

УДК 577.15.04

**КОНФОРМАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ПЕНИЦИЛЛОПЕПСИНА С МЕТИЛАМИДОМ
N-АЦЕТИЛ-L-АЛАНИНОМ****Р.Э.АЛИЕВ****Бакинский Государственный Университет***rashid_aliev@mail.ru*

На основе кристаллографических данных ингибиторных комплексов пенициллопепсина методом теоретического конформационного анализа рассмотрены конформационные аспекты невалентного комплекса пенициллопепсина с метиламидом N-ацетил-L-аланином. Анализ возможной ориентации гидролизующей пептидной связи и нуклеофильной молекулы воды относительно реакционных остатков Asp33 и Asp213 пенициллопепсина выявил роль этих остатков в процессе катализа.

Ключевые слова: невалентный комплекс, пенициллопепсин, конформационный анализ.

Начальной стадией ферментативного катализа является сорбция субстрата и образование невалентного фермент-субстратного комплекса. При этом индуцируются конформационные перестройки как в активном центре фермента, так и у субстрата. Кристаллографический анализ нативных ферментов и их трехмерных структур с субстратоподобными ингибиторами дает информацию статического состояния фермента и не дает необходимого представления о конформационных изменениях ферментов и субстратов в ходе каталитического акта. Промоделировать этот процесс и получить продуктивную ориентацию расщепляемой связи и возможные конформационные перестройки в фермент-субстратном комплексе возможно лишь с помощью расчетных методов.

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-аланином.

Выбор этой молекулы при исследовании невалентного комплекса пенициллопепсина связан с тем, что это соединение является простейшей

моделью субстрата, позволяющего выяснить побудительные мотивы конформационных изменений, возникающих у фермента и субстрата в ходе каталитического акта пенициллопепсина. При расчете продуктивных конформаций невалентного комплекса пенициллопепсина с субстратом мы использовали подход к изучению механизма каталитической реакции [3], допускающий разделение и независимое рассмотрение конформационных и электронных стадий каталитического акта. Ранее, нами этот подход был использован при расчете конформационных стадий ферментативной реакции β -трипсина[4].

Пенициллопепсин – фермент микробного происхождения, принадлежит семейству аспартатных протеаз. Анализ известных кристаллографических структур аспартатных протеаз растительного, животного, микробного и ретровирусного происхождения [5] 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.

Трудами многих исследователей установлено, что аспартатные протеазы функционируют по общему основному – общекислотному механизму. Согласно этому механизму для эффективного протекания ферментативной реакции необходимо наличие нуклеофила, общего основания и общей кислоты [6]. Предложенные, на основании анализа трехмерных структур фермент – ингибиторных комплексов, стереохимические модели функционирования аспартатных протеаз различаются друг от друга числом стадий ферментативного катализа. Нет единого мнения относительно конкретной схемы реакции. Однако, общим у этих моделей является то, что в качестве нуклеофила выступает молекула воды, связанная водородными связями с боковыми цепями реакционных аспартатов, которые, в свою очередь, являются акцепторами и донорами протонов[7].

При проведении расчетов конформационных стадий ферментативной реакции пенициллопепсина, мы исходили из того, что осуществляемый аспартатными протеазами гидролиз пептидной связи относится к невалентному типу катализа и не были связаны ни с какими априорными предположениями о конкретной схеме механизма катализа. Выбор физической модели активного центра пенициллопепсина обоснован нами в [8-10]. Там же подробно проведен анализ конформационных состояний боковых цепей субстратсвязывающей полости, а также каталитических остатков Asp33 и Asp213 в предкаталитическом состоянии, приведены, использованные в расчетах потенциальные функции и полуэмпирические параметры. При расчете конформационной энергии невалентных комплексов учитывались невалентные и электростатические взаимодействия всех атомов “активного ” центра фермента и субстрата, водородные свя-

зи и заторможенное вращение вокруг одинарных связей боковой и основных цепей субстратного остатка и боковых цепей реакционных остатков Asp33 и Asp213. Расчет энергии и оптимизация проводились с помощью программы невалентных взаимодействий[11]. Отсчет двугранных углов φ , ψ , ω и χ произведен согласно номенклатуре[12].

