывается с серином²²⁴, входящим в каталитический центр протеиназы К. (S)-аллил-аланин (3мМ) и (R)-α-метил-β-фенилаланин (4мМ) ингибируют по отдельности протеиназу К на 50%, а при их совместном воздействии ингибирование фермента усиливается на 25%.

Обсуждается возможность использования смесей небелковых аминокислот для эффективного ингибирования трипсина и протеиназы К.

Небелковые аминокислоты – докинг – трипсин – протеиназа К – ингибирование

Ուսումնասիրվել է ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների փոխազդեցությունը տրիպսինի և պրոտեինազ Կ-ի հետ: Դոքինգ անալիզի մեթոդով բացահայտվել է, որ (2R, 3S)-β-հիդրօքսիլէյցինը կապվում է տրիպսինի ասպարագինաթթվի¹⁸⁹ հետ, որը ընդգրկված է ֆերմենտի սուբստրատի հետ կապման կենտրոնի կազմում: Ցույց է տրված, որ տրիպսինի ակտիվությունը 2 Մոլ (2R, 3S)- β-հիդրօքսիլէյցինի ներկայությամբ նվազում է 56,9 %-ով: (S)-β-(N-բենզիլամինո)-ալանինի, (S)-α-մեթիլ-β-ֆենիլալանինի կամ (R)-α-մեթիլ-β- ֆենիլալանինի ավելացումը ռեակցիոն միջավայրին բերում է տրիպսինի արգելակման ուժեղացմանը (2R,3S)-β-հիդրօքսիլէյցինով: (R)-β-իմիդազոլիլ-(S)-ալանինը թուլացնում է տրիպսինի արգելակումը (2R,3S)-β-հիդրօքսիլէյցինով 38,4 %-ով: Համաձայն դոքինգ անալիզի տվյալների (S)-ալիլ-ալանինը ջրածնային կապեր է հաստատում պրոտեինազ Կ-ի սուբստրատի հետ կապման կենտրոնում գտնվող սերին¹³² հետ, իսկ (R)-α-մեթիլ-β-ֆենիլալանինը կապվում է պրոտեինազ Կ-ի կատալիտիկ կենտրոնում գտնվող սերին²²⁴ -ի հետ: 3 Մոլ և (S)-ալիլ-ալանինը և 4 Մոլ (R)-α-մեթիլ-β-ֆենիլալանինը արգելակում են պրոտեինազ Կ-ն 50 %-ով, իսկ նրանց համատեղ ազդեցությունը 25 %-ով ուժեղացնում է ֆերմենտի արգելակումը: Քննարկվում է ոչ սպիտակուցային ամինաթթուների խարնուրդների օգտագործման հնարավորությունը տրիպսինի և պրոտեինազ Կ-ի արդյունավետ արգելակման համար:

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթուներ – դոքինգ – տրիպսին – պրոտեինազ Կ – արգելակում

The interaction of nonprotein amino acids with trypsin and proteinase K has been studied. It was revealed by docking analysis that (2R,3S)- β -hydroxyleucine binds with aspartic acid189 in the substrate binding site of trypsin. (2R,3S)- β -hydroxyleucine inhibits the activity of trypsin a 56.9%. (S)- β -(N-benzylamino)-alanine, (S)- α -methyl- β -phenylalanine and (R)- α -methyl- β -phenylalanine strengthen the inhibition of trypsin by (2R,3S)- β -hydroxyleucine. (R)- β -imidazolyl-(S)-alanine decreases the inhibition of trypsin by (2R,3S)- β -hydroxyleucine a 38.4 %. According to the docking analysis (S)-allyl-alanine forms hydrogen bonds with serine¹³² in the substrate binding site of proteinase K, and (R)- α -methyl- β -phenylalanine forms hydrogen bonds with serine²²⁴ in the catalytic site of proteinase K. (S)-allyl-alanine (3 mM) and (R)- α -methyl- β -phenylalanine (4 mM) inhibit proteinase K used separately increase a 50%, but if used together, the inhibition increases by 25 %. The possible using of nonprotein amino acids mixture for effective inhibition of trypsin and proteinase K is discussed.

Nonprotein amino acids – docking – trypsin – proteinase K – inhibition

Оптически активные небелковые α -аминокислоты встречаются в природе как в свободном виде, так и в составе белков, антибиотиков и других макромолекул. Благодаря широкому спектру биологической активности, они успешно применяются в медицине, фармакологии, микробиологии и других областях науки. Одним из важных свойств небелковых аминокислот является способность подавлять активность различных ферментов.

