

УДК 577. 15. 04

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ  
НЕВАЛЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ПЕНИЦИЛЛОПЕПСИНА  
С МЕТИЛАМИДОМ  
N- АЦЕТИЛ – L – ФЕНИЛАЛАНИЛ – L – ФЕНИЛАЛАНИНОМ**

**Р.Э.АЛИЕВ, Ф.А.КАДЫМОВА**

*Бакинский Государственный Университет*

*rashid\_aliev@mail.ru*

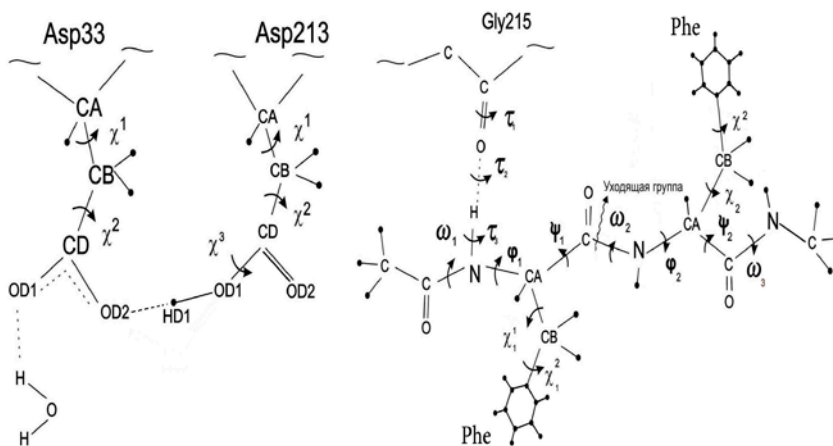
*На основе кристаллографических структур нативного пенициллопепсина и его ингибиторных комплексов методом молекулярной механики изучены конформационные аспекты взаимодействия пенициллопепсина с метиламидом N – ацетил – L – фенилаланином и метиламидом N – ацетил – L – фенилаланил – L – фенилаланилаланином. Рассмотрены два возможных состояния боковых цепей Asp 33 и Asp 213 и связанной с ними молекулы воды. Установлены возможные ориентации гидролизуемой пептидной связи и нуклеофильной молекулы воды относительно реакционных остатков Asp 33 и Asp 213 пенициллопепсина. Выявлена роль этих остатков в процессе катализа.*

**Ключевые слова:** невалентный комплекс, пенициллопепсин, конформационный анализ

В настоящем сообщении, используя кристаллографические структуры нативного пенициллопепсина и его ингибиторных комплексов [1, 2], на классической основе при помощи полуэмперического метода атом-атомных потенциалов, изучены конформационные аспекты взаимодействия пенициллопепсина с метиламидом N – ацетил – L – фенилаланином и метиламидом N – ацетил – L – фенилаланил – L – фенилаланилаланином.

Выбор этих молекул при исследовании невалентных комплексов пенициллопепсина связан с тем, что эти соединения являются простейшими моделями субстратов, позволяющими рассмотреть вопросы первичной и вторичной специфичности. Расчет позволил бы получить количественные оценки энергетических и геометрических параметров всех возможных конформационных состояний субстратов в поле активного центра фермента и выяснить роль взаимодействия боковых цепей субстратов с участками активного центра в создании продуктивной ориентации расщепляемой пептидной связи  $P_1 - P_1'$  субстрата.

