

**КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РЕАКЦИОННЫХ  
ОСТАТКОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПАПАИНА****Р.Э.АЛИЕВ***Бакинский Государственный Университет  
rashid - aliyeв @ mail.ru*

*Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности боковых цепей реакционных остатков Gln19, Cys25, His159 и Asn175 в поле активного центра нативного папаина. Конформационный анализ выявил стерически разрешенные повороты боковых цепей этих остатков в свободном ферменте. Показано, что в предкаталитическом состоянии они находятся в низкоэнергетических конформационных состояниях.*

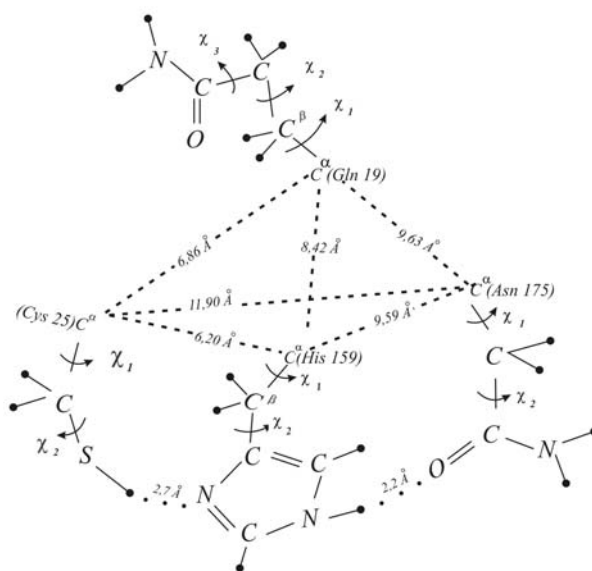
Цистеиновая протеаза папаин проявляет наибольшую активность при значениях  $\text{pH} \sim 6$  и функционирует по типу ковалентного катализа [1]. Нуклеофилом у папаина, непосредственно взаимодействующим с субстратом и образующим с ним промежуточные валентные комплексы является тиоловая группа Cys25. Анализ кристаллографических структур цистеиновых протеаз с субстратоподобными ингибиторами [2-3] выявил области связывания активного центра папаина с субстратом, а также выяснил роль реакционных остатков. У папаина реакционными остатками, боковые цепи которых непосредственно участвуют в каталитическом акте, являются Cys25, His159 и Asn175. Важную роль при сорбции субстрата в активном центре папаина играет также боковая цепь Gln19. Целью нашего исследования является анализ конформационных возможностей боковых цепей реакционных остатков (Cys25, His159, Asn175 и Gln19) до сорбции субстрата, т.е. в предкаталитическом состоянии. Результаты такого конформационного анализа необходимы для понимания стереохимических причин каталитического акта и процесса ингибирования.

**МЕТОД РАСЧЕТА**

Исследование конформационных состояний боковых цепей функционально-важных остатков (Cys25, His159, Asn175 и Gln19) активного центра папаина в его свободном предкаталитическом состоянии выполнено нами методом теоретического конформационного анализа, используя кристаллографическую структуру комплекса папаина с ингибиторами [2]. Для решения поставленной задачи, используя кристаллографические данные Дрента [2], выбрана физическая модель жесткого «активного центра» папаина, в котором атомы рассматривались как «неподвижные». Подвижными были только атомы боковых цепей Cys25, His159, Asn175 и Gln19. В «активный центр» папаина

вошли те остатки фермента, атомы которых попадают в сферы радиуса  $15 \text{ \AA}$  с центрами на  $C^\alpha$  атомах реакционных остатков Cys25, His159, Asn175 и Gln19. Сформулированный, таким образом, «активный центр» папаина включает 123 аминокислотных остатка из 212 ему присущих, или приблизительно 58% всего белка. Это следующие участки папаина: Trp7-Arg8; Val13-Ile34; Gln47-Asp57; Arg59-leu72; Arg83; Tyr86-Arg93; Pro129-Phe149; Cys153-Tyr166; Ile171-Ile189; Tyr197-Phe207;

Как известно, с помощью рентгеноструктурного анализа высокого разрешения можно получить только координаты тяжелых атомов фермента – С, N, O и S. Координаты Н атомов активного центра так необходимые для проведения расчета конформационных состояний боковых цепей реакционных остатков, найдены нами на основе координат атомов С, N, O и S используя при этом простые стереохимические положения. Всего в сформированный вышеуказанным способом, «активный центр» папаина вошел 1861 атом. Ранее, нами изучены конформационные возможности реакционных остатков (Cys25, His159, Asn175 и Gln19) в поле «активного центра» папаина, в который вошло 1203 атома [4-5]. Расширение «активного центра» папаина связано с апробацией физической модели.



