НЕВАЛЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ АСПАРТИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ПЕНИЦИЛЛОПЕПСИНА С СУБСТРАТАМИ

Алиев Р.Э.
Бакинский государственный университет
ул. Аккад. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ 1148, Азербайджан
e-mail: rashid_aliev@mail.ru

Аннотация. На основе трехмерных структур нативного пенициллопепсина и его ингибиторных комплексов выбрана модель активного центра пенициллопепсина. В модели активного центра конформационная свобода вращения была дана только боковым цепям остатков Asp33, Tyr75 и Asp213. Рассмотрены три возможных электронных состояния боковых цепей Asp33 и Asp213 и связанной с ними молекулы воды. Методом теоретического конформационного анализа изучены конформационные аспекты взаимодействия пенициллопепсина с дипептидами Leu-Trp и Trp-Ile. Показано, что продуктивные невалентные комплексы пенициллопепсина с субстратами низкоэнергетичны. Внутри – и межмолекулярные взаимодействия у молекул фермента и субстратов согласованы и не приводят к стерической деформации расщепляемой связи. Анализ возможных ориентаций гидролизируемой пептидной связи и нуклеофильной молекулы воды относительно остатков Asp 33, Tyr 75 и Asp213 пенициллопепсина выявил роль этих остатков в процессе катализа.

Ключевые слова: пенициллопепсин, невалентные комплексы, конформационный анализ.

NONCOVALENT COMPLEXES OF ASPARTIC PROTEASE OF PENICILLOPEPSINE WITH SUBSTRATES

Aliyev R.E.
Baku State University
Z. Khalilov St, 23, Baku, AZ 1148, Azerbaijan
e-mail: rashid_aliev@mail.ru

Annotation. On the basis of three-dimensional structures of native penicillopepsine and its inhibitory complexes the model of active center has been chosen. In the model of the active site the conformational freedom of rotation has been given only to the side chains of residues Asp33, Tyr75 and Asp213. Three possible electronic state of the side chains of Asp33 and Asp213 and connected with them water molecule were considered. Using the method of theoretical conformational analysis conformational aspects of interaction of penicillopepsine with Leu-Trp and Trp-Ile dipeptides were studied. It is shown that productive noncovalent complexes of penicillopepsine with substrates are low-energy. Inside - intermolecular interactions of molecules of enzyme and substrates are aligned and do not lead to steric strain of cleavable bond. Analysis of possible orientations of hydrolyzed peptide bond and nucleophile water molecule relatively to Asp33, Tyr75 and Asp213 residues of penicillopepsine revealed the role of these residues during catalysis processes.

Keywords: penicillopepsine, noncovalent complexes, conformational analysis.

Сорбция субстрата и образование невалентного фермент-субстратного комплекса индуцирует, необходимые для протекания реакции, конформационные перестройки как в активном центре фермента, так и у субстрата. Для понимания стереохимических причин эффективности и специфичности ферментативной реакции необходимо промоделировать это процесс, а это возможно лишь с помощью расчетных методов. Метод расчета фермент-субстратных взаимодействий [1] позволяет, используя кристаллографические структуры нативного фермента и фермент-ингибиторных комплексов выбрать физическую модель “активного центра” фермента и перейти на основе подходов теоретического конформационного анализа к априорному расчету структуры невалентного фермент-субстратного комплекса. В настоящем сообщении, используя трехмерные структуры нативного пенициллопепсина и его ингибиторных комплексов [2, 3] методом теоретического конформационного анализа изучены конформационные аспекты взаимодействия пенициллопепсина с дипептидами Ac – L – Leu – L – Trp – NHMe и Ac – L – Trp – L – Ile –NHMe.

Пенициллопепсин – фермент микробного происхождения, принадлежит семейству аспартильных протеиназ. Анализ известных кристаллографических структур аспартильных протеиназ растительного, животного, микробного и ретровирусного происхождения [4] показал, что несмотря на различие аминокислотных последовательностей, эти ферменты имеют родственные трехмерные структуры и общими для них является строение активного центра, в котором боковые цепи реакционных остатков аспарагиновых кислот образуют между собой водородные связи и между ними расположена молекула воды.

