



УДК 577.152.342*36'135

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСПАРТАТНЫХ ПРОТЕИНАЗ. IV. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛ СУБСТРАТА И ИНГИБИТОРА РИЗОПУСПЕПСИНА

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

Поступила в редакцию 10.07.98 г. Принята к печати 23.02.99 г.

На основании пофрагментного теоретического конформационного анализа пептидов исследованы свойства двух молекул субстратов и субстратоподобного ингибитора аспаргатной протеиназы ризопуспепсина. Показано, что их пространственная организация описывается набором нескольких семейств конформаций, переход между которыми не требует преодоления высоких энергетических барьеров. Предполагается, что стабилизация экспериментально наблюдаемых в ингибиторных комплексах конформаций β -структурного типа достигается за счет большей предрасположенности "развернутых" структур к образованию эффективных межмолекулярных контактов с аминокислотными остатками активного центра фермента.

Ключевые слова: конформационный анализ; аспаргатные протеиназы; ризопуспепсин.

Настоящая статья продолжает серию наших публикаций, посвященных теоретическому рассмотрению конформационных и химических аспектов механизма действия аспаргатных протеиназ и количественному описанию их каталитических актов как спонтанно протекающих, взаимообусловленных на всех стадиях непрерывных процессов. В предшествующих публикациях были рассмотрены основные положения общей теории биологического катализа и методы расчета фермент-субстратных взаимодействий [1–3], изложен принципиальный план исследования и представлены результаты конформационного анализа природного гептапептидного субстрата протеиназы HIV-1 и подобного ему по структуре ингибитора [3–5].

В сообщении обсуждаются результаты конформационного анализа молекул субстрата и ингибитора аспаргатной протеиназы ризопуспепсина (КФ 3.4.23.6). Выбор объектов был продиктован следующими соображениями. Во-первых, считалось важным, чтобы химическое строение молекулы субстрата было по возможности близко к химическому строению ингибитора, трехмерная структура которого в комплексе с ризопуспепсином известна из рентгеноструктурного анализа. Таким ингибитором является гептапептид с восстановленной пептидной связью между четвертым и пятым аминокислотными остатками [6]: Ac-Pro1-Phe2-His3-Phe4- ψ (CH₂-N⁺H₂)-Phe5-Val6-Tyr7.

Таким образом, объектом исследования в качестве субстрата мог стать тот же гептапептид с

пептидной Phe4-Phe5-связью, т.е. Ac-Pro1-Phe2-His3-Phe4-Phe5-Val6-Tyr7.

Во-вторых, необходимо было учесть и тот факт, что ризопуспепсин проявляет заметную специфичность к природе субстратного остатка в положении P₁, в данном случае, к боковой цепи четвертого остатка. Наибольшая каталитическая активность протеиназы наблюдается, когда на этом месте находится остаток Lys [7]. Поэтому для выяснения причины первичной специфичности ризопуспепсина представляло интерес знание конформационных возможностей гептапептида Ac-Pro1-Phe2-His3-Lys4-Phe5-Val6-Tyr7.

Исходя из этих двух требований, мы выбрали для конформационного анализа и последующего изучения механизма каталитического акта и образования фермент-ингибиторного комплекса ризопуспепсина три приведенные выше молекулы. Последние две, ради краткости, назовем [Phe4]субстратом и [Lys4]субстратом.

Исследование проведено на основе развитых в работах [1, 2, 9] конформационной теории пептидов и белков и соответствующего расчетного метода. Исползованные для оценки невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и водородных связей потенциальные функции и полуэмпирические параметры указаны в публикациях [2, 10]. В расчете и при изложении результатов применена предложенная в работах [2, 9, 10] естественная классификация пептидных структур по трем уровням пространственной организации: конформации, форме и шейпу основной цепи.