При проведении конформационных расчетов невалентных комплексов мы исходили лишь из того, что пенициллопепсин, как и другие аспартатные протеазы функционирует по невалентному типу катализа [3]. Нуклеофильной частицей, атакующей карбонильную группу субстрата, является молекула воды, связанная с боковыми цепями реакционных остатков Asp 33 и Asp 213, способствующих отщеплению протона от нее. Причем в процессе реакции фермент не образует с субстратом промежуточных валентных соединений. Такой механизм функционирования фермента требует точной взаимной ориентации реакционных групп активного центра расщепляемой группы субстрата и молекулы воды. В проводимом нами стереохимическом анализе невалентных фермент-субстратных комплексов мы использовали метод априорного расчета конформационных аспектов механизма ферментативных реакций [4]. Этот метод позволяет, используя трехмерные структуры высокого разрешения нативного фермента и его фермент-ингибиторных комплексов, выбрать физическую модель “активного центра” фермента. В “активный центр” пенициллопепсина вошли координаты 224 остатков из 313, присущих пенициллопепсину. Выбор физической модели “активного центра” пенициллопепсина обоснован нами в [5, 6]. Там же приведены, использованные в расчетах, потенциальные функции и полуэмперические параметры. В расчете конформационной энергии невалентных комплексов учитывались невалентные и электростатические взаимодействия всех атомов “активного центра” пенициллопепсина и субстратов, а так же энергия водородных связей и торсионная энергия вращения вокруг одинарных связей боковых и основных цепей субстрата и остатков активного центра Asp 33 и Asp 213. Отсчет двугранных углов  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi$  произведен согласно номенклатуре [7]. Расчетная модель невалентного комплекса представлена на рис.1.



**Рис.1.** Расчетная модель  $\text{CH}_3\text{CO} - \text{L} - \text{Phe} - \text{L} - \text{Phe} - \text{NHCH}_3$  и остатков активного центра Asp33 и Asp213, связанных с молекулой воды.

При проведении стереохимического анализа невалентных комплексов пенициллопепсина с постепенно усложняющимися по структуре субстратами (Ac – L – Phe – NHMe и Ac – L – Phe – Phe – NHMe) мы рассматривали два возможных состояния боковых цепей реакционных остатков т ассимитричного расположения молекулы воды по отношению к этим остаткам: 1) боковая цепь Asp33 ионизована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь Asp213 протонирована; 2) боковая цепь Asp213 ионизована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь Asp33 протонирована.

### Невалентный комплекс пенициллопепсина с метиламидом N-ацетил – L – фенилаланином

Рассмотрев ранее [8] невалентный комплекс пенициллопепсина с Ac – L – Ala – NHMe, нам удалось ответить на многие вопросы, а именно: независимо от природы боковой цепи субстрата в P<sub>1</sub> положении продуктивный фермент - субстратный комплекс образуется, если угол φ сорбируемого остатка будет иметь значение в интервале -170° – -140°, протонированные боковые цепи Asp33 и Asp213 не могут служить электрофильными активатором разрываемой связи, а также не могут быть донорами протона на N уходящей группы.

В [3] указано, что для пепсина в положении P<sub>1</sub> реальны остатки Phe и Leu, а в положении P<sub>1</sub>' также Phe и Leu. Следующий шаг в исследовании невалентных фермент-субстратных взаимодействий преследовал цель определить оптимальную конформацию субстрата с определенной объемной боковой цепью Phe. Для этого субстрата, как и в случае с Ac – L – Ala – NHMe [8] при трех значениях ψ (два из В области ψ=140° и ψ=70°, а также из R области ψ=-60°) и трех возможных положениях χ<sup>1</sup> = -60°, 180° и 60°, а χ<sup>2</sup> = 90° во всех положениях χ<sup>1</sup>, строились энергетические конформационные карты τ<sub>3</sub> – φ.

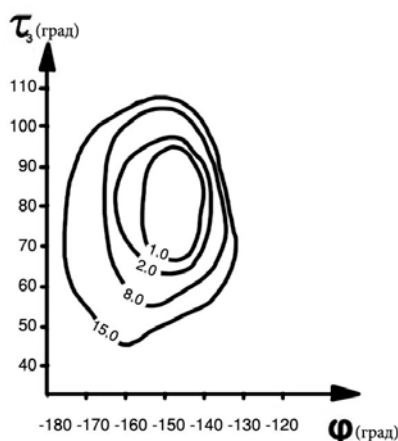


Рис. 2. Сечение потенциальной поверхности τ<sub>3</sub> – φ метиламида N – ацетил – L – фенилаланина при χ<sup>1</sup> = -60°, χ<sup>2</sup> = 90° и ψ = 140°.

