



УДК 577.15.04

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСПАРТАТНЫХ ПРОТЕИНАЗ. III*. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИНГИБИТОРА JG-365 ПРОТЕИНАЗЫ HIV-1

© 1999 г. М. Е. Попов[#], И. В. Кашпаров, Л. Д. Румш, **Е. М. Попов**Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 01.04.98 г. Принята к печати 08.02.99 г.

Показано, что пространственное строение молекулы субстратоподобного ингибитора JG-365 аспартаатной протеиназы вируса иммунодефицита человека (HIV-1) в свободном состоянии характеризуется набором конформаций, из которых наиболее низкоэнергетические имеют свернутые формы основной цепи. В связи с присутствием в структуре ингибитора нерасщепляемой этиламинной группировки возникает дополнительный хиральный центр. Расчет показал, что конформационные возможности только *S*-изомера ингибитора практически совпадают с конформационными возможностями природного субстрата протеиназы HIV-1. Одна из рассчитанных конформаций с полностью развернутой формой основной цепи ингибитора, характеризующаяся относительной энергией 9.5 ккал/моль, с большой точностью воспроизводит экспериментально наблюдаемую структуру в фермент-ингибиторном комплексе. Нереальность этой структуры для свободного ингибитора обусловлена относительно малым числом межостаточных невалентных взаимодействий в развернутой конформации, что, по-видимому, компенсируется межмолекулярными взаимодействиями в активном центре фермента.

Ключевые слова: конформационный анализ; ингибитор; аспартаатные протеиназы.

В первой публикации этой серии был рассмотрен новый подход к изучению механизма ферментативного катализа [1], включающий общую теорию биокатализа [2, 3] и соответствующие расчетные методы конформационного анализа и квантовой химии. На основе этого подхода начато исследование конформационных и химических аспектов каталитических актов аспартаатных протеиназ HIV-1 и ризопуспепсина. Цель состоит в априорном, т.е. следующим в направлении от структуры к функции, количественном описании действия каждой протеиназы как взаимообусловленного на всех своих стадиях процесса, самопроизвольное протекание которого вызвано альтернированием конформационных и химических неравновесных состояний фермент-субстратного комплекса. Достижение этой цели сделает возможным решение для протеиназ HIV-1 и ризопуспепсина обратной структурной задачи – целенаправленного конструирования для каждого из ферментов высокоспецифичных ингибиторов [4].

Фермент-субстратные взаимодействия всегда начинаются с установления невалентных контактов между атомами двух молекул. Поэтому изучению механизма каталитического акта (в направлении от структуры к функции) должен предшество-

вать тщательный конформационный анализ аминокислотных остатков активного центра нативного фермента и свободных молекул субстрата и субстратоподобного ингибитора. В сообщении [5] были изложены результаты расчета конформационных возможностей субстрата протеиназы HIV-1 Ac-Ser1-Gln2-Asn3-Tyr4-Pro5-Ile6-Val7-OMe, являющегося гептапептидным фрагментом вирусной полибелковой цепи Pr55gag; H₂N-p17-p24-p9-p6-COOH [6]. Четыре аминокислотных остатка субстрата, предшествующие расщепляемой связи Tyr4-Pro5 принадлежат C-концевому участку белка p17, а три последующих – N-концевому участку белка p24. В настоящей статье рассмотрены результаты аналогичного исследования субстратоподобного ингибитора JG-365 Ac-Ser1-Leu2-Asn3-Phe4-ψ(CHOH-CH₂)-Pro5-Ile6-Val7-OMe, пространственное строение которого в невалентном комплексе с гомодимерной протеиназой HIV-1 получено с разрешением 2.4 Å [7]. То обстоятельство, что трехмерная структура невалентного фермент-ингибиторного комплекса известна, представляет возможность для широкого сопоставления результатов ее априорного расчета с данными прямого эксперимента. Поскольку ингибитор JG-365 близкий структурный аналог природного субстрата, то совпадение независимо полученных теоретической и опытной струк-

[#] Автор для переписки (e-mail: popov@enzyme.siohc.ras.ru).