Комплекс пенициллопепсина с метиламидом N-ацетил-L-аланином

Сорбция, ориентация и поиск продуктивных конформаций выбранного нами субстрата в активном центре пенициллопепсина произведен следующим образом. При сорбции субстрата мы использовали информацию, известную из данных рентгеноструктурного анализа комплекса пенициллопепсина с ингибитором Iva-Val-Val-Sta-OEt [2], о том, что амидная N-H группа статина образует водородную связь с карбонильной C=O группой Gly215 пениллопепсина. Водородная связь, образуемая N-H группой субстрата и C=O группой Gly215 (рис.1) изначально предполагалась

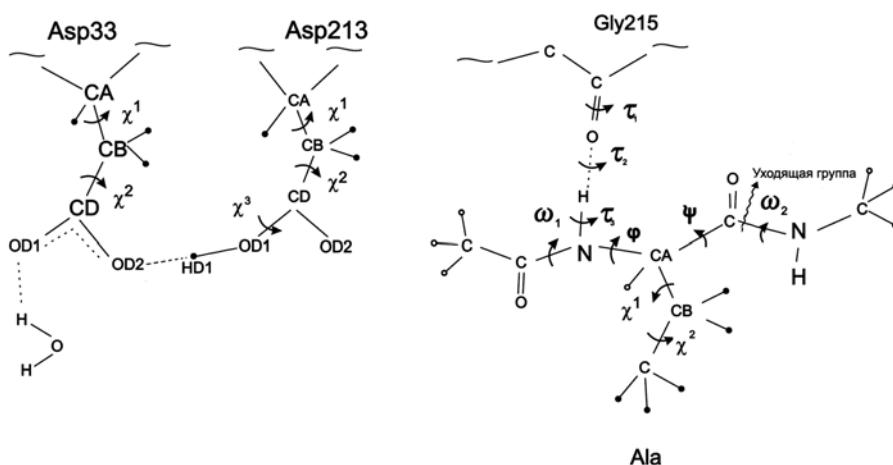


Рис.1. Расчетная модель $\text{CH}_3\text{CO-L-Ala-NHCH}_3$ и остатков активного центра Asp33 и Asp213 связанных с молекулой воды.

линейной, т.е. углы, образуемые связями $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}$ и $\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ принимались равными 180° . Однако, при поиске оптимальных продуктивных конформаций субстрата мы допускали отклонение водородной связи от линейности, т.е. варьировали эти углы при минимизации конформационной энергии фермент-субстратных взаимодействий. Прежде чем вести поиск продуктивного невалентного комплекса пенициллопепсина с метиламидом N-ацетил-L-аланином, мы должны были локализовать молекулу воды, связанную с боковой цепью Asp33 (рис.2а), или Asp213 (рис.2б). В предложенных схемах катализа аспартатными протеазами (см. обзор[7]), боковая цепь одной из реакционных аспартат ионизована и выступает в роли акцептора, а боковая цепь другой аспартаты протонирована и ведет

себя как донор. В [13] предлагают схему катализа, когда обе аспартаты ионизованы.

При конформационном анализе невалентного комплекса пенициллопепсина мы рассматривали два возможных случая: 1) боковая цепь Asp33 ионизована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь Asp213 протонирована (рис.2а); 2) боковая цепь Asp213 ионизована и молекула воды связана с ней, а боковая цепь Asp33 протонирована (рис.2б). Одна из трудностей, возникающих при локализации молекулы воды, связанной с карбоксилат-ионом боковой цепи Asp33 или Asp213 является выбор углов, образуемых связями $CD \cdots OD \cdots HW1$ и $OD \cdots HW1 - OW$ (рис.2 а и б). Водородная связь $CD \cdots OD \cdots HW1 - OW$ изначально предполагалось линейной. Однако, при поиске оптимальных структур невалентных комплексов эти фиктивные углы можно было варьировать.

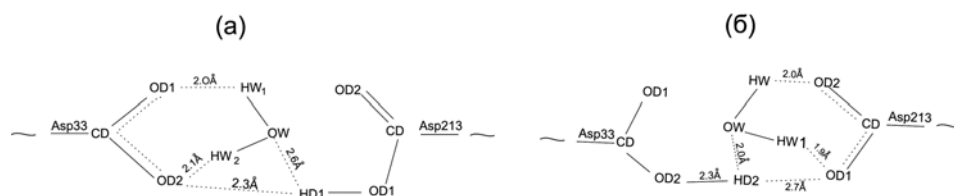


Рис.2. Возможное (а) и (б) расположение молекулы воды (HW1 OW HW2) в активном центре нативного пенициллопепсина.