На рис. 2 приведена эта карта для  $\psi=140^\circ$ . Расчет показал, что стерически разрешенными оказалось лишь положение боковой цепи Phe с  $\chi^1 = -60^\circ$ , когда  $\psi=140^\circ$ ,  $70^\circ$  и  $-60^\circ$ . Два других положения  $\chi^1 = -60^\circ$  и  $180^\circ$  боковой цепи субстрата приводят к огромным, многотысячным ккал/моль, наталкиваниям с атомами фермента. Нами были оптимизированы все три структурных варианта метиламида N – ацетил – L – фенилаланина при изменении углов  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega$  и  $\chi$  в поле выбранного активного центра пенициллопепсина с допущением конформационной свободы боковых цепей Asp33 и Asp213. Результаты минимизации приведены в табл.1.

**Таблица 1**

Геометрические (град) и энергетические (ккал/моль) параметры оптимальных конформаций метиламида N- ацетил –L- фенилаланина в невалентном комплексе с пенициллопепсином.

Конформация	Двугранные углы						Энергия		
	$\phi$	$\psi$	$\omega_1$	$\omega_2$	$\chi_1$	$\chi_2$	$E_{\text{ф+с}}$	$E_c$	$E_{\text{компл}}$
$B'_3$	-146	142	180	180	-59	103	-20.5	-4.3	-24.8
$B_3$	-147	45	179	175	-62	84	-22.4	-2.9	-25.3
$R_3$	-148	-63	-177	-170	-61	90	-20.9	-3.7	-24.6

$E_{\text{ф+с}}$  – энергия взаимодействия фермента с субстратом;  $E_c$  – конформационная энергия субстрата,  $E_{\text{компл}}$  – энергия фермент – субстратного комплекса

Все три близкие по энергии, конформации субстрата Ac – L – Phe – NHMe в невалентном комплексе пенициллопепсина отличаются только значениями  $\phi$  и они являются, как будет показано ниже, продуктивными. В этих конформациях гидролизуемая пептидная связь ориентирована относительно кислорода OW молекулы воды, связанной с боковой цепью Asp33 и HG1 атома боковой цепи Asp213. Эти расстояния, OW→C' и HG1→N уходящей группы, в невалентном комплексе при нативном положении боковых цепей Asp33 ( $\chi_1 = -176^\circ$ ,  $\chi_2 = -1^\circ$ ) и Asp213 ( $\chi_1 = -172^\circ$ ,  $\chi_2 = 5^\circ$ ,  $\chi_3 = 180^\circ$ ) в конформации  $B'_3$  равны, соответственно, (4.5Å и 7.1Å), в  $B_3$  (4.5Å и 6.7Å) и  $R_3$  (4.5Å и 4.9Å). Расстояние HG1 (Asp213) и карбонильного кислорода разрываемой связи в этих конформациях равно 5Å.

В результате незначительного поворота по  $\chi_1$  и  $\chi_2$  боковой цепи Asp33 ( $\chi_1 = -166^\circ$ ,  $\chi_2 = -25^\circ$ ) и поворота на  $180^\circ$  по  $\chi_2$  боковой цепи Asp213 ( $\chi_1 = -172^\circ$ ,  $\chi_2 = 180^\circ$ ,  $\chi_3 = 180^\circ$ ) происходит сближение OW→C' до 3.2 Å, а HG1→N уходящей группы до 6.3Å. Все это происходит только за счет стабилизирующих взаимодействий. Во всех этих допускаемых поворотах по  $\chi_1$  и  $\chi_2$  вокруг боковых цепей Asp33 и Asp213 при образовании продуктивного невалентного комплекса невозможно сближение HG1

(Asp213) и атома О карбонильной группы разрываемой связи ближе чем 4.0 Å, т.е. отпадает предположения поляризации карбонильной группы субстрата, за счет образования водородной связи между этой группой и HG1 остатка Asp213, а так же протонирование атома азота разрываемой связи боковыми цепями Asp33 или Asp213.

