

УДК 577. 15. 04

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ
НЕВАЛЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЕНИЦИЛЛОПЕПСИНА
С МОДЕЛЬНЫМИ СУБСТРАТАМИ****Р.Э.АЛИЕВ***Бакинский Государственный Университет
rashid_aliev@mail.ru*

На основе трехмерных структур нативного пенициллопепсина и его ингибиторных комплексов высокого разрешения при помощи полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов изучены конформационные аспекты взаимодействия пенициллопепсина с метиламидом N-ацетил – L – лейцином и метиламидом N-ацетил – L – лейцил – L – лейцином. Рассмотрены три возможных состояния боковых цепей Asp33 и Asp213 и связанной с ними молекулы воды. Показано, что продуктивные невалентные комплексы пенициллопепсина с субстратами низкоэнергетичны.

Ключевые слова: пенициллопепсин, невалентные комплексы, модельные субстраты

Подход к изучению механизма каталитической реакции [1], допускающий возможность независимого рассмотрения конформационных и электронных аспектов ферментативной реакции, требует знания трехмерных структур фермента и фермент – ингибиторных комплексов.

В настоящем сообщении, в рамках вышеуказанного метода расчета фермент – субстратных взаимодействий, используя кристаллографические структуры нативного пенициллопепсина и его ингибиторных комплексов [2,3] при помощи полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов продолжено изучение пространственных структур невалентных комплексов пенициллопепсина с усложняющимися по структуре модельными субстратами : 1) метиламидом N – ацетил – L – лейцином и 2) метиламидом N-ацетил – L – лейцил – L – лейцином. Эти молекулы являются простейшими моделями субстратов, позволяющими рассмотреть вопросы первичной и вторичной специфичности пенициллопепсина, а также в последующем рассмотреть комплекс пенициллопепсина с ингибиторами, содержащим статин, аминокислоту, отличающуюся от лейцина химиче-

ским строением основной цепи. Ранее, этот метод нами апробирован при расчете невалентных взаимодействий пенициллопепсина с рядом субстратов[4-7].

Исследование конформационных возможностей субстрата в потенциальном поле пенициллопепсина требует выбора активного центра пенициллопепсина. Выбранная нами модель активного центра пенициллопепсина содержит координаты атомов 224 остатков пенициллопепсина, которые сближены в третичной структуре фермента и включают реакционные остатки Asp 33 и Asp 213 и субстрат – связывающую полость. Свобода вращения была дана только боковым цепям остатков Asp 33 и Asp213, которые рассматривались в трех возможных состояниях: 1) боковые цепи Asp 33 и Asp 213 ионизированы и молекула воды симметрично расположена по отношению к этим остаткам; 2) боковая цепь Asp 33 ионизована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь Asp 213 протонирована; 3) боковая цепь Asp 213 ионизована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь Asp 33 протонирована. Мы исходили из того, что пенициллопепсин функционирует по невалентному типу катализа [8] 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 Asp 213, является нуклеофильной частицей, атакующей карбонильную группу субстрата.

Конформационная энергия фермент – субстратных комплексов представлялась как сумма невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий. Учитывалось образование внутри-субстратных и фермент – субстратных водородных связей. Используемые в расчетах, потенциальные функции и полуэмпирические параметры подробно описаны в [4,5]. Расчет энергии фермент – субстратных комплексов проводился с помощью программы невалентных взаимодействий [9]. Отсчет двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ произведен согласно стандартной номенклатуре [10]. Расчетная модель невалентного комплекса представлена на рис. 1.

