

УДК 577.14

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ
НЕВАЛЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ПЕНИЦИЛЛОПЕПСИНА
С МЕТИЛАМИДОМ N -АЦЕТИЛ – L – СТАТИНОМ****Р.Э.АЛИЕВ***Бакинский Государственный Университет*
rashid_aliev@mail.ru

На основе кристаллографических структур нативного пенициллопепсина и его фермент-ингибиторных комплексов при помощи полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов изучены конформационные аспекты взаимодействия пенициллопепсина с метиламидом N – ацетил – L – статином. При различных электронных состояниях боковых цепей Asp33 и Asp213 и связанной с ними молекулы воды рассмотрены стереохимические причины ингибирования пенициллопепсина статином.

Ключевые слова: пенициллопепсин, статин, невалентный комплекс.

В настоящем сообщении, используя трехмерные структуры нативного пенициллопепсина и его ингибиторных комплексов [1,2], на классической основе, при помощи полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов, в рамках подхода к изучению ферментативной реакции [3], изучены конформационные аспекты взаимодействия пенициллопепсина с метиламидом N - ацетил - L-статином. Выбор метиламида N- ацетил- L-статина в качестве субстрата связан с тем, что статин (Sta) α - аминокислота, отличающаяся от лейцина химическим строением основной цепи и входит в состав природного ингибитора пенициллопепсина пепстатина (Iva- Val – Val – Sta – Ala –Sta) и его синтетического аналога (Iva – Val – Val – StaOEt). Используемый метод априорного расчета конформационных аспектов механизма ферментативных реакций предполагает знание конформационных возможностей активного центра пенициллопепсина и субстрата в свободном состоянии до начала их взаимодействия. Расчет невалентного комплекса позволил бы получить количественные оценки энергетических и геометрических параметров всех возможных состояний субстрата в потенциальном поле активного центра фермента и рассмотреть стереохимические причины ингибирования пенициллопепсина.

Конформационная энергия субстрата и фермент – субстратного комплекса представлялась как сумма невалентных ($E_{нев.}$), электростатических ($E_{эл.}$) и торсионных ($E_{тор.}$) взаимодействий. Учитывалось образование внутри-субстратных и фермент-субстратных водородных связей. Расчет конформационной энергии субстрата и фермент-субстратного комплекса проводился с помощью программы невалентных взаимодействий [4]. Отсчет двугранных углов φ, ψ, ω и χ произведен согласно стандартной номенклатуре [5].

Ранее, нами изучены конформационные возможности реакционных остатков Asp33 и Asp213 и остатков субстрат – связывающей полости свободного пенициллопепсина в потенциальном поле выбранной физической модели активного центра [6,7]. Там же приведены использованные потенциальные функции и полуэмпирические параметры.

Конформационный анализ метиламида N – ацетил – L – статина

Расчетная модель метиламида N- ацетил – L – статина приведена на рис.1. Длины связей и значения валентных углов взяты из данных рентгеноструктурного анализа [8]. Эта простейшая молекула, моделирующая взаимодействие основной и боковой цепей остатка, позволяет выявить конформационную специфику статина. Конформационная энергия метиламида N – ацетил – L – статина являлась функцией 11 двугранных углов вращения. Шесть углов ($\omega_1, \varphi_1, \psi_1, \varphi_2, \psi_2$ и ω_2) основной цепи и пять ($\chi^1, \chi^2, \chi^3, \chi^4$ и χ^5) боковой цепи статина.

Поиск исходных для минимизации положений основной и боковой цепей статина был начат с построения конформационных карт $\varphi_1 - \psi_1$ при девяти возможных минимумах торсионного потенциала χ^1 и χ^2 . Углы φ_1 и ψ_1 при расчете изменялись от -180° до 180° с шагом в 30° , а в областях низкой энергии с шагом в 5° . Причем, при вращении вокруг связей $\varphi_1 - \psi_1$ не учитывались атомы $C^{(1)}$ и далее. Из девяти упомянутых конформационных карт $\varphi_1 - \psi_1$ было найдено 16 низкоэнергетических значений φ_1 и ψ_1 были построены конформационные карты $\varphi_2 - \psi_2$.