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

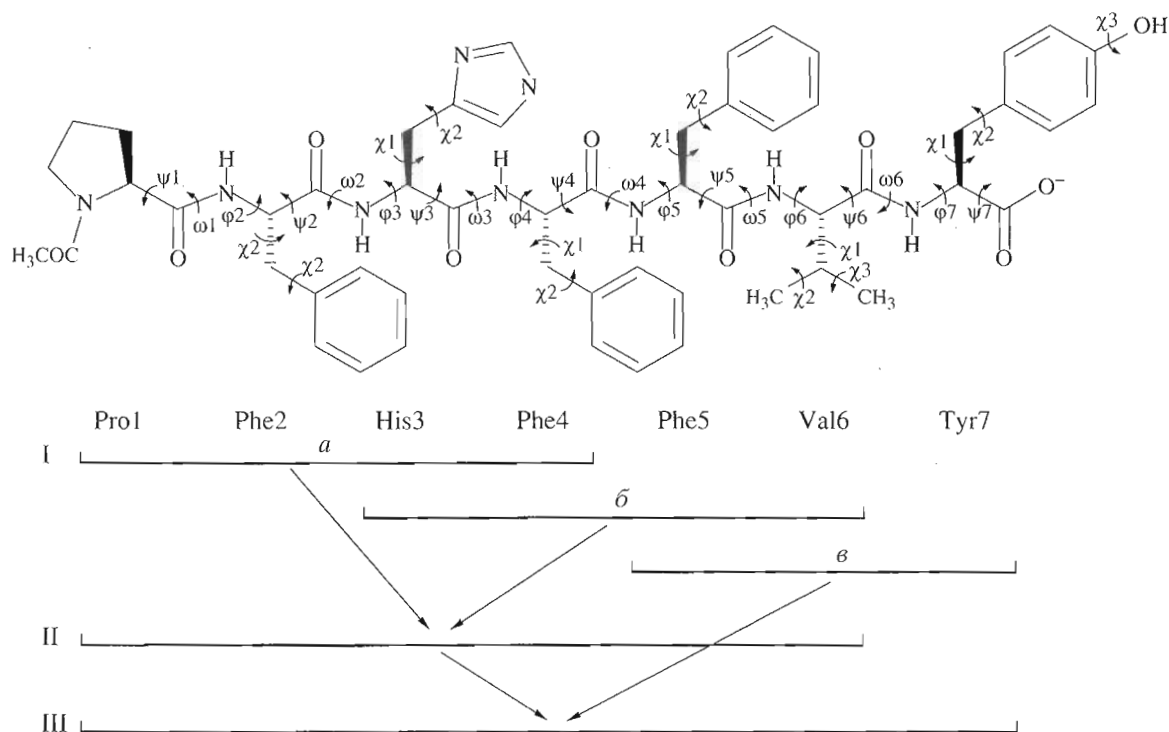


Рис. 1. Расчетная модель и схема конформационного анализа молекулы [Phe4]субстрата.

[Phe4]субстрат. Расчетная модель [Phe4]субстрата, пептидная связь которого между остатками Phe4 и Phe5 расщепляется ризопусепсином, и схема расчета представлены на рис. 1. Конформационный анализ был разбит на три этапа (I–III). Первый включал независимый расчет перекрывающихся по двум аминокислотным остаткам тетрапептидных фрагментов Ac-Pro1–Phe4 (*a*) и His3–Val6 (*b*) и трипептидного фрагмента Phe5–Tyr7 (*c*). Второй этап заключался в расчете конформационных возможностей гексапептида Pro1–Val6, а третий – всей молекулы [Phe4]субстрата.

Нулевые приближения тетрапептидных фрагментов формировались из низкоэнергетических конформационных состояний свободных молекул метиламидов *N*-ацетил-*L*-аминокислот (табл. 8 в [2]). Учитывались *R*, *B*, *L*-формы остатков. Всего для минимизации энергии при варьировании двугранных углов φ , ψ , ω , χ было составлено 383 исходных структурных варианта фрагмента *a*, 444 – *b*, 202 – *c*. В процессе минимизации обнаружилось, что среди рассчитанных конформаций свободных тетрапептидных и трипептидного фрагментов существенной энергетической дифференциации по типам основной цепи не наблюдается. В связи с этим при формировании исходных для минимизации энергии приближений гексапептида Pro1–Val6 при вариации двугранных углов φ , ψ , ω и χ , учитывались конформации *a*, *b* всех типов основной цепи, относительная энергия которых не превышала 8.0 ккал/моль – величины,

равной более трети стабилизационной энергии глобальной конформации этих фрагментов. Всего было составлено 671 вариант 32 шейпов, т.е. всех шейпов в принципе возможных для фрагмента такой длины. Результат минимизации полученных конформаций в виде энергетического распределения по шейпам, представлен в табл. 1. Расчет показал, что при образовании из двух конформационно весьма лабильных пептидов Pro1–Phe4 и His3–Val6 единого гексапептидного фрагмента Pro1–Val6 имеет место заметная дифференциация по энергии. При комбинации лучших конформационных состояний тетрапептидов *a*, *b* лишь немногие состояния, являясь комплементарными друг другу в структурной организации гексапептида, вносят при этом дополнительную стабилизацию. Так из 671 рассчитанной для гексапептида конформации в интервал 0–2.0 ккал/моль попадает лишь 6, в интервал 0–4.0 ккал/моль – 15 и 0–6.0 ккал/моль – 25 структурных вариантов. На участке Phe2–Phe5 19 из них имеют один и тот же тип основной цепи и отличаются друг от друга лишь шейпами концевых дипептидов.

Для формирования начальных приближений всей молекулы субстрата отбирались конформационные состояния гексапептида Pro1–Val6 и трипептида Phe5–Tyr7, относительная энергия которых не превышала 8.0 ккал/моль. Всего было составлено 835 структурных вариантов. После минимизации энергии при вариации двугранных углов φ , ψ , ω и χ , в интервале 0–6.0 ккал/моль ока-

Таблица 1. Энергетическое распределение оптимальных конформаций гексапептидного фрагмента [Phe4]субстрата (рис. 1)

Шейп	Интервал энергии, ккал/моль					Шейп	Интервал энергии, ккал/моль				
	0-2	2-4	4-6	6-8	>8		0-2	2-4	4-6	6-8	>8
<i>ffff</i>	-	-	1	-	4	<i>effe</i>	-	-	-	4	1
<i>efff</i>	-	-	-	-	3	<i>feff</i>	2	1	1	2	35
<i>feff</i>	4	3	1	2	20	<i>eeff</i>	-	-	-	-	30
<i>eeff</i>	-	5	2	2	11	<i>ffef</i>	-	-	-	4	38
<i>ffef</i>	-	-	2	16	10	<i>efef</i>	-	-	-	-	8
<i>feff</i>	-	-	-	-	7	<i>feff</i>	-	-	-	-	17
<i>eeff</i>	-	-	-	-	15	<i>eeff</i>	-	-	-	-	24
<i>ffef</i>	-	-	-	-	8	<i>ffef</i>	-	-	-	-	7
<i>efff</i>	-	-	-	2	5	<i>effe</i>	-	-	-	5	11
<i>fefef</i>	-	-	-	4	7	<i>fefef</i>	-	-	-	2	11
<i>eeff</i>	-	-	-	-	12	<i>eeff</i>	-	-	-	-	19
<i>ffef</i>	-	-	-	1	39	<i>ffef</i>	-	-	-	-	81
<i>eeff</i>	-	-	-	-	28	<i>eeff</i>	-	-	-	-	34
<i>feff</i>	-	-	-	-	23	<i>feff</i>	-	-	-	-	30
<i>eeff</i>	-	-	-	-	27	<i>eeff</i>	-	-	-	-	41
<i>ffff</i>	-	-	-	-	1						