**Рис.1.** Расчетная модель реакционных остатков (Cys25 – His159 – Asn175 – Gln19) активного центра папаина.

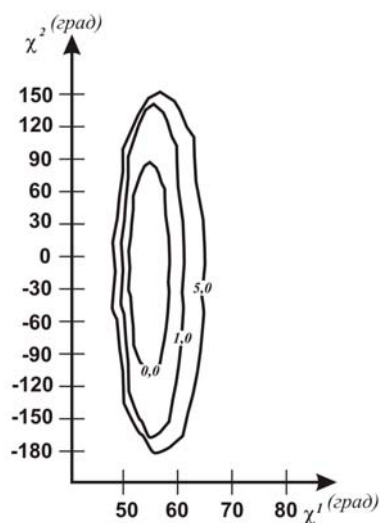
На рис.1 приведена расчетная модель «активного центра» папаина. Переменными параметрами являются двугранные углы вращения  $\chi$  вокруг связей боковых цепей. Отсчет двугранных углов проводился согласно стандартной номенклатуре IUPAC-IUB [6]. Расчет конформационных состояний боковых цепей реакционных остатков (Cys25, His159, Asn175 и Gln19) выполнен по программе невалентных взаимодействий, которая обеспечивает вычисление

конформационных параметров боковых цепей реакционных остатков папаина с учетом их взаимодействий со всеми атомами «активного центра», которые рассматривались как «неподвижные». Это означает, что конформационная подвижность допускалась только для боковых цепей (Cys25, His159, Asn175 и Gln19), основные же цепи этих остатков и все остальные остатки «активного центра» папаина жестко фиксировались в соответствии с координатами тяжелых атомов, полученных из кристаллографических данных [2].

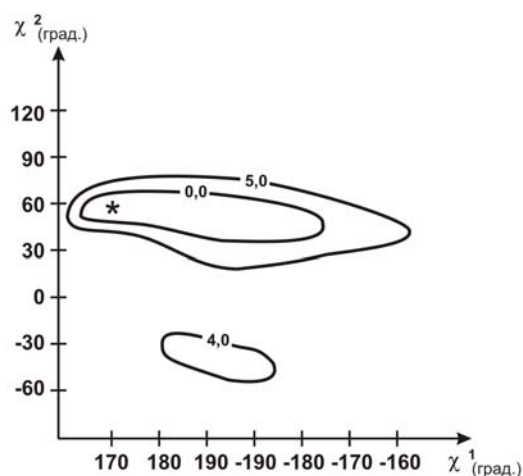
Конформационная энергия представлялась как сумма невалентных и электростатических взаимодействий, а также торсионных вкладов и водородных связей. Используемые в расчете потенциальные функции и полуэмпирические параметры для оценки вышеуказанных взаимодействий подробно описаны [12]. Представления о конформационных возможностях боковых цепей (Cys25, His159, Asn175 и Gln19), получены из конформационных карт построенных сначала с шагом в  $30^{\circ}$ , а в областях низкой энергии – шагом в  $10^{\circ}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 2 приведена конформационная карта  $\chi^1 - \chi^2$  боковой цепи Cys25 в потенциальном поле активного центра папаина. Крестиком \* помечено оптимальное значение двугранных углов. Как видно из рисунка 2 боковая цепь Cys25 обладает заметной подвижностью по углу  $\chi^1$  и может легко подстраиваться к новому окружению в процессе катализа.



**Рис.2.** Сечение потенциальной поверхности боковой цепи Cys25 в потенциальном поле активного центра папаина (энергия на эквипотенциальных кривых дана ккал/моль).



**Рис.3.** Сечение потенциальной поверхности  $\chi^1 - \chi^2$  боковой цепи His159 в потенциальном поле активного центра папаина (энергия на эквипотенциальных кривых дана ккал/моль).

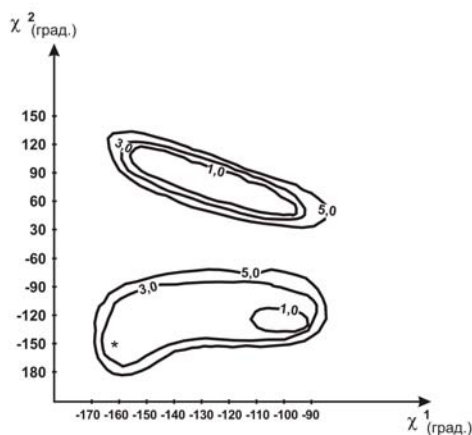
Результаты исследований конформационных возможностей боковой цепи His159 в потенциальном поле активного центра папаина приведены на рисунке

3 в виде конформационной карты  $\chi^1 - \chi^2$ . Крестиком \* помечены оптимальные значения двугранных углов  $\chi^1 = 175^\circ$  и  $\chi^2 = 60^\circ$ . Как видно из рисунка 3 боковая цепь His159 имеет два низкоэнергетических минимума, отличающихся на 4 ккал/моль. Глобальный минимум, окаймленный контуром 0.0 ккал/моль соответствует нативному положению остатка, при котором имидазольное кольцо со стороны атома N<sup>ε2</sup> сближено с боковой цепью цистеина.

В результате конформационного анализа показано, что боковая цепь His159 обладает заметной подвижностью (допустимы низкоэнергетические изменения двугранных углов  $\chi^1$  и  $\chi^2$  в пределах 10 – 40°).