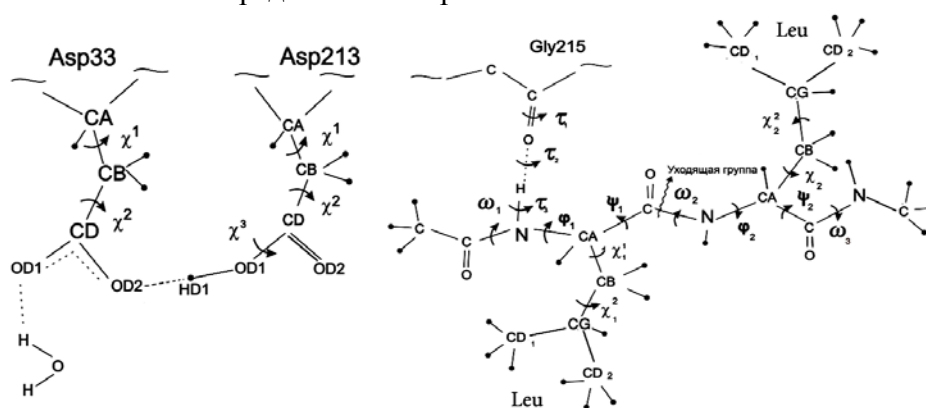


Рис.1. Расчетная модель $\text{CH}_3\text{CO} - \text{L} - \text{Leu} - \text{L} - \text{Leu} - \text{NHCH}_3$ и остатков активного центра Asp33 и Asp 213, связанных с молекулой воды.

Невалентный комплекс пенициллопепсина с метиламидом N – ацетил – L – лейцином.

При изучении первичной специфичности пенициллопепсина весьма актуален вопрос взаимодействия лейцина с активным центром фермента, боковая цепь которого идентична с боковой цепью статина, входящего в состав ингибитора.

Поиск стерически разрешенных структур Ac – L – Leu – NHMe в активном центре пенициллопепсина проводился аналогично комплексу с Ac – L – Phe – NHMe [7], т.е. для девяти возможных положений боковой цепи лейцина по χ^1 и χ^2 и трем значениям $\psi = 140^\circ, 70^\circ$ и -60° строились энергетические карты $\tau_3 - \phi$. Из 27 рассчитанных конформационных карт были отобраны низкоэнергетические значения τ_3 и ϕ . Они послужили исходными для минимизации энергии фермент – субстратного комплекса. Результаты минимизации энергии приведены в табл.1. Все эти конформации являются продуктивными, т.к. имеют значения $\phi = -140^\circ \div -170^\circ$.

Таблица 1
Геометрические (град.) и энергетические (ккал/моль) параметры оптимальных конформаций метиламида N – ацетил – L – лейцина в невалентном комплексе с пенициллопепсином.

Конформация	Двугранные углы (град.)								Энергия (ккал/моль)		
	ϕ	ψ	ω_1	ω_2	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4	$E_{\phi+\psi}$	E_c	$E_{\text{компл}}$
R ₂₁	-164	-71	180	-163	177	55	-179	171	-21.7	-3.7	-25.5
B ₂₂	-159	108	180	180	-162	173	-169	180	-22.6	-2.9	-25.4
B ₂₁	-164	120	180	180	177	55	-179	171	-20.5	-4.2	-24.6
B ₁₂	-159	149	-179	180	81	168	-169	180	-21.4	-3.2	-24.6
B ₃₃	-152	142	-177	180	-85	-74	169	-170	-22.1	-2.2	-24.3
R ₂₃	-157	-67	-178	-169	-161	-58	168	-169	-22.1	-1.3	-23.4
B ₃₁	-137	140	-179	180	-77	75	177	165	-20.6	-1.7	-22.2
B ₁₃	-163	165	179	180	71	-50	165	-164	-20.3	-1.7	-22.0
B ₂₂	-143	132	179	180	-69	171	-174	-177	-18.9	-3.0	-22.0
B ₂₃	-158	108	-178	-179	-161	-58	168	-169	-20.4	-1.4	-21.8
B ₁₁	-159	157	180	180	37	69	178	167	-16.4	-2.9	-19.3
R ₃₃	-151	-56	-177	176	-85	-74	169	-170	-15.2	-1.8	-17.0

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

Как видно из табл.1 при сорбции Ac – L – Leu – NHMe в активном центре пенициллопепсина для боковой цепи лейцина реализуются практически все возможные 9 положений. Отметим, для боковой цепи фенилаланина в положении P₁ реализуется лишь одно состояние $\chi^1 \sim -60^\circ$ [7], т.е. для боковой цепи лейцина имеется энтропийная предпочтительность. Расчет невалентного комплекса показал, что для протекания реакции в широкой полости активного центра пенициллопепсина необходима комплементарность основной цепи субстрата активному центру фермента.

Это выражается в образовании водородной связи между N – H субстрата и O = C – Gly 215 фермента. Причем углы – C = O ... H – N – могут принимать значения в пределах $140^\circ \div 180^\circ$. Такое сцепление остатка в положении P₁ накладывает ограничения на φ остатка в положении P₁, которое определяет ориентацию гидролизуемой связи относительно реакционных остатков Asp 33, Asp 213 и молекулы воды, связанной с ними.