Таблица 2. Относительная энергия (ΔU) и энергетические вклады (ккал/моль) невалентных ($U_{\text{нв}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных ($U_{\text{т}}$) взаимодействий оптимальных конформаций [Phe4]субстрата

Группа	Номер	Шейп	Форма	ΔU	$U_{\text{нв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{т}}$
A'	1	<i>f-efff-e</i>	$R^1-B_{31}^2-R_{21}^3-R_{11}^4-R_{21}^5-B_{111}^6-R_{311}^7$	0	-42.9	2.6	2.5
	2	<i>f-efff-f</i>	$R^1-B_{31}^2-R_{11}^3-R_{11}^4-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{311}^7$	0.6	-44.8	4.9	2.8
	3	<i>e-efff-e</i>	$B^1-B_{31}^2-R_{21}^3-R_{11}^4-R_{21}^5-B_{111}^6-R_{311}^7$	3.5	-39.7	3.0	2.5
	4	<i>e-efff-f</i>	$B^1-B_{31}^2-R_{11}^3-R_{11}^4-R_{21}^5-R_{611}^6-R_{311}^7$	4.6	-41.1	5.1	2.9
B'	1	<i>f-ffff-e</i>	$R^1-R_{21}^2-R_{23}^3-R_{21}^4-R_{21}^5-B_{111}^6-R_{311}^7$	3.0	-40.5	2.9	2.8
	2	<i>f-ffff-f</i>	$R^1-R_{11}^2-R_{23}^3-R_{21}^4-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{313}^7$	3.2	-42.0	3.9	3.6
	3	<i>e-ffff-f</i>	$B^1-R_{21}^2-R_{11}^3-R_{21}^4-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{313}^7$	3.5	-43.8	6.0	3.5
	4	<i>e-ffff-e</i>	$B^1-R_{21}^2-R_{11}^3-R_{21}^4-R_{21}^5-B_{111}^6-R_{313}^7$	4.9	-41.0	5.2	3.0
C'	1	<i>f-efef-f</i>	$R^1-B_{31}^2-R_{11}^3-R_{11}^4-B_{21}^5-R_{211}^6-R_{311}^7$	2.9	-41.7	4.9	1.9
D'	1	<i>f-efef-f</i>	$R^1-B_{31}^2-R_{31}^3-B_{11}^4-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{311}^7$	4.2	-39.6	4.5	1.5
E'	1	<i>e-eeee-e</i>	$B^1-B_{21}^2-B_{21}^3-B_{11}^4-B_{31}^5-B_{211}^6-B_{311}^7$	9.2	-33.8	3.3	2.0

зались 43 конформации, принадлежащие 10 различным шейпам. Их можно разделить на четыре группы (A', B', C' и D'), в каждой из которых конформационные состояния фрагмента Phe2-Val6 имеют одинаковый тип основной цепи. В группу A' с общим шейпом центрального пентапептида *efff* входят 14 конформаций, в т.ч. самые низкоэнергетические. Группа B' (*ffff*) состоит из 20 конформаций, C' (*effe*) из 6 и D' (*efef*) из 3.

Лучшие представители четырех семейств конформаций, их энергетические характеристики, их формы основных и положения боковых цепей приведены в табл. 2. В ней также даны аналогичные параметры для развернутой конформации (E'), принадлежащей шейпу *eeeeee*. Она не входит в число предпочтительных структур в энергетическом распределении конформаций субстрата, но приведена для сравнения. Представители это-

Таблица 3. Матрицы энергий (ккал/моль) внутри- и межостаточных взаимодействий (без учета торсионной энергии) валентно не связанных атомов для лучших конформаций групп A', B', C', D' и E' [Phe4]субстрата (табл. 2). Субматрица, отвечающая центральному фрагменту Phe2–Val6, выделена затемнением