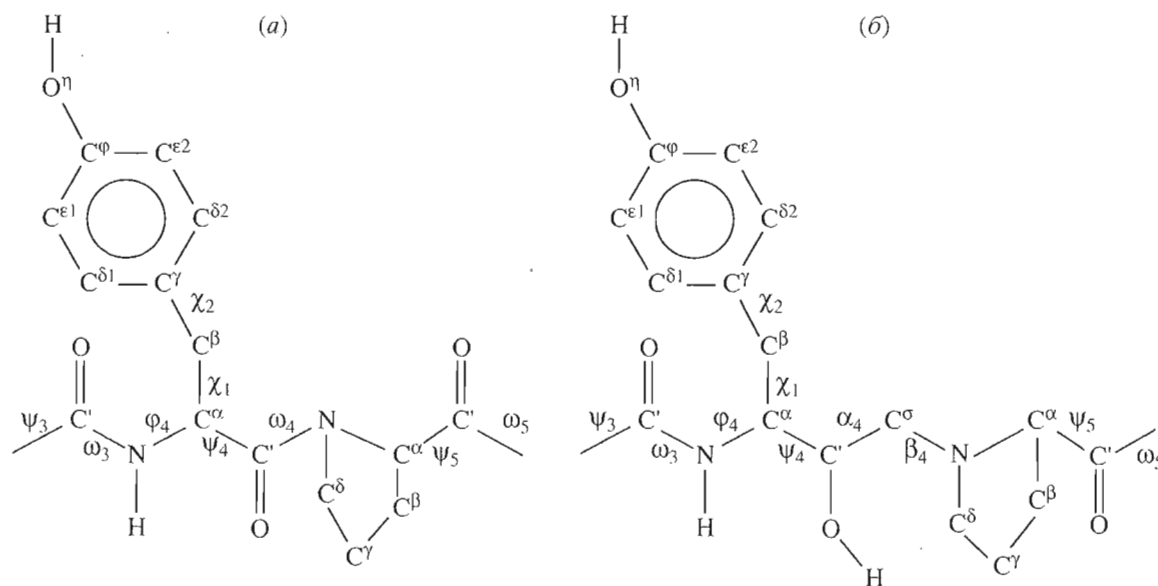


Рис. 1. Фрагменты Тур4-Pro5 в аминокислотной последовательности субстрата (а) и Phe4-ψ(СНОН-СН₂)-Pro5 в последовательности ингибитора JG-365 (б).

тур послужит доводом в пользу корректности последующего априорного расчета фермент-субстратного комплекса Михаэлиса.

Химическое строение ингибитора JG-365 отличается от изученного нами ранее субстрата двумя остатками, стоящими во втором и четвертом положениях последовательности. Главное же отличие, делающее невозможным ферментативный гидролиз гептапептида, касается участка между четвертым и пятым остатками, где на месте расщепляемой пептидной связи субстрата находится гидроксиэтиламинная группа (рис. 1). Замена ведет к существенному изменению электронных и конформационных свойств не только участка 4-5, но, как показано ниже, всей молекулы ингибитора. Из-за отсутствия амидного карбонила пропадает резонансная стабилизация связи C'-N, обуславливающая высокий потенциальный барьер вращения (около 20 ккал/моль) и плоское строение пептидной группировки атомов. В гидроксиэтиламинной группе барьер снижается до ~2.0 ккал/моль [8]. Кроме того, рядом с атомом C^α-остатка Phe4(ψ) возникает второй асимметрический центр – атом C', что ведет к появлению диастереоизомерии, и, следовательно, к возможной реализации молекулы JG-365 в виде двух стереомерных форм, R и S (рис. 2). Атом азота остатка Pro5, лишенный взаимодействия с карбонилем, изменяет свою конфигурацию с плоской на тетрагональную. В результате возникает возможность появления пролинового цикла в двух "зонтичных" структурах, способных переходить друг в друга (рис. 3). Инверсия цикла существенно изменяет расположение связей C^α₍₅₎-C' и N-C^σ

друг относительно друга и поэтому сопровождается взаимной переориентацией N- и C-концевых фрагментов молекулы.