При поиске продуктивных ориентаций пептидной группы расщепляемой связи и молекулы воды, связанной с боковыми цепями аспартатов для фиктивных двугранных углов вращения τ_1 и τ_2 (рис.1) задавались значения 180° . При таком задании субстрата строилась энергетическая конформационная карта $\tau_3 - \varphi$ при углах $\omega_1=180^\circ$ и $\omega_2=180^\circ$, а для двугранного угла ψ задавались ($\psi=140^\circ$, $\psi=70^\circ$, $\psi=-60^\circ$), соответствующие В и R областям. Причем можно было τ_3 менять от 0° до 360° , φ от -180° до 0° . Одновременно строилась конформационная карта $\tau_3 - \varphi$ расстояний между OW атомом воды и C' атомом субстрата, HD1 атомом боковой цепи Asp213 и N уходящей группы. Все это делалось каждый раз при разных углах $CD - OD1 \cdots HW1$ и $OD1 \cdots HW1 - OW$, которые ориентируют молекулу воды относительно боковой связи Asp33. Эти углы принимали значения от 120° до 180° , т.е. для каждого набора этих углов строились энергетические конформационные карты $\tau_3 - \varphi$ и карты расстояний между OW и C' и HD1 атомом боковой цепи Asp213 с N уходящей группы. В результате такого анализа было установлено, что для углов $CD \cdots OD1 \cdots HW1$ и $OD1 \cdots HW1 - OW$ наиболее приемлемо значение 120° . На рис.3(а,б,в) приведены энергетические конформационные карты (сплошная линия) и на них же нанесены расстояния в ангстремах между OW и C' атомом гидролизуемой связи (пунктирная линия), а также между HD1 атомом боковой цепи Asp213 и N уходящей группы (прерыви-

стая линия) при тех значениях ψ у метиламида N-ацетил – L-аланина: ($\psi=140^\circ$, $\psi=70^\circ$ и $\psi=-60^\circ$), соответствующие В и R низкоэнергетическим областям. Как следует из рисунков 3(а,б и в), при сорбции субстрата в В и R формах низкоэнергетическая область $\tau_3 - \varphi$ отвечает сближенности молекулы воды (расстояние $OW \rightarrow C'$ равно $4,5\text{ \AA}$) и HD1 боковой цепи Asp213 с N уходящей группы (расстояние $HD1 \rightarrow N$ равно 6 \AA). Отметим, что аналогичные рисункам 3 (а, б и в), были построены соответствующие конформационные карты и для случая 2, когда молекула воды связана с ионизованной боковой цепью Asp213, а боковая цепь Asp33 протонирована.

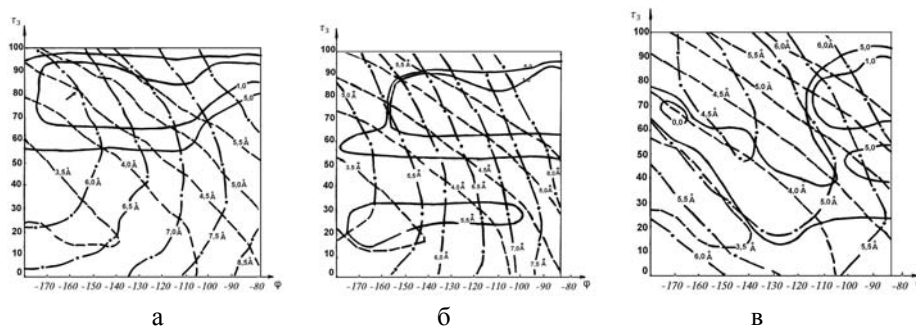


Рис.3. Зависимость энергии(сплошная линия) и расстояний между OW и C'(пунктирная линия), между HD1 и N уходящей группы (прерывистая линия) от углов τ_3 и φ остатка Ala в невалентном комплексе Ac-L-Ala-NHMe с пенициллопепсином при угле $\psi=140^\circ$ (а), $\psi=70^\circ$ (б) и $\psi=-60^\circ$ (в).