	Форма	Pro1	Phe2	His3	Phe4	Phe5	Val6	Tyr7
Pro1	A'	-2.1	-4.1	0.2	0.0	-2.3	-1.5	-0.5
	B'	-2.1	-2.3	-3.3	-3.3	-1.6	0.0	-0.3
	C'	-2.1	-4.2	0.2	0.0	-2.5	-1.9	-0.9
	D'	-2.1	-3.8	-0.6	0.0	0.0	0.0	-1.2
	E'	-2.2	-1.7	0.4	0.0	0.0	0.0	-0.3
Phe2	A'		0.2	-1.1	-4.3	-3.4	-2.3	0.2
	B'		-0.1	-0.9	-1.3	-2.5	-4.6	-0.1
	C'		0.3	-1.4	-4.4	-4.0	-1.3	0.2
	D'		-0.1	-1.2	-0.6	-3.3	-4.1	-2.7
	E'		0.0	-3.0	-3.0	-0.1	-0.0	0.0
His3	A'			0.6	-1.9	-1.2	-1.4	-7.9
	B'			0.7	-2.0	-1.1	0.2	-7.5
	C'			1.2	-4.3	-1.3	-1.0	-1.9
	D'			0.3	-2.6	-2.3	0.0	-3.0
	E'			0.7	-2.7	-5.3	-0.4	-3.6
Phe4	A'				0.4	-2.0	-1.0	-0.9
	B'				0.1	-0.7	-1.2	-3.3
	C'				0.7	-1.8	-0.8	-2.1
	D'				2.0	-5.0	-0.3	-0.6
	E'				1.8	-5.5	-0.3	0.0
Phe5	A'					0.0	-2.7	-0.5
	B'					0.0	-2.4	-0.6
	C'					-0.1	-1.9	-2.2
	D'					-0.1	-1.1	-0.8
	E'					0.0	-1.4	-3.2
Val6	A'						0.6	-2.4
	B'						0.8	-2.4
	C'						0.5	-3.6
	D'						0.4	-3.7
	E'						0.7	-2.9
Tyr7	A'							1.6
	B'							1.5
	C'							1.6
	D'							1.6
	E'							1.6

го структурного типа наблюдаются у молекул ингибиторов в кристаллографических структурах фермент-ингибиторных комплексов аспаратных протеиназ и, следовательно, представляют большой интерес в последующем изложении.

Таким образом, спектр энергетического распределения оптимальных конформаций свободной молекулы субстрата подразделяется на несколько основных уровней, определяемых состо-

яниями основной цепи Phe2–Val6, и сравнительно небольшое число подуровней, различающихся конформациями относительно лабильных N- и C-концевых остатков. Распределение структурных вариантов в группах зависит от эффективности стабилизирующих взаимодействий между относительно лабильными концевыми остатками и более жестким центральным участком молекулы.

Из сопоставления представленных в табл. 2 энергетических вкладов невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий в низкоэнергетические конформации молекулы субстрата следует, что решающее значение в стабилизации пространственной структуры имеют дисперсионные взаимодействия, обуславливающие плотность упаковки аминокислотной последовательности. Детальное представление о факторах, стабилизирующих пространственные формы, дают треугольные матрицы межостаточных взаимодействий, недиагональными элементами которых являются величины энергии межостаточных взаимодействий. В табл. 3 приведены такие матрицы для лучших конформаций пяти групп (A'–E'). Субматрицы, отвечающие центральной нуклеации фрагмента Phe2 – Val6 существенно отличаются друг от друга, однако в пределах каждой группы оказываются практически постоянными.

Наиболее предпочтительная по энергии глобальная конформация A'1 (табл. 2) имеет свернутую форму основной цепи, которая обеспечивает сближенность всех остатков и их эффективное взаимодействие. Расстояние между N- и C-концевыми атомами составляет для A'1 около 7.3 Å, тогда как у полностью развернутой конформации E' – около 20.0 Å. Низкую энергию имеет также конформация A'2, которая предпочтительнее глобальной конформации A'1 по энергии невалентных взаимодействий, но уступает по электростатическим (табл. 2). Энергетический баланс между пространственными формами A'1 и A'2 определяется взаимной ориентацией боковых цепей остатков His3, Phe4 и Tyr7. У конформации A'1 боковая цепь остатка His3 направлена в сторону концевого Tyr7 и расположена таким образом, что имидазольное кольцо, положительно заряженное в условиях кислой среды, эффективно взаимодействует как с карбоксильной группой основной цепи Tyr7 (–5.0 ккал/моль), так и с ароматическим кольцом его боковой цепи (–2.9 ккал/моль). У конформации A'2 в результате изменения угла χ_1 боковой цепи His3 на $\sim 120^\circ$ и угла основной цепи Val6 на $\sim 180^\circ$ происходит переориентация остатков His3 и Tyr7 и, как следствие, ослабление электростатического и дисперсионного взаимодействия приблизительно на 2.0 ккал/моль. Однако дестабилизации не наступает, поскольку потеря выгодных контактов в значительной мере компенсируется установлением достаточно выгодных дисперсионных взаимодействий между сближенными в конформации A'2 боковыми цепями His3 и Phe2. Низкоэнергетический конформационный переход A'1 \longleftrightarrow A'2 представляет собой простейшую модель межмолекулярного переключателя или аллостерического регулятора (рис. 2).

Конформации A'3 и A'4 отличаются соответственно от A'1 и A'2 состоянием остатка Pro1. Изменение его формы с R на B сопровождается увеличением энергии на 3.5–4.0 ккал/моль. Столь зна-

чительный эффект связан с переходом дипептида Pro1–Phe2 от свернутой формы к развернутой, что ведет к удалению остатка Pro1 от остальной части молекулы и нарушению его выгодных контактов с остатками Phe2, Phe5 и Val6. Таким образом, конформационное равновесие внутри группы A гораздо более чувствительно к изменению положения остатка Pro1, чем Tyr7, так как при переориентации последнего в действие вступает отмеченный выше компенсаторный эффект.