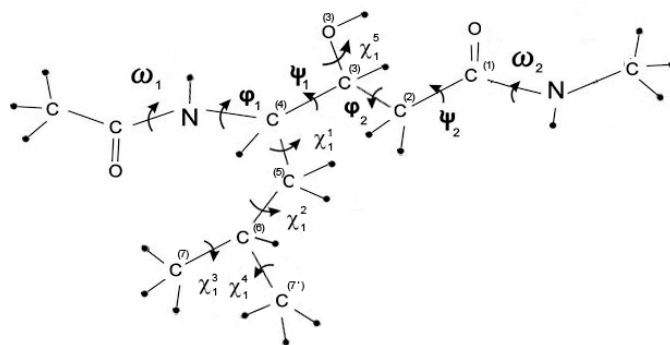


Рис.1. Расчетная модель метиламида N – ацетил – L – статина.

Таблица 1

Расчетные двугранные углы и относительные энергии оптимальных конформаций свободной молекулы метиламида N – ацетил – L – статины

№	Конформация	Двугранные углы								Энергия					
		φ_1	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4	ψ_1	χ^5	φ_2	ψ_2	$E_{нев.}$	$E_{эл.}$	$E_{тор.}$	$E_{общ.}$	$E_{отн.}$
1	V ₂₁ - L	-126	176	61	180	170	58	-176	57	67	-4.8	-2.3	0.3	-6.8	0.0
2	V ₂₁ - P	-120	175	60	180	173	58	-179	60	-118	-4.5	-2.5	0.4	-6.6	0.2
3	V ₃₂ - L	-120	-58	168	-172	180	62	-178	59	66	-4.5	-2.3	0.5	-6.3	0.5
4	V ₂₁ - L	-117	175	62	180	171	57	-79	176	85	-4.1	-2.6	0.6	-6.1	0.7
5	V ₃₂ - P _A	-114	-57	169	-172	180	61	-177	174	-88	-4.0	-2.6	0.6	-6.0	0.8
6	V ₂₁ - P ₁₈₀	-117	175	62	180	171	55	-176	173	-87	-3.9	-2.6	0.6	-6.0	0.8
7	V ₃₂ - L _A	-115	-57	168	-171	180	61	-160	177	89	-4.1	-2.6	0.9	-5.9	0.9
8	V ₂₁ - L	-117	174	62	180	171	56	-169	173	95	-3.8	-2.5	0.6	-5.8	1.0
9	V ₃₂ - L	-114	-57	169	-172	180	61	-170	174	95	-3.9	-2.6	0.7	-5.8	1.0
10	R ₃₂ - L	-94	-58	172	-170	179	-63	-64	177	85	-3.9	-2.5	0.7	-5.7	1.1
11	V ₃₂ - L _B	-113	-55	169	-172	179	-179	-79	-179	86	-3.9	-2.5	0.8	-5.6	1.2
12	R ₃₂ - P ₁₈₀	-92	-55	171	-169	180	-62	-177	174	-88	-3.9	-2.4	0.9	-5.4	1.4
13	V ₃₂ - L	-112	-54	170	-172	179	179	-168	178	95	-3.6	-2.4	0.7	-5.4	1.4
14	V ₃₂ - P ₁₈₀	-113	-55	171	-173	179	179	-175	178	-87	-3.6	-2.3	0.5	-5.4	1.4
15	V ₂₁ - L ₁₈₀	-117	175	62	180	171	55	-174	175	-179	-3.1	-2.6	0.4	-5.4	1.4
16	V ₃₂ - L	-113	-56	168	-171	179	61	-174	176	81	-3.3	-2.7	0.6	-5.4	1.4
17	R ₃₂ - L ₁₈₀	-94	-57	172	-170	180	-63	-170	174	94	-3.7	-2.4	0.9	-5.2	1.6
18	V ₃₂ - L ₁₈₀	-113	-55	171	-172	179	179	-174	179	180	-2.8	-2.5	0.4	-4.9	1.9
19	R ₃₂ - P	-84	-62	166	-171	179	-71	-172	66	-122	-3.7	-2.5	1.5	-4.8	2.0
20	R ₃₂ - L	-93	-55	171	-169	180	-63	-175	176	-179	-3.0	-2.4	0.8	-4.7	2.1
21	V ₃₂ - P	-111	-52	172	-173	179	179	-174	76	-128	-3.1	-2.4	1.1	-4.3	2.5
22	V ₃₂ - L	-108	-47	174	-172	179	-179	-171	81	64	-3.4	-2.3	1.5	-4.2	2.6
23	R ₂₁ - L	-114	-176	63	180	168	-83	-74	173	63	-3.0	-2.6	1.6	-4.0	2.8

ω_1 и ω_2 придавалось значение 180° .