В выбранной нами модели “активного центра” пенициллопепсина [5] конформационная свобода вращения была дана только боковым цепям остатков Asp33, Tyr75 и Asp213. Остальные атомы активного центра считались неподвижными. При расчете продуктивных конформаций невалентных комплексов пенициллопепсина с субстратами Leu-Trp и Trp-Ile мы рассматривали три возможных электронных состояния боковых цепей реакционных остатков Asp33 и Asp213:

1) боковые цепи Asp33 и Asp 213 ионизованы и молекула воды симметрично расположена по отношению к этим остаткам; 2) боковая цепь Asp33 ионизована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь протонирована; 3) боковая цепь Asp213 ионизована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь протонирована.

Выбор дипептидов Leu-Trp и Trp-Ile при исследовании невалентых комплеков пенициллопепсина связан с тем что эти молекулы являются простейшими моделями субстратов, позволяющими рассмотреть вопросы первичной и вторичной специфичности пенициллопепсина, а также выяснить побудительные мотивы

конформационных изменений, возникающих у фермента и субстрата при создании продуктивной ориентации расщепляемой пептидной связи $P_1 – P_1'$ субстрата.

Конформационная энергия фермент-субстратных комплексов представлялась как сумма невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий. Учитывалось образование внутри-субстратных и фермент-субстратных водородных связей. Использованные в расчетах, потенциальные функции и полуэмпирические параметры подробно описаны в [5]. При проведении конформационных расчетов мы исходили из того, что пенициллопепсин, как и другие аспартильные протеиназы функционирует по невалентному типу катализа [6] и не были связаны ни с какими априорными предположениями о конкретной схеме механизма катализа. Предполагалось, что молекула воды, связанная с боковыми цепями каталитически активных остатков Asp33 и Asp213, является нуклеофильной частицей, атакующей карбонильную группу субстрата. Отсчет двугранных углов φ, ψ, ω и χ произведен согласно стандартной номенклатуре [7]. Расчетная модель невалентных комплексов представлена на рисунке 1.

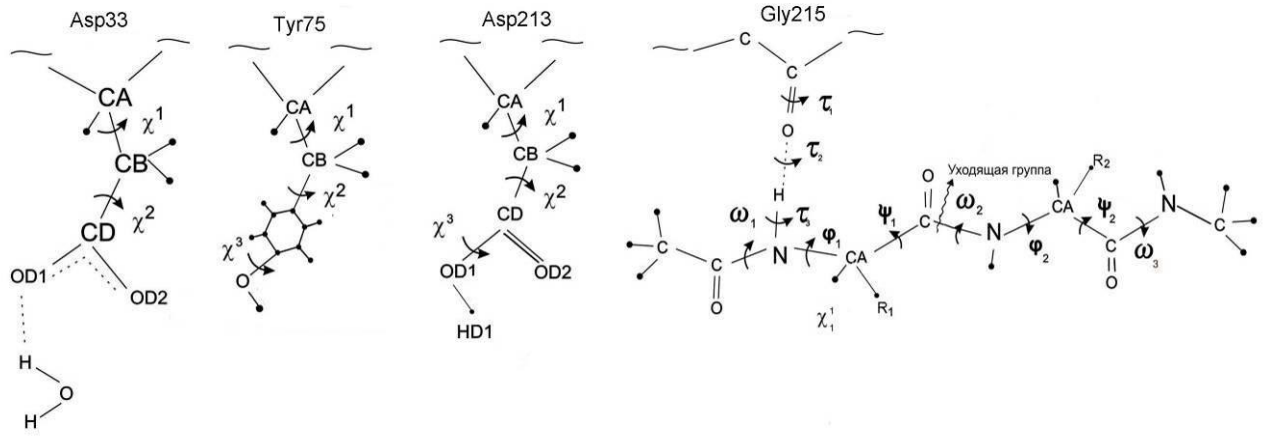

Рисунок 1 – Расчетная модель дипептида (а,б) и остатков активного центра а) R_1 – боковая цепь Leu; R_2 – боковая цепь Trp б) R_1 – боковая цепь Trp; R_2 – боковая цепь Ile