В группе B' центральный пентапептидный участок Phe2–Val6 представляет собой α -спираль (ffff). Конформации B'1 и B'2, отличающиеся состоянием C-концевого дипептида Val6–Tyr7, практически изоэнергетичны (табл. 2). В конформации B'3 изменяется форма основной цепи N-концевого дипептида Ac–Pro1–Phe2 и ослабляется его взаимодействие с α -спиральной нуклеацией, что, однако, в значительной степени компенсируется переориентацией боковых цепей Phe2 и His3 и установлением между ними выгодных контактов. В конформации B'4 оба концевых дипептида имеют развернутые формы, которые лишают их эффективных стабилизирующих взаимодействий с α -спиралью.

Конформационные состояния группы A' переходят в состояние B' при повороте двугранного угла ψ_2 приблизительно на 180° . Поворот сопровождается трансформацией у остатка Phe2 формы основной цепи B в R и встраиванием остатка в α -спираль, что в свою очередь приводит к изменению положений боковых цепей остатков Phe2, His3 и Phe4. В результате перехода конформационного состояния из группы A' в B' устанавливается новая система межостаточных взаимодействий, суммарная энергия которых у B'1 и B'2 выше по сравнению с A'1 и A'2 на ~ 3.0 ккал/моль. Предпочтительность последних связана главным образом с более эффективными контактами в нуклеации efff между остатками His3 с Val6 и Phe4 с Phe5 (табл. 3).

На рис. 3 для самых низкоэнергетических конформаций групп A', B', C', D' и E' (табл. 3) сопоставлены величины энергии невалентных взаимодействий аминокислотных остатков Phe2–Val6 и Ac–Pro1 и Tyr7 между собой и с центральным пентапептидом. У конформации A'1 величины конформационной энергии обеих частей практически совпадают и близки к минимальным. Конформация B'1, опережая глобальную пространственную форму A'1 по энергии стабилизации концевых остатков, проигрывает ей около 6.0 ккал/моль по энергии стабилизации пентапептида Phe2–Val6. Конформационные состояния центральных частей групп C', D' и E' практически не уступают по энергии конформации A'1, однако, не обеспечивают эффективных взаимодействий остатков Pro1 и Tyr7.

Таким образом, представленные на рис. 3 диаграммы, как и данные табл. 2 и 3, свидетельствуют, что ни одна из рассчитанных оптимальных

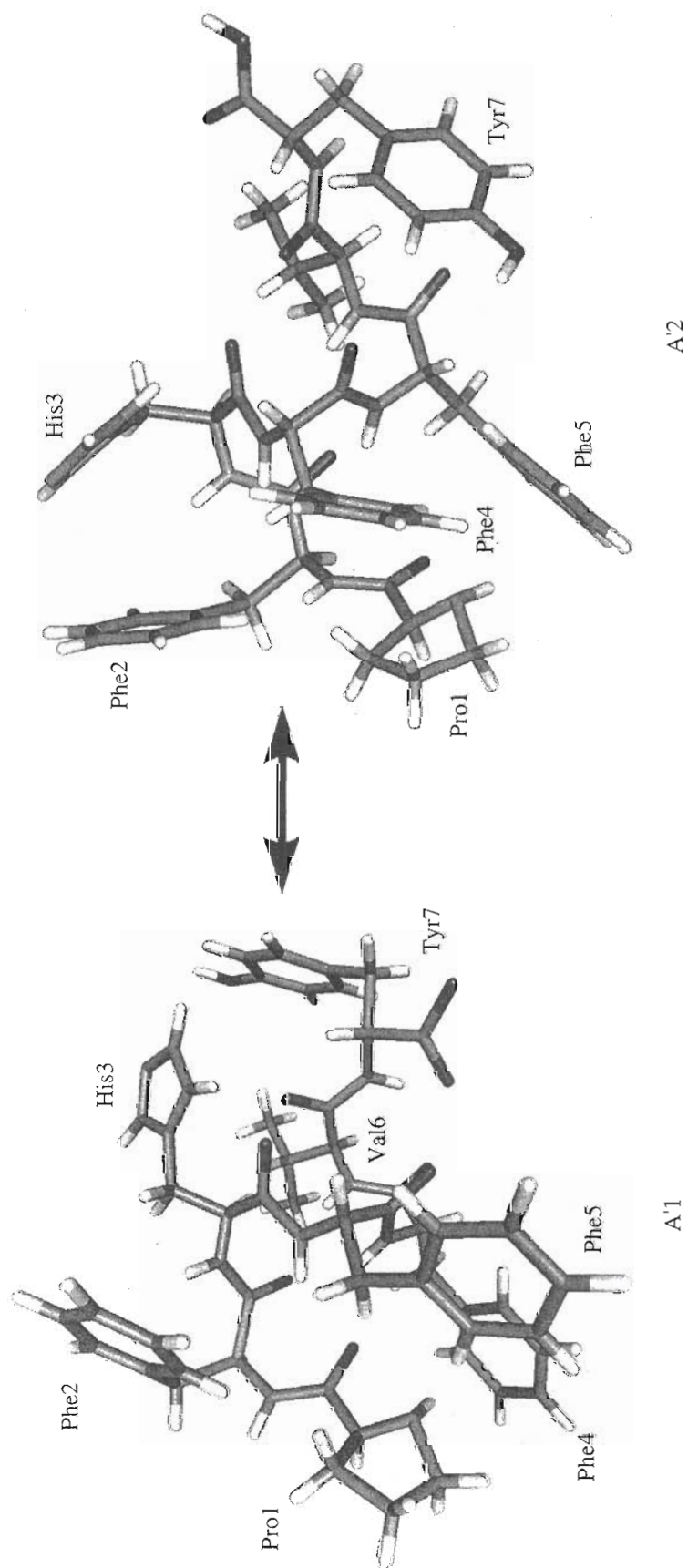


Рис. 2. Взаимное расположение боковых цепей His3, Phe4 и Tyr7 в конформациях A'1 и A'2 [Phe4]субстрата.