В табл. 2 приведены координаты атомов основной и боковых цепей продуктивной конформации Ac – L – Leu – NHMe в активном центре пенициллопепсина.

Таблица 2

Координаты атомов в(A) основной и боковой цепей субстрата метиламид N-ацетил-L-лейцина в B₂₁ конформации в активном центре пенициллопепсина.

Атом	χ	Y	Z	Атом	χ	Y	Z
Основная цепь субстрата				H	29.31	9.59	11.36
				H	27.57	9.92	11.12
H	25.3	5.91	4.96	Боковая цепь субстрата Leu			
H	24.86	7.26	6.05				
H	26.11	7.49	4.79	C ^β	29.7	6.71	7.52
C	25.68	6.78	5.5	H ^β	29.94	7.45	6.76
C'	26.76	6.33	6.48	H ^β	29.56	5.81	6.92
O	27.07	5.14	6.57	C ^γ	30.91	6.52	8.44
N	27.3	7.3	7.2	H ^γ	31.23	7.47	8.86
H	27.04	8.26	7.12	C ^{δ1}	32.17	6.17	7.63
C ^α	28.38	7.08	8.21	H ^{δ1}	33.01	6.03	8.31
H ^α	28.21	6.23	8.71	H ^{δ1}	32.00	5.25	7.07
C'	28.48	8.31	9.11	H ^{δ1}	32.4	6.98	6.94
O	28.75	9.41	8.64	C ^{δ2}	30.61	5.49	9.53
N	28.25	8.08	10.4	H ^{δ2}	31.53	5.25	10.06
H	28.02	7.18	10.77	H ^{δ2}	29.87	5.89	10.23
C	28.31	9.16	11.37	H ^{δ2}	30.21	4.58	9.07
H	28.09	8.76	12.36				

Невалентный комплекс пенициллопепсина с метиламид N-ацетил – L – лейцил – L – лейцином.

Низкоэнергетические конформации Ac – L – Leu – NHMe в комплексе с пенициллопепсином служили исходными при расчете стериче-

ски разрешенных невалентных комплексов пенициллопепсина с Ac – L – Leu – L – Leu – NHMe. Критерием отбора структур невалентных комплексов пенициллопепсина служила рассчитываемая конформационная энергия. Проведенный расчет показал, что как и в комплексе пенициллопепсина с Ac – L – Phe – L – Phe – NHMe [7] продолжение полипептидной цепи, когда Leu в P₁ положении имеет R конформацию, стерически невозможно. Из трех возможных низкоэнергетических конформаций лейцина (B, R и L) в поле фермента только B конформация представляет интерес. В этой конформации лейцин образует низкоэнергетический продуктивный комплекс с пенициллопепсином. В табл. 3 приведены двугранные углы низкоэнергетических конформаций молекулы Ac – L – Leu – L – Leu – NHMe в невалентном комплексе с пенициллопепсином. Все конформации, приведенные в табл. 3 являются продуктивными, т.к. выполняется необходимое $\varphi_1 > -140^\circ$.

Таблица 3

Геометрические (град) и энергетические (ккал/моль) параметры низкоэнергетических конформаций метиламида N-ацетил-L-лейцил-L-лейцина в невалентном комплексе с пенициллопепсином.

Кон- фор- мация	Двугранные углы (град.)											Энергия (ккал/моль)		
	ω_1	φ_1	χ_1^1	χ_1^2	ψ_1	ω_2	φ_2	χ_2^1	χ_2^2	ψ_2	ω_3	$E_{\varphi+\psi}$	E_c	$E_{\text{компл}}$
B ₂₁ – B ₃₁	180	-161	176	57	120	-173	-64	-79	59	146	180	-28.4	-5.1	-33.5
B ₂₁ – B ₃₂	180	-163	179	60	126	-174	-64	-55	180	143	180	-27.5	-4.7	-32.2
B ₂₂ – B ₃₁	180	-159	-155	-179	114	-168	-61	-79	58	141	180	-29.6	-1.6	-31.2
B ₂₁ – B ₃₃	180	-164	-176	65	138	-171	-62	-79	-75	140	180	-27.1	-3.3	-30.4
B ₂₂ – B ₃₂	180	-158	-154	176	119	-168	-57	-52	178	139	180	-29	0.3	-28.7
B ₂₃ – B ₃₁	180	-157	-151	-57	115	-169	-63	-80	58	139	180	-29.3	1.3	-28
B ₂₃ – B ₃₂	180	-157	-147	-60	120	-167	-60	-51	177	137	180	-28.8	3.5	-25.3
B ₂₂ – B ₃₃	180	-159	-149	163	129	-169	-53	-77	-74	140	180	-28.2	3.4	-24.8
B ₂₃ – B ₃₃	180	-159	-151	-67	126	-169	-55	-77	-72	138	180	-27.9	7.4	-22.5