Во всех этих операциях углам ω_1 , ω_2 , χ^3 , χ^4 и χ^5 придавалось значение 180° . Из этих 16 карт были выбраны 57 нулевых приближений в качестве исходных при минимизации конформационной энергии. В таблице 1 приведены оптимальные конформации метиламида N – ацетил – L – статины. В интервал энергии 0 – 3 ккал/моль попадает 23 конформации статины. Низкоэнергетическими являются V и R формы основной цепи статины. Эти конформации могут служить исходными при изучении пространственного строения молекул, содержащих статины.

Невалентный комплекс пенициллопепсина с метиламидом N – ацетил – L – статином

Расчетная модель невалентного комплекса приведена на рис.2. При проведении конформационных расчетов невалентного комплекса мы исходим лишь из того, что аспартазная протеаза пенициллопепсин функционирует по невалентному типу катализа [9], и не были связаны ни с какими априорными предположениями о конкретной схеме механизма катализа.

Предполагалось, что молекула воды, связанная водородными связями с боковыми цепями Asp33 и Asp213, которые в свою очередь являются донорами и акцепторами протонов. В невалентном комплексе свобода вращения была дана боковым цепям остатков Asp33 и Asp213, которые к

тому же рассматривались в двух различных электронных состояниях: 1) боковая цепь Asp33 ионизирована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь Asp213 протонирована; 2) боковая цепь Asp213 ионизирована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь Asp33 протонирована, а так же основной и боковой цепи статина.

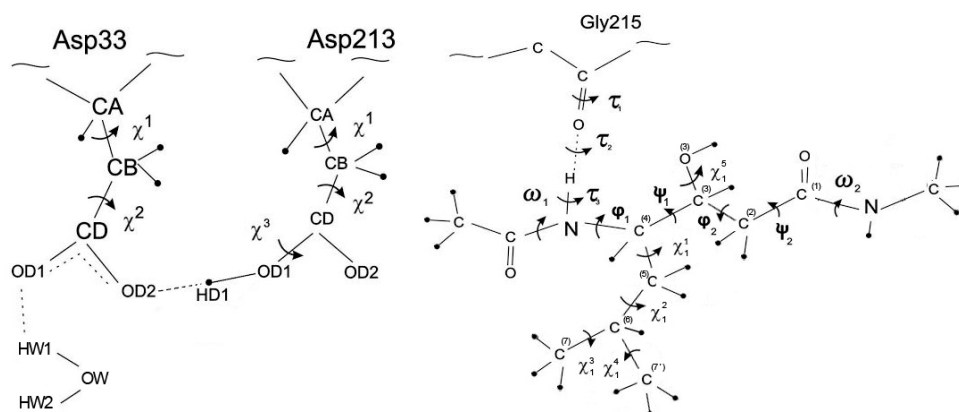


Рис.2. Расчетная модель метиламида N – ацетил – L – Sta и остатков активного центра пенициллопепсина Asp33 и Asp213, связанных с молекулой воды.

Поиск наиболее энергетически предпочтительного расположения Ac – L – Sta – NHMe в активном центре пенициллопепсина производился аналогично невалентному комплексу пенициллопепсина с Ac – L – Leu – NHMe [10].