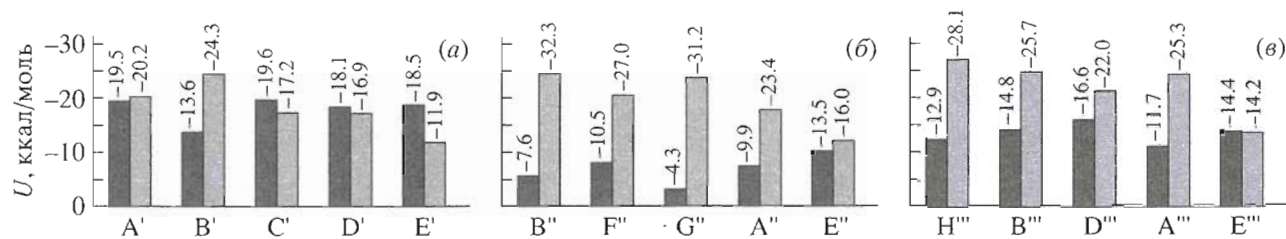


Рис. 3. Энергия невалентных взаимодействий пентапептида Phe2–Val6 (темные столбцы) и *N*-концевых остатков Pro1 и Tyr7 (светлые столбцы) в самых низкоэнергетических конформациях групп A', B', C', D' и E' [Phe4]субстрата (а), групп B'', F'', G'', A'' и E'' [Lys4]субстрата (б) и групп H''', B''', D''', A''' и E''' ингибитора (в).

конформаций не является напряженной. Наблюдаемые для указанных конформаций различия в энергии отражают эффективность стабилизирующих внутримолекулярных взаимодействий по отношению к таковым в глобальной конформации. Поэтому найденное распределение оптимальных форм по энергии справедливо для субстратов лишь в свободном состоянии. При его взаимодействии с активным центром фермента конформация A'1, являющаяся самой предпочтительной в отношении внутримолекулярных взаимодействий, лишается своих преимуществ, например перед полностью развернутой конформацией группы E', имеющей относительную энергию 9.2 ккал/моль. Достоинство пространственной формы A'1 свободного субстрата (максимальная компактность и эффективность межостаточных контактов) оборачивается ее слабостью при взаимодействии субстрата с ферментом. Для развернутой формы E' ситуация противоположна. Ее достоинство при образовании невалентного фермент-субстратного комплекса является продолжением недостатков этой конформации в свободном состоянии молекулы.

[Lys4]субстрат. Расчет конформационных возможностей молекулы [Lys4]субстрата выполнен по той же схеме (рис. 1) и с использованием тех же потенциальных функций, что и расчет [Phe4]субстрата. Не останавливаясь на промежуточных этапах, сразу же перейдем к обсуждению результатов конформационного анализа всей молекулы и сопоставлению его с результатами предыдущего расчета. Заметим, что конформации [Lys4]субстрата, совпадающие по шейпам с конформациями Phe4-замещенного, обозначены теми же буквами, но с двумя штрихами (A'', B'', E'').

Набор из 63 оптимальных конформаций лизинового субстрата, относительная энергия которого не превышает 6.0 ккал/моль, подразделяется в отношении структуры основной цепи пентапептидного фрагмента Phe2 – Val6 в основном на две группы (B'' и F''). В группу B'' входят 37 структурных вариантов, имеющих на центральном участке шейп *ffff*. Лучшие из них вместе с тремя конформациями двух других типов (G'' и A'') и полностью развернутой конформацией E'' представлены в табл. 4. Из сопоставления ее с табл. 2 следует,

что замена в гексапептиде остатка Phe4 на Lys4 не только существенно изменяет конформационные возможности молекулы, увеличивая набор низкоэнергетических вариантов, но и приводит к их перераспределению. Наиболее низкоэнергетические у [Phe4]субстрата конформации семейства A'' становятся у Lys4-производного высокоэнергетичными, относительная энергия лишь двух конформаций A'' (5.1 ккал/моль) попадает в доверительный интервал 0–6.0 ккал/моль. В него не вошел ни один представитель групп C'' и D'', присутствующих в распределении низкоэнергетических структурных вариантов у [Phe4]субстрата, но появились отсутствующие в нем конформации семейств F'' и G''.

К наиболее предпочтительным по энергии и представительным по числу низкоэнергетических вариантов у лизинового субстрата принадлежат конформации типа B'', у которых центральный участок Phe2 – Val6 имеет шейп *ffff*, глобальной же является полностью α -спиральная структура (*ffffff*, табл. 4).

Из табл. 5, в которой приведены энергетические вклады внутри- и межостаточных взаимодействий лучших конформаций всех групп, видно, что для данной аминокислотной последовательности эта форма основной цепи обеспечивает сближение боковых цепей почти всех остатков и реализацию максимального числа выгодных контактов между ними. Общая энергия стабилизации у конформации B''1 составляет –36.3 ккал/моль, причем около половины этой величины – вклад электростатических и дисперсионных взаимодействий остатков His3 и Lys4 с Tyr7 (–16.3 ккал/моль).