Таким образом, химическое строение ингибитора JG-365 отвечает двум структурным моделям – диастереомерам R и S, в каждом из которых пролиновый цикл может находиться в двух формах, а и б (рис. 3). Следовательно, возможно четыре набора конформационных состояний ингибитора: Ra, Rb, Sa и Sb. Из данных рентгеноструктурного анализа известно, что аспаратная протеиназа HIV-1 образует устойчивый комплекс только с одним диастереоизомером JG-365, а именно, Sa [7]. Для последующего выяснения причин наблюдаемой избирательности фермент-ингибиторных взаимодействий нами были рассчитаны независимо конформационные возможности четырех изомеров.

В конформационном анализе молекул Ra, Rb, Sa и Sb и в обсуждении результатов использованы те же, что и в анализе субстрата [5], потенциальные функции, параметризация, обозначения пептидных структур и их классифика-

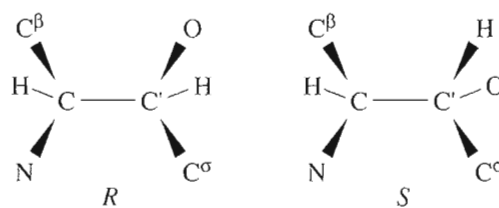


Рис. 2. Диастереоизомерические формы R и S фрагмента Phe4-ψ(СНОН-СН₂) – ингибитора JG-365.

Энергетическое распределение конформаций групп А–D диастереомеров ингибитора JG-365 и субстрата аспартагной протеиназы HIV-1

Группа конформаций	Интервал относительной энергии	Распределение конформаций по энергии				
		Ингибитор				Субстрат
		Ra	Rb	Sa	Sb	
A	0–1.0	6	4	5	2	16
	1.0–2.0	13	8	30	4	44
	2.0–3.0	27	56	45	16	97
	3.0–4.0	61	142	65	11	177
B	0–1.0	–	4	–	1	–
	1.0–2.0	–	9	1	3	4
	2.0–3.0	–	44	3	47	29
	3.0–4.0	4	79	11	133	93
C	0–1.0	–	–	–	–	–
	1.0–2.0	–	1	–	–	–
	2.0–3.0	–	2	–	1	2
	3.0–4.0	5	7	5	2	8
D	0–1.0	4	–	–	6	–
	1.0–2.0	15	1	3	27	–
	2.0–3.0	38	9	5	52	–
	3.0–4.0	70	25	27	74	–

ция на конформации, формы и шейпы. Отклонения от ранее принятых обозначений коснулись лишь нестандартного дипептидного участка Phe4- ψ (CHON-CH₂)-Pro5 (рис. 1). Его конформационные состояния основной цепи описываются теперь не одним переменным двугранным углом ψ_4 ($\omega_4 \sim 180^\circ$, $\phi_5 \sim -60^\circ$), а тремя – ϕ_4 , α и β . Для обозначения структурных типов (шейпов) этого участка оставлены прежние символы *f* и *e*, которые и в этом случае отвечают свернутой и развернутой формам основной цепи, выраженной также посредством виртуальных связей $C_{(3)}^\alpha - C_{(4)}^\alpha - C_{(5)}^\alpha - C_{(6)}^\alpha$. Однако, если у стандартных пептидов расстояние между смежными атомами $C_{(i)}^\alpha - C_{(i+1)}^\alpha$ не зависит от шейпа пептид-