Протеазы занимают ключевые позиции в различных физиологических процессах, протекающих в организме, что позволяет их рассматривать в качестве удобных мишеней для лекарственных препаратов. Трипсин и протеиназа К относятся к классу сериновых протеаз. К этому классу относятся также протеазы некоторых вирусов [4]. Ингибиторы вирусных протеаз путем подавления формирования капсида вирионов останавливают процесс размножения вирусных частиц, в связи с чем рассматриваются как перспективные противовирусные препараты. К числу таких ингибиторов, широко используемых в медицинской практике, относятся пептиды, в состав которых входят небелковые аминокислоты [7-9]. Кроме того, так называемые «коктейли», состоящие из набора ингибиторов различных протеаз, используются в экспериментах, проводимых при исследованиях протеома [2]. Поиск новых ингибиторов протеаз расширяет возможности разработки и усовершенствования лекарственных препаратов.

Ранее исследования биологической активности оптически активных небелковых α -аминокислот с содержанием различных алифатических, ароматических и гетероциклических заместителей позволили выявить и охарактеризовать новые ингибиторы трипсина и протеиназы К [3]. Оказалось, что наиболее сильным ингибирующим воздействием на трипсин обладают оба стереоизомера β -гидроксилейцина, а также дипептид N-формил-метионил-(2S,3R)- β -гидроксилейцин. (2S,3R)- β -гидроксилейцин, (R)- и (S)-аллил-аланин проявили ингибирующие свойства по отношению к протеиназе К. Интересно, что (R)-, (S)- α -метил- β -фенилаланин, (R)-, (S)-аллил-глицин, (R)-, (S)-аллил-аланин, (2S,3R)-, (2R,3S)- β -гидроксилейцин в виде свободных аминокислот подавляют активность протеиназы К, однако в составе дипептидов теряют это свойство. В настоящей работе исследовано влияние различных смесей небелковых аминокислот на трипсин и на протеиназу К.

Материал и методика. В работе использовали следующие небелковые аминокислоты: (R)- β -имидазолил-(S)-аланин, пара-фтор-(R)-фенилаланин, (R)- α -метил- β -фенилаланин, (S)- α -метил- β -фенилаланин, (S)- β -(N-бензиламино)-аланин. Эти соединения синтезированы в НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА. Бычий трипсин, бычий сывороточный альбумин, протеиназа К *Tritirachium album Limber* и другие реагенты приобретены у фирмы Sigma (USA).

Измерение активности ферментов.

Активность трипсина определяли по методу, предложенному "Millipore Corporation" [11] (Worthington 1977). За единицу активности трипсина принимается количество трипсина, гидролизующего 1 мМ TAME за 1 мин при 25°C, pH 8,2, в присутствии 0,01 М ионов кальция.

Активность протеиназы К определяли путем измерения количества свободных аминокрупп по орто-фталальдегидному (ОФА) методу, описанному Гейд и Браун [1]. Реакционная смесь содержит 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,2, 0,2% SDS, 0,02 М меркаптоэтанол, 10 мг/мл бычий сывороточный альбумин и 0,4 мг/мл протеиназы К. Отбирается проба (50 мкл), остальная смесь инкубируется 30 мин при 37°C. Реакция останавливается добавлением 6-ти микролитров 30%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Концентрация свободных аминокрупп в реакционной среде определяется с помощью ОФА реагента. В 50 мкл реакционной смеси добавляется 1,5 мл ОФА реагента и 1,5 мл H₂O. Измерение поглощения проводится через 15 мин инкубации при 340 нм.

Моделирование.