На рис. 3б для наиболее предпочтительных структурных вариантов всех групп сопоставлены величины конформационной энергии пентапептида Phe2–Val6 и остатков Pro1 и Tyr7. Доминирующий вклад в стабилизацию вносят взаимодействия концевых остатков [Lys4]субстрата, которые у конформаций всех групп более эффективны по сравнению с [Phe4]субстратом (рис. 3а). В отношении энергии межостаточных взаимодействий на центральном пентапептидном участке наблюдается обратная картина. Причина перераспределения энергии между двумя частями субстрата при замене остатка Phe4 на Lys4 связана с поло-

Таблица 4. Относительная энергия (ΔU) и энергетические вклады (ккал/моль) невалентных ($U_{\text{нв}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных (U_{τ}) взаимодействий оптимальных конформаций [Lys4]субстрата

Группа	Номер	Шейп	Форма	ΔU	$U_{\text{нв}}$	$U_{\text{эл}}$	U_{τ}
В"	1	<i>f-ffff-f</i>	$R^1-R_{11}^2-R_{23}^3-R_{21222}^4-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{313}^7$	0.0	-45.6	5.3	4.0
	2	<i>e-ffff-f</i>	$B^1-R_{21}^2-R_{13}^3-R_{21222}^4-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{111}^7$	2.0	-45.4	7.5	3.7
	3	<i>f-ffff-e</i>	$R^1-R_{21}^2-R_{23}^3-R_{21222}^4-R_{21}^5-B_{111}^6-R_{313}^7$	3.8	43.0	7.5	3.2
	4	<i>e-ffff-e</i>	$B^1-R_{21}^2-R_{31}^3-R_{21222}^4-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{313}^7$	5.8	-42.7	8.3	4.0
Ф"	1	<i>e-feff-f</i>	$B^1-R_{21}^2-B_{23}^3-R_{31222}^4-R_{31}^5-R_{211}^6-B_{313}^7$	1.6	-39.3	1.5	3.3
Г"	1	<i>f-feef-f</i>	$R^1-R_{31}^2-B_{11}^3-B_{21222}^4-R_{31}^5-R_{211}^6-B_{111}^7$	4.3	-39.4	4.7	2.9
А"	1	<i>f-efff-e</i>	$R^1-B_{31}^2-R_{21}^3-R_{22222}^4-R_{21}^5-B_{111}^6-R_{313}^7$	5.1	-41.6	8.0	4.0
	2	<i>f-efff-f</i>	$R^1-B_{31}^2-R_{11}^3-R_{21222}^4-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{313}^7$	5.1	-41.6	7.4	3.1
Е'	1	<i>e-eeee-e</i>	$B^1-B_{21}^2-B_{21}^3-B_{11222}^4-B_{31}^5-B_{211}^6-B_{311}^7$	11.2	-32.8	3.4	4.4

жительным зарядом остатка лизина. В одном случае его боковая цепь, взаимодействуя с одноименно заряженным остатком His3, дестабилизирует конформационные состояния фрагмента Phe2 – Val6, а в другом, взаимодействуя с разноименно заряженным остатком Tug7, оказывает стабилизирующий эффект (табл. 5).

Особый интерес представляют полностью развернутые конформации обоих субстратов, так как именно такого типа конформации, согласно данным рентгеноструктурного анализа, имеют субстратоподобные пептидные ингибиторы в ферментных комплексах всех аспартатных протеиназ (см. обзор [11]). На первый взгляд реализация развернутых форм как у [Phe4]субстрата, так и у [Lys4]субстрата крайне маловероятна, поскольку их относительная энергия даже для лучших представителей групп Е' и Е" равна соответственно 9.2 и 11.2 ккал/моль. Тем не менее у обеих молекул, как видно из рис. 3а, б, развернутые конформации центральных фрагментов Phe2–

Val6, осуществляющих в активном центре (если судить по известным трехмерным структурам фермент-ингибиторных комплексов) 80–90% всех стабилизирующих контактов, принадлежат к энергетически самым предпочтительным состояниям (в случае Е" – глобальному). Так как шейп *eeeeee* пептидного скелета предоставляет наилучшие условия для образования внешних, межмолекулярных контактов, а возможность N- и C-концевых остатков к взаимодействию полностью может проявиться в активном центре, то развернутые конформации Е' и Е" следует считать наиболее вероятными в фермент-субстратном комплексе Михаэлиса.

Субстратоподобный ингибитор. Ингибитор, результаты конформационного анализа которого рассматриваются ниже, отличается от [Phe4]субстрата только тем, что содержит восстановленную карбонильную группу остатка Phe4 (рис. 4). Замена пептидной связи на аминную несколько изменяет геометрию промежуточного между Phe4 и Phe5 участка, а также и электронные конфигурации составляющих его атомов. Восстановленный углерод, обретая гибридизацию sp^3 , становится тетраэдрическим. Переход $sp^2 \rightarrow sp^3$ совершает и атом азота, который, лишившись $n-\pi$ -взаимодействия, пирамидализируется и при кислых значениях pH протонируется, получая тем самым целочисленный положительный заряд. Связь C–N утрачивает кратный характер и ее длина увеличивается с 1.32 до 1.47 Å. Меняются также длины связей $C_4^{\alpha}-C^{\alpha}$ и $N-C_5^{\alpha}$. Потенциальный барьер вращения вокруг $C^{\alpha}-N$ снижается с ~20.0 до ~3.0 ккал/моль, что делает вращение весьма вероятным и вместо двух минимумов при $\omega^4 = 0$ и 180° появляются три (60, 180 и -60°). Если во всех конформациях [Phe4]субстрата расстояние между атомами C_4^{α} и