В случае, если бы молекула воды была бы связана с ионизованной боковой цепью Asp213, то вышеуказанные расстояния при нативном положении боковой цепи Asp213 ( $\chi_1=-172^\circ$ ,  $\chi_2 = 5^\circ$ ) и Asp33( $\chi_1=-176^\circ$ ,  $\chi_2 = 1^\circ$ ,  $\chi_3 = 180^\circ$ ) будут, например, в конформации В<sub>3'</sub> (4.8Å и 7.2Å), а при повороте вокруг  $\chi_1$  и  $\chi_2$  (Asp33 и Asp213) и новом положении боковых цепей Asp213 ( $\chi_1=-177^\circ$ ,  $\chi_2 = 49^\circ$ ), и Asp33 ( $\chi_1=-176^\circ$ ,  $\chi_2 = 180^\circ$ ,  $\chi_3 = 180^\circ$ ) эти расстояния уменьшаются до (3.4Å и 6.5Å), соответственно. Рассчитанные координаты атомов боковых цепей реакционных остатков Asp33, Asp213 и H<sub>2</sub>O (для двух возможных расположений H<sub>2</sub>O относительно Asp33 и Asp213):

1) Asp33 + H<sub>2</sub>O, протонированная Asp213 и 2) Asp213+H<sub>2</sub>O, протонированная Asp33 в продуктивном комплексе пенициллопепсина с метиламидом N – ацетил – L –фенилаланином в В<sub>3'</sub> конформации приведены в табл.2.

**Таблица 2**

Координаты атомов в (Å) боковых цепей реакционных остатков Asp33, Asp213 и H<sub>2</sub>O (два возможных расположения H<sub>2</sub>O):

I) Asp33 + H<sub>2</sub>O, протонированная Asp213 и II) Asp213 + H<sub>2</sub>O, протонированная Asp33 в нативном ферменте (а) и в продуктивном комплексе (б) пенициллопепсина в В<sub>3</sub> конформации метилламид N-ацетил-L-фенилаланина.

Фрагмент	Атом	X		Y		Z		фрагмент	Атом	X		Y		Z			
		а	б	а	б	а	б			а	б	а	б				
Asp33	I								Asp33	II							
	HB	30.44	30.57	12.21	12.23	3.49	3.37	HB		30.44	30.44	12.21	12.21	3.49	3.49		
	HB	31.84	31.86	13.25	13.84	3.62	3.77	HB		31.84	31.85	13.25	13.25	3.62	3.62		
	CG	30.74	30.56	13.02	12.87	5.44	5.40	CG		30.74	30.74	13.02	13.02	5.44	5.44		
	OG1	31.28	30.69	12.00	11.69	5.89	5.74	OG1		31.28	30.15	12.00	13.95	5.89	6.02		
OG2	30.12	30.15	13.77	13.70	6.22	6.25	OG2	30.12	31.32	13.77	12.16	6.22	6.13				
H <sub>2</sub> O	H	30.73	30.06	11.31	11.10	7.70	7.56	HG2	30.25	31.11	13.46	12.31	7.17	7.10			
	O	30.00	30.05	11.77	10.13	8.21	7.79	HB	27.02	27.10	16.85	16.83	9.97	9.94			
	H	29.43	29.71	12.20	10.10	7.52	8.73	HB	25.64	25.64	15.75	15.83	9.80	9.85			
Asp213	HB	27.02	27.03	16.85	16.85	9.97	9.97	Asp213	CG	27.50	27.40	14.99	14.92	9.00	8.99		
	HB	25.64	25.64	15.75	15.76	9.80	9.80		OG1	27.79	27.06	14.26	13.86	9.94	9.51		
	CG	27.50	27.50	14.99	14.99	9.00	9.00		OG2	27.94	28.39	14.75	14.96	7.86	8.23		
	OG1	27.79	27.93	14.26	14.91	9.94	7.84		H	29.04	28.03	12.72	12.17	9.65	9.05		
	OG2	27.94	27.87	14.75	14.19	7.86	9.86	H <sub>2</sub> O	O	29.43	27.71	12.55	11.30	8.74	9.42		
	HG2	28.55	28.50	13.96	13.52	7.89	9.45		H	29.04	28.37	13.26	10.62	8.16	9.09		