Проведенный стереохимический анализ невалентного комплекса пенициллопепсина с Ac-L-Ala-NHMe показал, что никакими возможными поворотами по χ^1 , χ^2 и χ^3 боковой цепи Asp213, а также всевозможной ориентацией пептидной группы субстрата в поле активного центра невозможно сблизить HD1 боковой цепи Asp213 и атом кислорода карбонильной группы субстрата ближе чем $4,5\text{ \AA}$, т.е. боковая цепь не может служить электрофильным активатором, о чем утверждают, предложенные схемы катализа аспартатными протеазами [7]. Ранее к этому результату пришли и в [14]. Нами также показана несостоятельность утверждения во всех схемах катализа аспартатными протеазами [7] о том, что протонированные аспартаты Asp33 или Asp213 (рис.2 а и б) являются донорами протона на N уходящей группы. Эти атомы невозможно сблизить ближе, чем $6,0\text{ \AA}$. Проверена роль O – N группы боковой цепи Tug75 в протонировании атома азота гидролизуемой связи и также установлена несостоятельность предположения Джеймса и сотр. о том, что донором протона на N уходящей группы является боковая цепь Tug75, т.к. эти атомы не возможно сблизить ближе, чем $6,0\text{ \AA}$. Более детально роль Asp33 и Asp213 будет обсуждаться в следующей работе.

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. Попов Е.М., Годжаев Н.М., Алиев Р.Э. Молек.биол., 1986, т.20, с.357-368.
5. Andreeva N.S., Rumsh L.D. Protein Science, 2001, v.10, p.2439-2450/
6. Антонов В.К. Химия протеолиза, М.: Наука, 1991, 504 с.
7. Попов Е.М., Кашпаров Н.В., Попов М.Е. Успехи биол. химии, 1994, т.4., с.40-82.
8. Алиев Р.Э. Вестник Бакинского Государственного Университета, серия физ.-мат. наук, 1998, №1, с.66-70.
9. Алиев Р.Э. Journal of Qafqaz University, 2004, №14, p.115-119.
10. Алиев Р.Э. International Conference. Application of information-communication technologies in science and education, Baku, 2007, p.610-613.
11. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Журн. структ. химии, 1983, т.24, №4, с.147-148.
12. IUPAC – IUB. Commission on Biochemical Nomenclature // Biochem. Biophys. Acta, 1971, v.229, p.1-17.
13. Попов М.Е., Кашпаров Н.В., Румш Л.Д., Попов Е.М. Биоорг. химия, 1999, т.25, №12, с.911-922.
14. Александров С.Л., Антонов В.К. Биоорг. химия, 1990, т.16, №4, с.464-475.

PENİSİLLOPEPSİNİN METİLAMİD N-ASETİL-L-ALANİNLƏ QARŞILIQI TƏSİRLƏRİNİN KONFORMASIYA ASPEKTLƏRİ

R.E.ƏLİYEV

XÜLASƏ

Penisillopepsinin ingibitorlarla yaratdığı komplekslərlə məlum kristalloqrafik verilənlərə əsaslanaraq penisillopepsinin metilamid N-asetil-L-alaninlə qeyri-valent kompleksinin nəzəri konformasiya analizi üsulu ilə konformasiya aspektlərinə baxılmışdır. Hidroliz olunan peptid rabitəsinin və nukleofil su molekulunun penisillopepsinin Asp 33 və Asp 213 aktiv amin turşu qalıqlarına nisbətən mümkün oriyentasiyalarının analizi bu amin turşu qalıqlarının kataliz prosesində rolunu müəyyənləşdirmişdir.

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

CONFORMATIONAL ASPECTS OF INTERACTION BETWEEN PENICILLOPEPSINE AND N-ACETIL-L-ALANINE METYLAMIDE

R.E.ALIYEV

SUMMARY

On the basis of crystallographic data of inhibitor complexes of penicillopepsine, using the method of the theoretical conformation analysis, the conformational aspects of non-valency complex of penicillopepsine have been considered. The analysis of the possible orientation of the hydrolyzed peptide bone and a nucleophilic molecule of water concerning Asp33 and Asp213 reactionary residues of penicillopepsine has detected the role of these residues in a catalysis process.

Key words: noncovalent complex, penicillopepsin, the conformational analysis.

Поступила в редакцию: 25.03.2011 г.

Подписано к печати: 19.12.2011 г.