Сорбция, ориентация и поиск продуктивных конформаций выбранных нами субстратов в активном центре пенициллопепсина произведен способом, приведенным в [8-10]. При сорбции субстрата мы использовали информацию, известную из данных рентгеноструктурного анализа комплекса пенициллопепсина с ингибитором Iva – Val – Val – Sta –OEt[3], о том, что амидная N-H группа статина образует водородную связь с карбонильной C=O группой Gly215 пенициллопепсина. В таблице 1 приведены геометрические (двугранные углы) и энергетические (ккал/моль) параметры оптимальных конформаций дипептидов Leu – Trp и Trp –Ile в продуктивных невалентных комплексах пенициллопепсина. В результате проведенного расчета невалентных комплексов пенициллопепсина с дипептидами Leu-Trp и Trp-Ile установлено, что отбирая конформации с энергетической точки зрения, мы приходим к продуктивному комплексу, а именно, к его подготовленности к последующим за невалентным комплексов стадиям каталитического акта. На рисунке 2 показана возможная

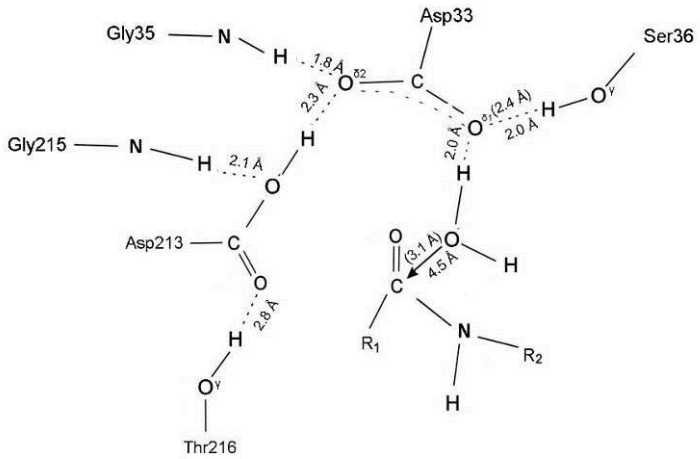

Рисунок 2 – Расположение расщепляемой группы субстрата и боковых цепей Asp33 и Asp213 в продуктивном невалентном комплексе пенициллопепсина (межатомные расстояния даны в Å)

схема образования и длины водородных связей активного центра пенициллопепсина в его нативном, предкаталитическом, состоянии и расстояние в скобках после сорбции субстрата. Действительно, в результате незначительного поворота по χ1(5°) и по χ2(13°) боковой цепи Asp33 ослабевает водородная связь OD1 Asp 33 с

$H\gamma$ ·Ser36, но зато сближается кислорода молекулы воды с C' атомом расщепляемой связи. Нами показано, что протонированные аспартаты Asp33 или Asp213 не могут выступать в роли электрофильного активатора расщепляемой связи, а также выступать в качестве донора протона на N уходящей группы, т.к. эти атомы невозможно сблизить ближе, чем 6.0 Å. Установлено, что гидроксильная группа боковой цепи Tyr 75 не может служить донором протона на N уходящей группы.