Проведенный конформационный анализ невалентного комплекса пенициллопепсина с Ac – L – Phe – NHMe показал, что для протекания реакции необходимо, чтобы субстрат в активном центре был определенным образом ориентирован относительно каталитически активных остатков Asp33, Asp213 и молекулы воды, связанной с ними. Это требование приводит к определенному конформационному условию, которому должна удовлетворять аминокислота в P<sub>1</sub> положении субстрата.

**Невалентный комплекс пенициллопепсина с метиламидом N – ацетил – L – фенилаланил – L – фенилаланином.**

Поиск наиболее предпочтительного расположения дипептида Phe – Phe в активном центре пенициллопепсина произведен путем последовательного наращивания пептидной цепи метиламида N – ацетил – L – фенилаланина с C – конца и количественного рассмотрения с помощью конформационных карт и минимизации энергии. Все три конформации (B<sub>3</sub>', B<sub>3</sub>, и R<sub>3</sub>) Ac – L – Phe – NHMe в комплексе с пенициллопепсином служили исходными при поиске низкоэнергетических невалентных комплексов пенициллопепсина с Ac – L – Phe – L – Phe – NHMe. С помощью конформационных карт  $\psi_1 - \phi_2$  для каждой конформации проводился поиск оптимальных взаимных ориентаций боковых и основных цепей Ac – L – Phe – L – Phe – NHMe в активном центре пенициллопепсина. Расчет показал, что продолжение цепи, когда Phe в P<sub>1</sub> положение имеет R конформацию, стерически невозможно.

**Таблица 3**

Геометрические (град) и энергетические (ккал/ моль) параметры оптимальных конформаций метиламида N- ацетил –L- фенилаланил – L - фенилаланина в невалентном комплексе с пенициллопепсином.

Конформация	Двугранные углы											Энергия		
	$\omega_1$	$\phi_1$	$\chi_1^1$	$\chi_1^2$	$\psi_1$	$\omega_2$	$\phi_2$	$\chi_2^1$	$\chi_2^2$	$\psi_2$	$\omega_3$	E <sub>ф+с</sub>	E <sub>с</sub>	E <sub>компл</sub>
B <sub>3</sub> - B <sub>2</sub>	180	-155	-60	85	140	177	-90	178	92	145	180	-20.5	-4.3	-24.8
B <sub>3</sub> - B <sub>3</sub>	180	-151	-59	103	131	176	-87	-62	102	149	180	-22.4	-2.9	-25.3

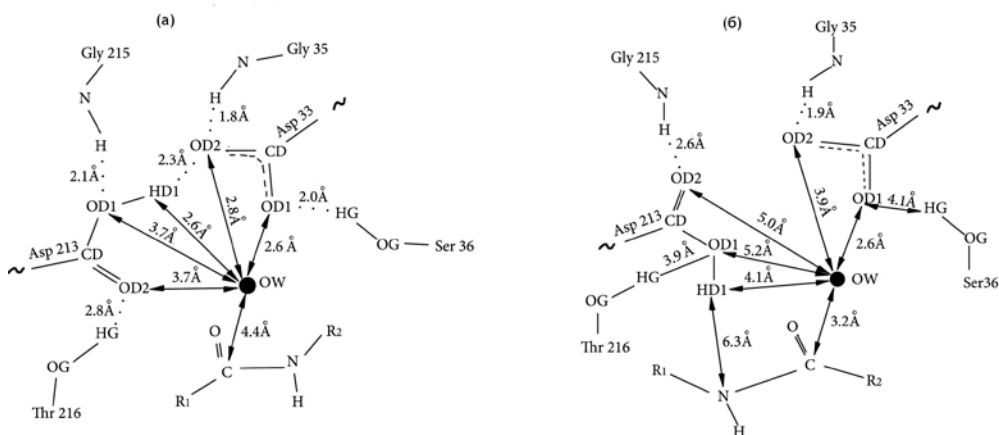
E<sub>ф+с</sub> – энергия взаимодействия фермента с субстратом; E<sub>с</sub> – конформационная энергия субстрата, E<sub>компл</sub> – энергия фермент-субстратного комплекса.