Структуры аминокислот и пептидов построены с помощью программы ChemOffice 2005 (Chem3D Ultra9.0). Свободная энергия лиганда минимизирована методом Newton-Raphson. Структуры кристаллов трипсина и протеиназы К взяты из web сайта <http://www.rcsb.org>. Докинг лиганда с макромолекулой проводили с использованием программы AutoGrid4, AutoDock4 (<http://autodock.scripps.edu>). Аффинность связывания лиганда оценивается с помощью функции, основанной на считывании Гибсовской энергии связывания лиганда с макромолекулой. Программа AutoDock использует ламарковский генетический алгоритм [6]. Константа ингибирования вычислялась по следующей формуле:

$$KI = \exp((\Delta G \times 1000)/(Rcal \times TK)), \text{ где}$$

$$Rcal = 1.98719 \text{ cal}/(\text{mol} \times K) \text{ (газовая константа),}$$

$$TK = 298.15 \text{ K (комнатная температура по Кельвину).}$$

Результаты и обсуждение. Действие (S)- α -аллилаланина и (R)- α -метил- β -фенилаланина на активность протеиназы К. Взаимодействие небелковых аминокислот с протеиназой К изучено методом докинг анализа. Результаты анализа приведены в табл. 1. Отрицательные значения свободной энергии связывания свидетельствуют о способности (S)-аллил-аланина и (R)- α -метил- β -фенилаланина взаимодействовать с протеиназой К (табл. 2). Данные докинг анализа показали, что водородная связь образуется между N концевым азотом (R)- α -метил- β -фенилаланина и кислородом гидроксильной группы серина²²⁴. NH₂- группа (S)-аллил-аланина связывается водородными связями с –COO- группой серина¹³² (рис.1) [5].

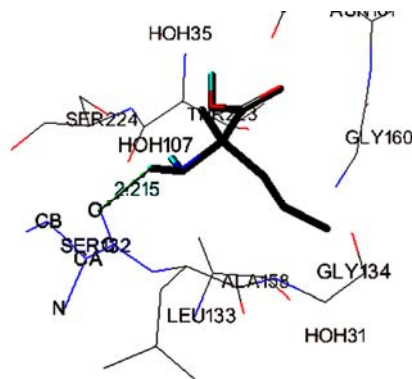


Рис. 1. Комплекс протеиназы К с (S)-аллилаланином.

Определяли активность протеиназы К в присутствии 4 мМ (S)-аллил-аланина, 3 мМ (R)- α -метил- β -фенилаланина, а также в присутствии смеси этих двух аминокислот. Выбрана такая концентрация аминокислот, при которой каждая аминокислота в отдельности ингибирует протеиназу К приблизительно одинаково (около 50%). Результаты определения активности протеиназы К приведены в табл. 1.

Табл.1. Ингибирующее действие (S)-аллил-аланина и (R)- α -метил- β -фенилаланина на протеиназу К

Соединения	ΔG ккал/моль	K _i мМ	Ингибирование (%)
(S)- α -аллилаланин (4 мМ)	-4,91	0,25	49,8
(R)- α -метил- β -фенилаланин (3 мМ)	-3,34	3,55	49,5
(S)- α -аллил-аланин(4мМ), (R)- α -метил- β -фенилаланин (3 мМ)	-	-	75,3
(S)- α -аллил-аланин(8 мМ), (R)- α -метил- β -фенилаланин (3 мМ)	-	-	94,5

Выявлено, что при использовании смеси (S)- α -аллил-аланина и (R)- α -метил- β -фенилаланина ингибирование протеиназы К происходит сильнее приблизительно на 25 %, чем при использовании каждой из аминокислот в отдельности и в той же концентрации. Следует отметить, что наибольшее ингибирование протеиназы К (до 92,5 %) достигается при концентрации (S)- α -аллил-аланина до 8 мМ и (R)- α -метил- β -фенилаланина 3 мМ. Повышение концентрации (R)- α -метил- β -фенилаланина в реакционной смеси не оказывает значительного влияния на ингибирование фермента.

Влияние небелковых аминокислот на ингибирование трипсина (2R,3S)- β -гидроксильцином. Исследовано взаимодействие небелковых аминокислот с трипсином методом докинга. Вычислены значения свободной энергии связывания ΔG и константа ингибирования K_i. Результаты вычислений приведены в табл. 2.