Статин похож на лейцин. Отличие начинается с C⁽³⁾ атома основной цепи. Принимая для углов τ_3 и ϕ_1 значения соответствующие продуктивному комплексу пенициллопепсина с Ac – L – Leu – NHMe и наращивая основную цепь статина с C⁽³⁾ атома до C⁽¹⁾ атома строились конформационные карты ψ_1 - ϕ_2 в поле белка. Определив низкоэнергетические значения ψ_1 и ϕ_2 , нарастив полностью основную цепь субстрата и приняв $\omega_2 = 180^\circ$, была построена конформационная карта $\phi_2 - \psi_2$. Затем, найденные низкоэнергетические значения ψ_1 , ϕ_2 и ψ_2 минимизировались. Результаты расчета представлены в табл.2. Расчет показал, что концевая часть субстрата, начиная с C⁽³⁾ атома обладает в поле белка значительной подвижностью. Особое внимание при поиске оптимальных структур субстрата в невалентном комплексе обращалось на ориентацию атомов основной цепи статина относительно OD1 и OD2 атомов Asp33 и Asp213 и атомов молекулы воды, связанных с реакционными остатками.

Таблица 2

**Геометрические (град) и энергетические (ккал/моль) параметры
низкоэнергетических конформаций метиламида
N – ацетил – L – статина в невалентном комплексе
с пенициллопепсином**

№	Конформация	Двугранные углы									Энергия		
		φ_1	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4	ψ_1	χ^5	φ_2	ψ_2	$E_{\varphi+c}$	E_c	$E_{\text{компл.}}$
1	B ₂₁ - L	-161	176	61	180	170	55	-176	57	66	-21.4	-6.5	-27.9
2	B ₂₁ - P	-161	176	61	180	170	57	-177	179	-59	-20.6	-6.4	-27.0
3	B ₃₂ - P	-156	-58	169	-172	180	62	180	57	-90	-19.6	-7.4	-27.0
4	B ₃₂ - P	-155	-59	170	-172	180	63	180	61	-125	-19.6	-7.4	-27.0
5	B ₂₁ - P	-160	176	61	180	170	57	-176	179	-59	-20.7	-6.2	-26.9
6	B ₂₁ - L	-161	176	61	180	170	57	-176	57	58	-19.7	-7.0	-26.7
7	B ₃₂ - P	-158	-59	171	-174	180	64	-177	56	-87	-19.8	-6.9	-26.7
8	B ₂₁ - P	-161	176	61	180	170	56	-176	64	-123	-19.8	-6.8	-26.6
9	B ₂₁ - L	-160	176	61	180	170	57	-178	57	59	-19.8	-6.7	-26.5
10	B ₂₁ - L	-161	176	61	180	170	56	-176	70	112	-20.0	-6.2	-26.2
11	B ₃₂ - P	-155	-60	173	-175	180	56	-177	177	-91	-21.1	-5.1	-26.2
12	B ₂₁ - L	-161	176	61	180	170	55	-176	58	91	-20.0	-5.9	-25.9
13	B ₂₁ - P	-161	176	61	180	170	57	-176	57	-90	-19.6	-6.3	-25.9
14	B ₂₁ - P	-161	176	61	180	170	56	-176	179	-93	-21.2	-4.3	-25.5
15	B ₃₂ - L	-156	-59	169	-172	180	56	-176	56	66	-19.5	-5.7	-25.2
16	B ₂₁ - L	-161	176	61	180	170	55	-176	57	66	-19.6	-5.5	-25.1
17	B ₂₁ - L	-160	176	61	180	170	57	-177	57	66	-19.6	-5.0	-24.6
18	B ₂₁ - P	-161	176	61	180	170	56	-176	58	-119	-19.4	-5.2	-24.6
19	B ₂₁ - L	-162	176	61	180	170	57	-177	58	92	-20.1	-4.5	-24.6
20	B ₂₁ - L	-161	176	61	180	170	56	-176	57	60	-19.6	-4.6	-24.2

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

Для глобальной конформации субстрата эти расстояния приведены в табл.3. Как видно из табл.3 при посадке Ac – L – Sta – NHMe в активном центре пенициллопепсина в “продуктивной” конформации (принимаем ориентацию основной цепи субстрата относительно Asp33, Asp213 и H₂O, связанной с ними), расстояния между OW и C⁽³⁾ равны 4.5Å (табл.3(a)), а OW с C⁽¹⁾ равно 7.0Å. Это для случая, когда H₂O связано с ионизованной боковой цепью Asp213, расстояния OW с H⁽³⁾ и HW2 с O⁽³⁾ равны соответственно 2.6 и 3.2Å. Таким образом, при посадке статина, отличающимся от Leu только строением основной цепи, молекула воды, связанная либо с Asp33 или Asp213 оказывается сближенной с H⁽³⁾ и O⁽³⁾ атомами даже если ориентация боковых цепей Asp33 и Asp213 соответствует нативному состоянию.