ного скелета (т.е. от суммы углов $\psi_i + \phi_{i+1}$ при $\omega = 180^\circ$), то на участке Phe4- ψ (CHON-CH₂)-Pro5 ингибитора оно определяется значениями углов ψ_4 , α и β и может изменяться от 3.9 до 5.2 Å. Теряется способность шейпа в той или иной мере определять взаимное расположение белковых цепей и участков основных цепей смежных аминокислотных остатков в 4-м и 5-м положениях. Следует отметить, что замена пептидной группы на гидроксиэтиламинную увеличивает конформационные возможности как дипептидного фрагмента, так и молекулы в целом. Она сопровождается увеличением числа переменных двугранных углов и снимает стерический запрет на угол ψ остатка Phe4(ψ), предшествующего Pro5, на реализации формы *R* и делает возможным появление у псевдодипептида Phe4- ψ (CHON-CH₂)-Pro5, наряду с развернутыми, также и свернутых форм основной цепи (R^4-R^5 , R^4-B^5). Расчет подтвердил, что у ингибитора и его фрагментов, действительно появляется целый ряд новых низкоэнергетических конформаций, принадлежащих шейпам пептидного скелета, запрещенным у субстрата и его фрагментов.

Расчет конформационных возможностей четырех изомеров гептапептида JG-365 выполнен по единой схеме, использованной ранее в расчете субстрата (рис. 3 в [5]). Опуская обсуждение результатов всех промежуточных этапов анализа, остановимся на рассмотрении конформаций, найденных для молекул диастереомеров *Ra*, *Rb*, *Sa*

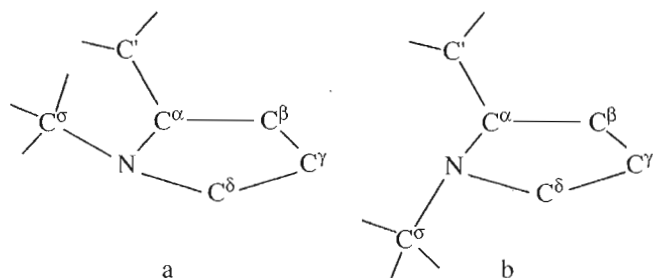


Рис. 3. Конформационные состояния пролинового цикла с пирамидализованным атомом N (а, слева и b, справа) остатка Pro5 ингибитора JG-365.

и Sb. Их нулевые приближения для минимизации энергии были составлены из оптимальных конформаций перекрывающихся по четырем остаткам пентапептида Ac-Ser1-Pro5 и гексапептида Leu2-Val7-OMe, энергия которых не превышала 5.5 ккал/моль. В общем случае конформации гептапептида подразделяются на 64 типа структур. После минимизации исходных вариантов в интервал 0–10 ккал/моль у изомера Ra попали 2550 оптимальных конформации, принадлежащих 47 шейпам, у изомера Rb – 2497 конформаций 47 шейпов, Sa – 2174 и Sb – 1166 конформаций соответственно 44 и 39 шейпов. Эти данные свидетельствуют о значительной конформационной свободе рассматриваемых молекул.

В таблице приведено энергетическое распределение наиболее предпочтительных конформаций четырех изомеров, относительная энергия которых не превышает 4.0 ккал/моль. Конформации, исходя из шейпа пептидного скелета C-концевого тетрапептида, разбиты на группы A, B, C и D. Как и в случае субстрата (табл. 6 в работе [5]), в структурных вариантах группы A основная цепь фрагмента Phe4(ψ)-Val7-OMe имеет шейп *eff*, B – *efe*, C – *eef*, D – *eee*. В последней колонке таблицы приведено энергетическое распределение оптимальных конформаций субстрата по тем же группам. У всех изомеров ингибитора дипептидный участок Phe4(ψ)-Val7-OMe, как и дипептидный участок Tug4-Pro5 субстрата, имеет в группах A, B, C и D развернутую форму основной цепи шейпа *e*. Представители других шейпов C-концевого тетрапептида со свернутой формой дипептида 4-5 (*fff*, *ffe*, *fef* и *fee*) не вошли в таблицу из-за высокой энергии.