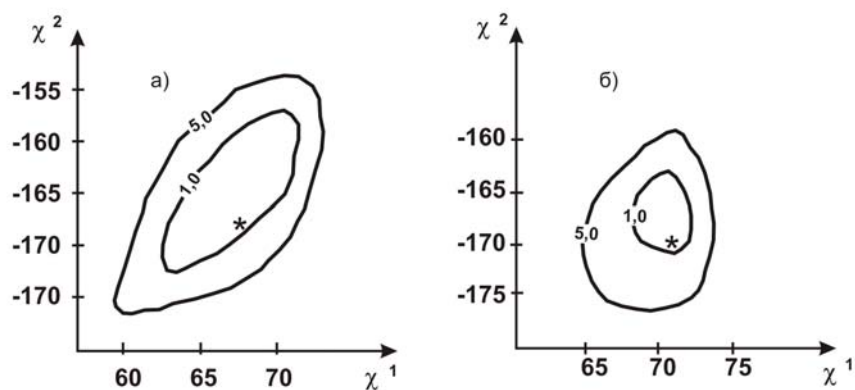
Таким образом, у папаина боковая цепь функционально важного остатка гистидина не зажата в белке жестко, а может легко подстраиваться в процессе катализа.

На рисунке 4 приведена конформационная карта  $\chi^1 - \chi^2$  боковой цепи Asn175. Как видно из рисунка 4 боковая цепь Asn175 имеет два низкоэнергетических минимума, разделенных значительным энергетическим барьером. Крестиком \* помечены значения двугранных углов  $\chi^1 = -165^\circ$  и  $\chi^2 = -152^\circ$  соответствующие нативному положению Asn175. Боковая цепь Asn175 также оказалась не зажата в белке и обладает заметной подвижностью как по углу  $\chi^1$ , так и по углу  $\chi^2$ .



**Рис. 4.** Сечение потенциальной поверхности  $\chi^1 - \chi^2$  боковой цепи Asn175 в потенциальном поле активного центра папаина (энергия на эквипотенциальных кривых дана ккал/моль).

На рисунке 5 (а и б) приведены конформационные карты  $\chi^1 - \chi^2$  боковой цепи Gln19 в потенциальном поле активного центра папаина. Сечения потенциальной поверхности найдены для двух положений боковой цепи Gln19:  $\chi^3 = -90^\circ$  (рис. 5а) и  $\chi^3 = 90^\circ$  (рис.5б). Крестиком \* помечены оптимальные значения двугранных углов  $\chi^1$  и  $\chi^2$ .



**Рис. 5 (а и б).** Сечение потенциальной поверхности боковой цепи Gln19 в потенциальном поле активного центра папаина (энергия на эквипотенциальных кривых дана ккал/моль).

Как видно из рисунка 5(а и б) низкоэнергетическая область изменения двугранных углов  $\chi^1$  и  $\chi^2$  составляет несколько градусов. Проведенный анализ конформационных возможностей боковых цепей реакционных остатков Cys25, His159, Asn175 и Gln19 установил, что боковые цепи этих остатков в предкаталитическом состоянии, т.е. до сорбции субстрата находятся в низкоэнергетическом состоянии и обладают заметной подвижностью по углам  $\chi^1$  и  $\chi^2$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991, 504 с.
2. Drenth I., Kalk K.H., Swen H.m. – Biochem., 1976, v.15, p. 3731-3738.
3. Min Zhanq, Zhiyi Wei, Shaijie Chanq, Maikun Tenq and WeiminGonq Journal of Molecular biology, 2006, v. 358, p. 97-105.
4. Алиев Р.Э. Вестник Бакинского Университета, серия физ.- мат. наук, 2000, №2, с.14-18.
5. Алиев Р.Э., Кадымова Ф.А. Труды пятой Международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы физики», Баку: 2008, с. 146-147.
6. IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature. Biochem. Biophys. Asta, 1971, v.229, p.1-17.

#### ПАПАИНИН КАТАЛИТИК ФƏАЛ АМИН ТУРШУ QALIQLARININ KONFORMASIYA İMKANLARI

**Р.Ə.ƏLİYEV**

#### ANNOTASIYA

Nəzəri konformasiya analizi üsulu ilə təbii papainin Gln19, Cys25, His159 və Asn175 katalitik fəal amin turşu qalıqlarının konformasiya imkanları tədqiq edilmişdir. Konformasiya analizi sərbəst fermentdə bu qalıqların yan zəncirlərinin sterik cəhətdən mümkün olan fırlanmalarını aşkar etmişdir. Katalitik funksiya yerinə yetirmişdir. Əvvəl bu amin turşularının kiçik enerjili hallarda olduğu göstərilmişdir.

# **THE CONFORMATIONAL POSSIBILITIES OF REACTIVE RESIDUES OF PAPAIN'S ACTIVE CENTRE**

**R.A.ALIYEV**

## **SUMMARY**

The article studies the conformational possibilities of Gln19,Cys25,His159 and Asn175 catalytic active amino acids of native papain residues by the method of catalytic theoretical conformational analysis. The steric permitted turns of side chains of these residues were observed in free segment. It was shown that they are in low energy conformational states at precatalytic states.