Табл.2. Ингибирование трипсина небелковыми аминокислотами

Соединения	ΔG ккал/моль	K _i мМ	Ингибирование (%)
β -имидазолил-(S)-аланин(5мМ)	-5,59	80,41	16,7
β -имидазолил-(S)-аланин (5мМ), (2R,3S)-гидроксильцин (2мМ)	-	-	18,5
p-фтор-(R)-фенилаланин	+25,00	-	22
p-фтор-(R)-фенилаланин(5 мМ), (2R,3S)-гидроксильцин (2мМ)	-	-	56,4
(R)- α -метил- β -фенилаланин (5мМ)	-6,93	8,26	0
(R)- α -метил- β -фенилаланин (5 мМ), (2R,3S)-гидроксильцин (2 мМ)	-	-	86,6
(S)- α -метил- β -фенилаланин (5 мМ)	-6,57	15,3	0
(S)- α -метил- β -фенилаланин (5 мМ), (2R,3S)- β -гидроксильцин (2 мМ)	-	-	72,4
(S)- β -(N-бензиламино)-аланин (5 мМ)	-6,0	11,3	0
(S)- β -(N-бензиламино)-аланин (5 мМ), (2R,3S)-гидроксильцин (2 мМ)	-	-	79,1
(2R,3S)- β -гидроксильцин (2 мМ)	-6,91	12,02	56,9

Для исследования влияния небелковых аминокислот на ингибирование трипсина (2R,3S)- β -гидроксильцином аминокислоты смешивали в таких соотношениях, при которых конечная концентрация (2R,3S)- β -гидроксильцина в реакционной смеси составляла 2 мМ. Другие аминокислоты добавляли в

реакционную смесь в концентрации 5 мМ. Полученные результаты приведены в табл. 2. Измерение активности свидетельствуют о том, что *p*-фтор-*(R)*-фенилаланин слабо ингибирует трипсин и не оказывает никакого влияния на ингибирование фермента $(2R,3S)$ - β -гидроксилейцином. (S) - β -(*N*-бензиламино)-аланин способен взаимодействовать с трипсином, но на активность фермента не оказывает влияния, хотя согласно данным докинг анализа, одним из возможных сайтов связывания является глицин¹⁹². (S) - β -(*N*-бензиламино)-аланин в смеси с $(2R,3S)$ - β -гидроксилейцином усиливает ингибирование последнего. (S) - и (R) - α -метил- β -фенилаланин взаимодействуют с трипсином, однако не оказывают влияния на активность трипсина. При использовании (S) - и (R) - α -метил- β -фенилаланина вместе с $(2R,3S)$ - β -гидроксилейцином ингибирование трипсина значительно усиливается. β -имидазол- (S) -аланин способен взаимодействовать с трипсином ($\Delta G = -5,59$), слабо ингибирует фермент, однако при добавлении в реакционную смесь снижает процент ингибирования $(2R,3S)$ - β -гидроксилейцином почти на 38.

Исследования последних лет показали, что ферменты, в частности протеазы, все чаще оказываются в роли удобных мишеней для лекарственных препаратов. Путем скрининга небелковых аминокислот нами были выявлены и охарактеризованы новые ингибиторы трипсина и протеиназы К [3]. В настоящей работе исследовано влияние (R) - α -метил- β -фенилаланина и (S) -аллил-аланина на активность протеиназы К. Согласно данным, полученным путем докинг анализа, (R) - α -метил- β -фенилаланин образует водородные связи с серином²²⁴ каталитического центра протеиназы К, в то время как (S) -аллил-аланин формирует водородные связи с серином¹³², который вместе с тирозином¹⁰⁴ входит в центр связывания с субстратом фермента. В каталитический центр протеиназы К входит серин²²⁴, гистидин⁶⁹ [5]. Измерение активности протеиназы К показали, что смесь, состоящая из (R) - α -метил- β -фенилаланина (4 мМ) с (S) -аллил-аланина (3 мМ) ингибирует протеиназу К на 75,3%, в то время как по отдельности эти аминокислоты ингибируют фермент почти на 50%. Возможно, усиление ингибирования активности фермента происходит за счет одновременного блокирования каталитического сайта и сайта связывания с субстратом протеиназы К.

Ранее было показано, что $(2R,3S)$ -гидроксилейцин ингибирует трипсин со значением $IC_{50} = 1,92$ мМ. Данные докинг анализа показали, что $(2R,3S)$ -гидроксилейцин образует водородную связь с аспарагиновой кислотой¹⁸⁹ центра связывания с субстратом трипсина (рис. 2) [3].

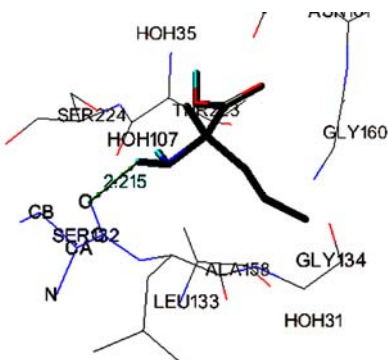


Рис. 2. Комплекс трипсина с $(2R,3S)$ -гидроксилейцином.