Таблица 3

Расчетные значения расстояний между атомами метиламида N – ацетил –
L – статина и активного центра пенициллопепсина

Контакты		Расстояние в Å	
		а	б
Asp33	OD1...O ⁽³⁾	4.4	4.4
	OD2...O ⁽³⁾	5.2	5.2
	OD1...H ⁽³⁾	4.5	4.5
	OD2...H ⁽³⁾	4.7	4.7
	HD2...O ⁽³⁾	-	4.6
H ₂ O	OW...H ⁽³⁾	3.4	2.6
	HW2...O ⁽³⁾	3.5	3.2
	OW...C ⁽¹⁾	7.0	5.6
	OW...C ⁽³⁾	4.5	4.8
Asp213	OD1...O ⁽³⁾	5.1	5.1
	OD2...O ⁽³⁾	5.4	5.4
	OD1...H ⁽³⁾	4.2	4.2
	OD2...H ⁽³⁾	4.6	4.6
	HD1...O ⁽³⁾	4.5	-

а) - соответствует случаю, когда H₂O связана с ионизованной Asp33

б) - соответствует случаю, когда H₂O связана с ионизованной Asp213

За счет небольших поворотов вокруг χ^1 и χ^2 боковых цепей Asp33 или Asp213 молекула воды завязывается водородной связью с O⁽³⁾ и H⁽³⁾, т.е. молекула воды не может выступать в качестве нуклеофила, атакующего карбонильной атом C⁽¹⁾. Это и есть ингибирование.

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. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992, с.358
4. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Журн. структ. химии, 1983, т.24, №4, с.147-148
5. IUPAC – IUB. Commission on Biochemical Nomenclature – Biochem. Biophys. Acta, 1971, v.229, p.1-17
6. Алиев Р.Э. Вестник Бакинского Университета, серия физ.-мат. наук, 2011, №4, с.132-137.
7. Алиев Р.Э. Journal of Qafqaz University, 2004, №14, p.115-119
8. Nakamura H., Morishima H., Takita T., Umezawa H., Titaka Y. J. Antibiotics, 1973, v.26, №4, p.255-256
9. Антонов В.К. Химия протеолиза, М.: Наука, 1991, 504 с.
10. Алиев Р.Э. Вестник Бакинского Университета, серия физ.-мат. наук, 2014, №3, с.149-155.

PENİSİLLOPEPSİNİN METİLAMİD N-ASETİL-L-STATİNLƏ QEYRİ-VALENT KOMPLEKSİNİN NƏZƏRİ KONFORMASIYA ANALİZİ

R.E.ƏLİYEV

XÜLASƏ

Nativ penisillopepsinin və ferment-İngibitorlarla əmələ gətirdiyi komplekslərinin kristalloqrafik quruluşları əsasında yarımempirik atom-atom potensiallar üsulu ilə penisillopepsinin metilamid N – asetil – L – statinlə qarşılıqlı təsirlərinin konformasiya aspektləri tədqiq olunmuşdur. Asp33 və Asp213 yan zəncirlərinin müxtəlif elektron vəziyyətində və onlarla su molekulunun bağlı halında penisillopepsinin statinlə İngibirləməsinin stereokimyəvi səbəblərinə baxılmışdır.

Açar sözlər: penisillopepsin, statin, qeyri-valent kompleks.

THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF NON-VALENT COMPLEX OF PENICILLOPEPSINE WITH N – ACETIL – L – STATIN METYLAMIDE

R.E.ALIYEV

SUMMARY

On the basis of the crystallographic structures of native penicillopepsine and its enzyme – inhibitor complexes conformational aspects of interaction of penicillopepsine with N – Acetil – L - Statin metylamide were investigated by semi - empirical atom – atom potential method. The stereochemical reasons of inhibition of penicillopepsine by statin at different electronic stations of side chains Asp33 and Asp213 and water molecules connected with them have been considered.

Key words: penicillopepsine, statin, non – valent complexes.

Поступила в редакцию: 06.10.2015 г.

Подписано к печати: 17.11.2015 г.