Приведенные в таблице результаты расчета дают представление о влиянии на конформационные возможности молекул с аминокислотной последовательностью ингибитора JG-365 диастереоизомерии R и S, а также конформации пятичленного цикла Pro5 (рис. 2, 3). У изомера Ra практически равновероятны конформации групп A и D, в которых C-концевой тетрапептидный фрагмент имеет соответственно шейпы *eff* и *eee*. Вероятность реализации представителей групп B и C здесь крайне мала. У изомера Rb, отличающегося от Ra состоянием пролинового цикла, предпочтительны конформации групп A и B, которым значительно уступают по энергии и энтропии структурные варианты C и D. При изменении диастереоизомерии Ra на Sa повышается энергия представителей группы D и конформационное равновесие почти нацело смещается в группу A. В случае замены Sa на Sb конформационная свобода, напротив, возрастает и практически равновероятными становятся пространственные формы трех групп – A, B и D.

При сопоставлении данных таблицы, касающихся четырех изомеров, с результатами расчета молекулы субстрата обращает внимание бли-

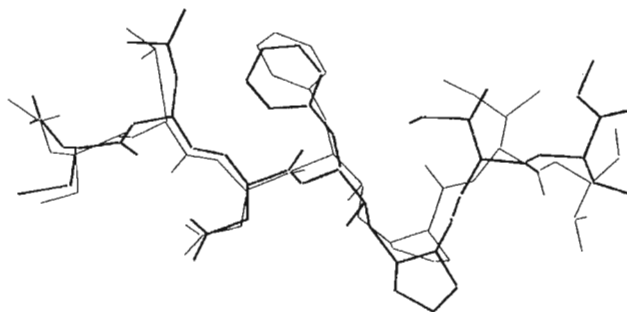


Рис. 4. Совмещение рассчитанной конформации молекулы ингибитора JG-365 (диастереомер Sa) $B_{31}^1 - B_{31}^2 - B_{33}^3 - B_{31}^4 - B^5 - B_{33}^6 - B_1^7$ (шейп *eeeeee*; жирная линия) с кристаллографической структурой ингибитора в комплексе с аспартачной протеиназой HIV-1 (тонкая линия).

зость конформационных возможностей последней и диастереомера Sa, образующего ингибиторный комплекс с протеиназой HIV-1. В обоих случаях явной предпочтительностью обладают конформации группы A. Более того, имеет место сходное энергетическое распределение структурных вариантов в пределах этой группы. И там и там самые низкоэнергетические конформации принадлежат шейпам *ffeff*, лучшие из которых имеют относительную энергию соответственно 0 и 0.4 ккал/моль, *effeff* (0.1 и 0 ккал/моль) и *fefeff* (0.2 и 0.6 ккал/моль). Речь идет о совпадении структурных типов, а не тождественности геометрии конформаций молекул субстрата и ингибитора, отличающихся атомными группами между четвертым и пятым остатками.

Таким образом, для ингибитора JG-365 мы имеем дело с примером, когда конформация олигопептида в невалентном комплексе с ферментом, установленная методом рентгеноструктурного анализа [7], значительно отличается от любой из его предпочтительных конформаций в свободном состоянии. Модельные и экспериментальные исследования [9] показывают, что при связывании в активном центре лиганды могут как сохранять пространственную структуру, характерную для свободного состояния, так и претерпевать значительные конформационные изменения.

В связи с этим весьма интересными оказались результаты сопоставления одной из оптимальных конформаций, имеющей развернутую форму основной цепи ($B_{31}^1 - B_{31}^2 - B_{33}^3 - B_{31}^4 - B^5 - B_{33}^6 - B_1^7$, шейп *eeeeee*) изомера Sa с конформацией ингибитора в комплексе с протеиназой HIV-1 [7]. Рассчитанная структура, как видно из рис. 4, почти полностью совпала с экспериментально наблюдаемой; среднеквадратичное отклонение атомов C^α составило менее 0.7 Å.