В табл. 3 приведены геометрические и энергетические параметры оптимальных конформаций Phe – Phe в невалентном комплексе с пенициллопепсином. Обе, стерически разрешенные конформации B<sub>3</sub> - B<sub>2</sub> и B<sub>3</sub> - B<sub>3</sub> низкоэнергетичны и удовлетворяют продуктивности, т.к.  $\phi > -140^\circ$ . Для фенилаланина в P<sub>1</sub> положении возможны два разных расположения боковой цепи. В обеих конформациях боковые цепи фенилаланинов ориенти-

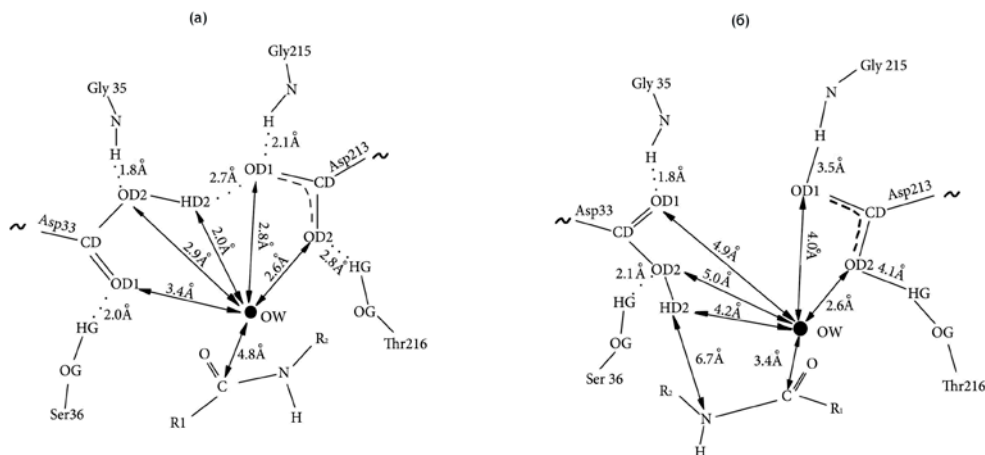
рованы таким образом, что гидролизуемая связь доступна для молекулы воды.

На рис. 3 и 4 приведены значения важнейших расстояний между атомами субстрата, фермента и атомом кислорода OW молекулы воды, которая служит нуклеофилом. Как видно из рис.3 (случай, когда H<sub>2</sub>O связана с ионизованной боковой цепью Asp33) в результате сорбции субстрата кислород OW молекулы воды в нативном положении Asp33 и Asp213 оказывается на расстоянии 4.4Å (рис.3а), а HD1 атом Asp213 от N уходящей группы на расстоянии 7.1Å. Затем, в результате поворота боковой цепи Asp33 вокруг  $\chi^1$  на 10° и  $\chi^2$  на 24°, атом OW оказывается сближенным с C' атомом субстрата до суммы ван – дер – ваальсовых радиусов 3.2Å (рис.3б), а поворот боковой цепи Asp213 вокруг  $\chi^2$  на 180° сближает HD1 атом с N уходящей группы до расстояния 6.3Å. Рис.4 (а и б) соответствует случаю, когда H<sub>2</sub>O связана с ионизованной боковой цепью Asp213. Как видно из рис.4 (а и б), расстояние OW и C' и HD2 Asp33 с N чуть выше, чем в случае рис.3 (а и б).

Проведенный конформационный анализ невалентных комплексов пенициллопепсина с метиламидом N – ацетил – L – фенилаланином и с метиламидом N – ацетил – L – фенилаланил – L – фенилаланином показал, что протонированные боковые цепи Asp33 или Asp213 не могут служить донорами протонов на N атом уходящей группы.