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

Проведенный расчет структур невалентных комплексов с Ac – L – Leu – L – Leu – NHMe показал, что, отбирая конформации субстратов с чисто энергетической точки зрения, мы приходим к таким низкоэнергетическим структурам, которые фактически являются слепком активного центра. Причем эти структуры продуктивны, а именно они подготовлены к последующим за невалентным комплексом стадиям каталитического акта.

Продуктивные конформации субстратов являются, с одной стороны, самой выгодной по энергии всех видов взаимодействий с атомами активного центра, а с другой отвечают одной из наиболее низкоэнергетических форм свободной молекулы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попов Е.М. Структурно – функциональная организация белков. М.: Наука, 1992, с.358
2. James M.N.G., Sielecki A.R. J.Mol. Biol., 1983,v.163, p.299-361.
3. James M.N.G., Sielecki A.R. Biochemistry, 1985, v.24, p.3701-3713
4. Алиев Р.Э. Вестник Бакинского Государственного Университета, серия физ.–мат. наук, 1998, № 1, с. 66 – 70
5. Алиев Р.Э. Journal of Qafqaz University, 2004, №14, p.115-119
6. Алиев Р.Э. Вестник Бакинского Государственного Университета, серия физ.–мат. наук, 2011, № 4, с. 132 – 137
7. Алиев Р.Э., Кадымова Ф.А. Вестник Бакинского Государственного Университета, серия физ.–мат. наук, 2013, № 4, с. 172 – 180
8. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.:Наука, 1991, 504 с.
9. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Журн. структ. химии, 1983, т.24, № 4, с. 147 – 148
10. IUPAC – IUB. Commission on Biochemical Nomenclature – Biochem. Biophys. Acta, 1971,v.229, p.1-17

PENİSİLLOPEPSİNİN MODEL SUBSTRATLARLA QEYRİ – VALENT KOMPLEKSLƏRİNİN NƏZƏRİ KONFORMASIYA ANALİZİ

R.E.ƏLİYEV

XÜLASƏ

Yarıempirik atom – atom potensiallar üsulu ilə nativ penisillopepsinin və onun inhibitorla yaratdığı komplekslərinin yüksək ayırdetmə qabiliyyətli üçölçülü quruluşu əsasında penisillopepsinin metilamid N – asetil – L – leytsinlə və metilamid N – asetil – L – leytsil – L – leytsinlə qarşılıqlı təsirlərinin konformasiya aspektləri tədqiq olunmuşdur. Yan zəncirin üç mümkün halları – Asp 33 və Asp 213 və bunlarla bağlı su molekulu nəzərdən keçirilmişdir. Penisillopepsinin substratlarla yaratdığı məhsuldar qeyri-valent komplekslərinin aşağı enerjili olduqları göstərilmişdir.

Açar sözlər: penisillopepsin, qeyri-valent komplekslər, model substratlar

THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF NON- VALENT COMPLEX OF PENICILLOPEPSINE WITH MODEL SUBSTRATES

R.A.ALIYEV

SUMMARY

On the basis of three dimensional structures of native penicillopepsine and its inhibitor complexes of high resolution, conformational aspects of the interaction of penicillopepsine with N – acetyl – L – leucine methylamid and N – acetyl – L – leucine – L - leucine methylamid were investigated by half empiric atom-atom potential method. Three possible states of the side chains– Asp 33 and Asp 213 and the water molecules connected with them have been considered. It is shown that productive non- valent complexes which are created by penicillopepsine and substrates are low energetic.

Key words: penicillopepsine, non- valent complexes, model substrates

Поступила в редакцию: 29.10.2014 г.

Подписано к печати: 26.11.2014 г.