Центр связывания с субстратом трипсина включает аспарагиновую кислоту¹⁸⁹ и глицин¹⁹². Каталитический центр трипсина включает серин¹⁹⁵, аспарагиновую кислоту¹⁰² и гистидин⁵⁷ [10]. Известные ингибиторы трипсина также образуют водородную связь с аспарагиновой кислотой¹⁸⁹ трипсина [12]. При комбинировании (2*R*,3*S*)-гидроксилейцина в концентрации 2 мМ с различными небелковыми аминокислотами оказалось, что подавление активности фермента усиливается, когда в реакционной среде присутствует (S)-β-(N-бензиламино)-аланин, (S)-α-метил-β-фенилаланин или (R)-α-метил-β-фенилаланин. Следует отметить, что эти аминокислоты без (2*R*,3*S*)-гидроксилейцина на активность трипсина не действуют. Согласно результатам докинга, (S)-β-(N-бензиламино)-аланин, (S)-α-метил-β-фенилаланин или (R)-α-метил-β-фенилаланин способны формировать комплексы с трипсином. К тому же (S)-β-(N-бензиламино)-аланин, возможно, связывается с глицином¹⁹², который находится в центре связывания с субстратом фермента, что может оказаться причиной усиления ингибирования фермента. Ингибирование активности трипсина заметно слабеет при использовании смеси β-имидазолил-(S)-аланина с (2*R*,3*S*)-гидроксилейцином. Интересно, что добавление β-имидазолил-(S)-аланина в реакционную среду полностью подавляет эффект (2*R*,3*S*)-гидроксилейцина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gade, W., Brown, J.L. Purification, characterization and possible function of alpha-N-acylamino acid hydrolase from bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 86-93, 1981.
2. Havanapan, P.O., Thongboonkerd, V. J. Are protease inhibitors required for gel-based proteomics of kidney and urine? *Proteome Res.*, 8, 3109-3117, 2009.
3. Hovhannisyan, N.A., Harutyunyan, Sh. S., Hovhannisyan, A. M., Hambardzumyan, A.A., Chitchyan, M.B., Melkumyan, M.A., Oganezova, G.G., Avetisyan, N.S. The novel inhibitors of serine proteases. *Amino Acids*, 37, 531-536, 2009.
4. Hsu, J.T.A., Wang, H-Ch, Chen, G-Wu, Shih, Sh-Ru Antiviral Drug Discovery Targeting to Viral Proteases. *Current Pharmaceutical Design (Curr Pharm Des)*, 12, 1301-1314, 2006.
5. Miller, A., Hinrichs, W., Womn, W.M., Saengerj, W. Crystal Structure of Calcium-free Proteinase K at 1.5-Å Resolution. *The Journal of Biol. Chem.*, 269, 23108-23111, 1994.
6. Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *J.Comput.Chem.*, 19, 1639-1662, 1998.
7. Mueller, N.H., Yon, C., Ganesh, V.K., Padmanabhan, R. Characterization of the West Nile virus protease substrate specificity and inhibitors. *Int. J. Biochem Cell Biol.*, 39, 606-614, 2007.
8. Schramm, H.J., Boetzel et al., Buttner, J., Fritsche, E., Gohring, W., Jaeger, E., Konig, S., Thumfart, O., Wenger, T., Nagel, N.E., Schramm W. The inhibition of human immunodeficiency virus proteases by 'interface peptides'. *Antiviral Res.*, 30, 155-170, 1995.
9. Steinkulher, C., Kock, U., Narjes, F., Matassa, V.G. Hepatitis C virus serine protease inhibitors: current progress and future challenges. *Current Medical Chemistry (Curr.Med.Chem.)*, 8, 919-932, 2001.
10. Stroud, R.M. Kay, L.M, Dickerson, R.E. The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Ångstrom and 2-7 Ångstrom resolutions. *J. Mol. Biol.*, 83, 185-208, 1974.
11. Worthington. *Enzymes and related biochemicals*. Millipore Corporation, Bredford, 197-198, 1977.
12. Zablotna E., Kret A., Jaskiewicz A., Olma A., Leplawy M.T., Rolka K. Introduction of alphahydroxymethylamino acid residues in substrate specificity P1 position of trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds retain its activity. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 340, 823-828, 2006.

Поступила 27.06.2012