Возникает, однако, вопрос, почему не глобальная или какая-либо другая низкоэнергетическая конформация, а именно развернутая форма ингибитора, имеющая относительную конформационную энергию ~ 9.5 ккал/моль и, следовательно, не реализующаяся для молекулы в свободном состоянии, оказывается энергетически самой предпочтительной при взаимодействии с протеиназой. Строгий ответ на этот вопрос будет получен при поэтапном теоретическом "встраивании" ингибитора в активный центр фермента в условиях конформационной свободы соответствующих аминокислотных остатков той и другой молекулы. Сейчас мы выскажем лишь предположение, представляющееся весьма правдоподобным, которое опирается на информацию, ставшую известной в результате проведения данного исследования. Высокая энергия развернутой формы не связана со стерическим напряжением молекулы, а обусловлена исключительно меньшим числом (по сравнению со свернутыми конформациями) невалентных стабилизирующих контактов между удаленными по цепи остатками. У лучшей конформации шейпа *еееее* взаимодействия атомов внутри пентапептидного фрагмента Leu2–Phe6, атомы которого образуют в фермент-ингибиторном комплексе не менее 90% всех межмолекулярных контактов, практически не уступают по своей эффективности аналогичным взаимодействиям в пределах одного и того же фрагмента глобальной конформации *effeff*. Энергетическая разница между ними в 9.5 ккал/моль почти целиком объясняется слабостью стабилизирующих взаимодействий в развернутой конформации N- и C-концевых остатков с промежуточными участками цепи. Недостаток такой конформации при свободном состоянии молекулы превращается в

ее преимущество по сравнению с компактно свернутыми конформациями при взаимодействии ингибитора с ферментом. В силу развернутой формы основной цепи она предоставляет наилучшие условия для образования максимального числа стабилизирующих межмолекулярных контактов. Их реализация в фермент-ингибиторном комплексе, как показывают результаты расчета и, прежде всего, количественное совпадение развернутой оптимальной конформации свободной молекулы с экспериментальной структурой этой же молекулы, ассоциированной в активном центре, происходит в условиях, которые не ведут к стерическим затруднениям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов Е.М., Кашпаров И.В., Попов М.Е. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 323–338.
2. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
3. Попов Е.М., Кашпаров И.В. // Успехи биол. химии. 1994. Т. 34. С. 40–81.
4. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 1107–1138.
5. Попов М.Е., Кашпаров И.В., Попов Е.М. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 510–522.
6. Viral Proteinases as Targets for Chemotherapy / Eds Krausslich H.G., Oroszlfn S., Wimmer E. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. P. 87–100.
7. Swain A.L., Miller M.M., Green J., Rich D.H., Schneider J., Wlodawer A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8809–8819.
8. Gutowski H.S., Holm C.H. // J. Chem. Phys. 1956. V. 25. P. 356–361.
9. Nikiforovich G.V. // Int. J. Pept. Protein Res. 1994. V. 44. P. 513–531.

Mechanism of Action of Aspartic Proteases.

III. Conformational Characteristics of JG-365, an Inhibitor of the HIV-1 Protease

M. E. Popov[#], I. V. Kashparov, L. D. Rumsh, and E. M. Popov[†]

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

A set of conformations was shown to be characteristic of the free-state spatial structure of substrate-like inhibitor JG-365 for aspartic protease from HIV-1. Among them, the lowest-energy conformations have a folded form of the peptide backbone. The inhibitor has a noncleavable hydroxyethylamine group with an additional chiral center in its structure. Our calculations showed that only the *S*-isomer of the inhibitor displays conformational characteristics that practically coincide with those of the native substrate for HIV-1 protease. One of the calculated conformations with a completely extended main chain and a relative energy of 9.5 kcal/mol very closely mimics the experimentally observed structure of the inhibitor in the enzyme–inhibitor complex. The realization of this structure is unlikely for a free inhibitor, because it has only a small number of interresidual noncovalent interactions in the extended conformation; these are presumably compensated for by intermolecular interactions at the active site of the enzyme.

Key words: aspartic proteases, conformational analysis, inhibitor

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: popov@enzyme.siobc.ras.ru.