Таблица 1 – Расчетные значения двугранных углов (град.) и энергетические параметры (ккал/моль) низкоэнергетических конформаций Ac – L – Leu – L – Trp – NHMe и Ac – L – Trp – L – Ile – NHMe в потенциальном поле активного центра пенициллопепсина

Конформация	Двугранные углы											Энергия		
	Leu						Trp					$E_{ф+с}$	$E_с$	$E_{комп}$
	ω_1	ϕ_1	χ^1	χ^2	ψ_1	ω_2	ϕ_2	χ^1	χ^2	ψ_2	ω_3			
B_{21}-B_{31}	180	-160	-179	62	121	-175	-75	-78	90	145	180	-33.0	-10.5	-43.5
B_{32}-B_{32}	180	-158	-60	180	115	-178	-65	-69	-87	145	180	-35.5	-5.0	-40.5
B_{31}-B_{31}	180	-164	-60	60	115	-176	-70	-69	91	145	180	-36.4	-3.4	-39.8
	Trp						Ile							
B_{31}-B_{31}	180	-162	-60	90	124	-175	-65	-59	68	149	180	-37.8	-11.4	-49.2

$E_{ф+с}$ – энергия взаимодействия фермента с субстратами,
$E_с$ – конформационная энергия субстрата,
$E_{комп}$ – энергия фермент-субстратного комплекса

Список литературы / References:

1. Попов Е.М. *Структурно-функциональная организация белков*. М: Наука, 1992, 358 с. [Popov E.M. *Structural-functional organization of proteins*. Moscow: Nauka, 1992, 358 p. (In Russ.)]

2. James M.N.G., Sielecki A.R. Structure and refinement of penicillopepsin at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol*., 1983, vol. 163, pp. 299-361

3. James M.N.G., Sielecki A.R., Hofmann T. X-ray diffraction studies on penicillopepsin and its complexes. The hidrolitic mechanism. In *Aspartic proteinases and their inhibitors* (ed. V. Kostka). Walter de Gruyter, Berlin, 1985, pp. 163-177.

4. Andreeva N.S., Rumsh L.D. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amin acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Science*, 2001, vol. 10, pp. 2439-2450.

5. Алиев Р. Конформационнаые возможности аминокислотных остатков субстратсвязывающей полости пенициллопепсина. *J. of Qafqaz University*, 2004, № 14, pp. 115-119. [Aliyev R. Conformational possibilities of the aminoacide residues of the substrate binding cavity of the penicillopepsine. *J. of Qafqaz University*, 2004, no. 14, pp. 115-119. (In Russ.)]

6. Антонов В.К. *Химия протеолиза*. М: Наука, 1991, 504 с. [Antonov V.K. *Chemistry of proteolysis*. Moscow: Nauka, 1991, 504 p. (In Russ.)]

7. IUPAC – IUB. Commision on Biochemical Nomenclature. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, vol. 229, pp. 1-17.

8. Алиев Р.Э. Конформационные аспекты взаимодействия пенициллопепсина с метиламидом N-ацетил-L-аланином. *Вестник Бакинского Университета, серия физ-мат. наук*, 2011, № 4, с. 132-137. [Aliyev R.E. Conformational aspects of interaction between penicillopepsine and N-acetil-L-alanine metylamide. *News of Baku University, series of physic-mathematicl sciences*, 2011, no. 4, pp.132-137 (In Russ.)]

9. Алиев Р.Э., Кадымова Ф.А. Теоретический конформационный анализ невалентного комплекса пенициллопепсина с метиламидом N-ацетил-L-фенилаланил-L-фенилаланином. *Вестник Бакинского университета, серия физ-мат. наук*, 2013, № 4, с. 172-180. [Aliyev R.E., Gadimov F.A. Theoretical conformational analysis of non-valent complex of penicillopepsine with N-acetil-L-phenylalanine metylamide. *News of Baku University, series of physico-mathematical sciences*, 2013, no. 4, pp. 172-180 (In Russ.)]

10. Алиев Р.Э. Теоретический конформационный анализ невалентных комплексовпенициллопепсинас модельными субстратами. *Вестник Бакинского университета, серия физ-мат. наук*, 2014, № 3, с. 149-155. [Aliyev R.E. Theoretical conformational analysis of non-valent complex of penicillopepsine with model substrates. *News of Baku University, series of physico-mathematical sciences*, 2014, no. 3, pp. 149-155 (In Russ.)]