**Рис.3.** Расположение расщепляемой группы субстрата, кислорода OW молекулы воды и боковых цепей Asp33 и Asp213 в невалентном комплексе пенициллопепсина Ac – L – Phe – L – Phe – NHMe: а) нативное положение реакционных остатков Asp33, Asp213 и OW; б) продуктивное положение Asp33, Asp213 и OW.



**Рис.4.** Расположение расщепляемой группы субстрата, кислорода OW молекулы воды и боковых цепей Asp33 и Asp213 в невалентном комплексе пенициллопепсина Ac – L – Phe – L – Phe – NHMe: а) нативное положение реакционных остатков Asp33, Asp213 и OW; б) продуктивное положение Asp33, Asp213 и OW.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. James M.N.G., Sielecki A.R. J.Mol. Biol., 1983, v.163, p.299-361.
2. James M.N.G., Sielecki A.R. Biochemistry, 1985, v.24, p.3701-3713
3. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991, 504 с.
4. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992, с.358
5. Алиев Р.Э. Вестник Бакинского Государственного Университета, серия физ.-мат. наук, 1998, № 1, с. 66 – 70
6. Алиев Р.Э. Journal of Qafqaz University, 2004, №14, p.115-119
7. IUPAC – IUB. Commission on Biochemical Nomenclature – Biochem. Biophys. Acta, 1971, v.229, p.1-17
8. Алиев Р.Э. Вестник Бакинского Государственного Университета, серия физ.-мат. наук, 2011, № 4, с. 132 – 137

### PENİSİLLOPEPSİNİN METİLAMİD N – ASETİL –L – FENİLALANİL – FENİLALANİNLƏ QEYRİ-VALENT KOMPLEKSİNİN NƏZƏRİ KONFORMASIYA ANALİZİ

R.E.ƏLİYEV, F. Ə.QƏDİMOVA

#### XÜLASƏ

Molekulyar mexanika üsulu ilə nativ penisillopepsinin və onun inhibitorlarla yaratdığı komplekslərinin kristalloqrafik quruluşları əsasında penisillopepsinin metilamid N – asetil – L – fenilalaninlə və metilamid - N – asetil – L – fenilalanil – L - fenilalaninlə qarşılıqlı təsirlərinin konformasiya aspektləri tədqiq olunmuşdur. Yan zəncirin iki mümkün halları - Asp33 və Asp213 və bunlarla bağlı su molekulları nəzərdən keçirilmişdir. Penisillopepsinin reaksiya qabiliyyəti Asp33 və Asp213 qalıqlarına nəzərən hidrolizlənmiş peptid rabitanin və nukleofil su molekulunun mümkün oriyentasiyaları müəyyən edilmişdir. Bundan başqa , bu qalıqların kataliz prosesində rolu da aydınlaşdırılmışdır.

**Açar sözlər :** qeyri-valent kompleks, penisillopepsin, konformasiya analizi

**THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF NON - VALENT COMPLEX  
OF PENICILLOPEPSINE WITH  
N – ACETIL – L - PHENYLALANIL – L – PHENYLALANINE METYLAMIDE**

**R.E.ALIYEV, F.A.GADIMOVA**

**SUMMARY**

On the basis of the crystallographic structures of native penicillopepsine and its inhibitor complexes, conformational aspects of interaction of penicillopepsine with N – acetyl – L – phenylalanil and N – acetyl – L – phenylalanil – L – phenylalanine metylamide were investigated by the method of molecular mechanics. Two possible states of side chains of Asp 33, Asp 213 and water molecules connected with them have been considered. The possible orientation of the hydrolysable peptide connection and the nucleophilic molecule of water with respect to the reaction residues of Asp 33 and Asp 213 of penicillopepsine have been determined. The role of these residues in a catalysis process has been detected.

**Key words:** noncovalent complex, penicillopepsine, conformational analysis

*Поступила в редакцию: 18.10.2013 г.*

*Подписано к печати: 27.12.2013 г.*