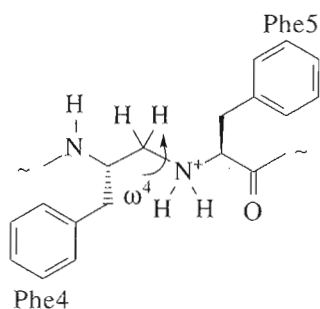


Рис. 4. Дипептидный фрагмент Phe4- $\psi(\text{CH}_2\text{-N}^+\text{H}_2)$ -Phe5 субстратоподобного ингибитора с восстановленной пептидной связью, расщепляемой ризопуспеспином в субстрате.

Таблица 5. Матрицы энергий (ккал/моль) внутри- и межстаточных взаимодействий (без учета торсионной энергии) валентно не связанных атомов для лучших конформаций групп В", F", G", A" и E" [Lys4]субстрата. Субматрица, отвечающая центральному фрагменту Phe2-Val6, выделена затемнением

	Форма	Pro1	Phe2	His3	Lys4	Phe5	Val6	Tyr7
Pro1	B"	-2.1	-3.3	-2.5	-3.6	-2.1	0.0	-0.2
	F"	-2.2	-1.2	-0.6	-2.5	0.0	0.0	-0.3
	G"	-2.2	-3.2	-1.4	0.1	0.0	0.0	-2.8
	A"	2.1	-4.2	0.2	0.4	-2.3	-1.7	-0.5
	E"	-2.3	-1.5	0.4	0.3	0.0	0.0	-0.2
Phe2	B"		0.4	-2.1	-1.3	-2.0	-1.9	0.0
	F"		-0.1	-2.3	-4.4	0.0	0.0	-0.8
	G"		0.0	-2.1	-0.2	0.0	0.0	-1.8
	A"		0.2	-1.1	-1.4	-3.8	-2.5	0.2
	E"		0.1	-3.3	-2.1	0.0	0.0	0.0
His3	B"			0.6	2.4	-1.1	-1.9	-9.1
	F"			1.2	0.4	-3.3	-2.4	-9.1
	G"			0.3	-2.2	-3.0	-1.1	-8.7
	A"			0.6	1.8	-1.3	-1.9	-8.1
	E"			0.9	0.6	-3.3	0.2	-3.4
Lys4	B"				3.3	-0.7	-1.3	-7.2
	F"				3.9	-2.6	-0.3	-7.5
	G"				3.6	-2.6	-0.4	-9.3
	A"				2.7	-0.4	-1.0	-3.8
	E"				2.3	-2.5	-5.5	-5.7
Phe5	B"					-0.1	-2.4	-0.6
	F"					0.0	-1.2	-1.0
	G"					0.0	-1.0	-1.2
	A"					0.0	-2.8	-0.5
	E"					0.4	-1.4	-2.4
Val6	B"						1.1	-3.7
	F"						0.5	-3.6
	G"						0.5	-1.9
	A"						0.7	-2.4
	E"						0.5	-3.0
Tyr7	B"							2.2
	F"							2.0
	G"							1.5
	A"							1.5
	E"							1.8

C_5^α практически постоянно ($\sim 3.5 \text{ \AA}$), то при восстановлении промежуточной пептидной связи оно становится переменным. Таким образом, модификация лишь одного атома в [Phe4]субстрате не только устраняет расщепляемую ризопуспесином пептидную связь и тем самым превращает его в ингибитор, но и приводит к таким последствиям, которые не могут не отразиться на конфор-

мационных возможностях всей молекулы и специфике ее взаимодействий с активным центром фермента. Независимый конформационный анализ молекулы ингибитора проведен при использовании расчетной модели и схемы, представленной на рис. 1 и 4.

Нулевые приближения, как и при анализе субстратов, формировались из низкоэнергетических конформационных состояний молекул метилами-

Таблица 6. Относительная энергия (ΔU) и энергетические вклады (ккал/моль) невалентных ($U_{\text{нв}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$) и торсионных ($U_{\text{т}}$) взаимодействий оптимальных конформаций молекулы ингибитора

Группа	Шейп	Форма	ΔU	$U_{\text{нв}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{т}}$
H'''	<i>f-ffff-f</i>	$R^1-R_{21}^2-R_{21}^3-R_{31}^4-(1)-B_{31}^5-R_{211}^6-R_{311}^7$	0.0	-43.1	2.3	3.8
B'''	<i>f-ffff-e</i>	$R^1-R_{21}^2-R_{23}^3-R_{21}^4-(2)-R_{21}^5-B_{311}^6-R_{311}^7$	1.3	-44.0	4.0	4.2
D'''	<i>f-efef-f</i>	$R^1-B_{31}^2-R_{31}^3-B_{11}^4-(2)-R_{31}^5-R_{211}^6-B_{311}^7$	1.3	-43.2	5.6	1.9
A'''	<i>f-efff-f</i>	$R^1-B_{11}^2-R_{23}^3-R_{31}^4-(2)-R_{21}^5-R_{211}^6-R_{111}^7$	3.0	-39.4	2.7	2.7
I'''	<i>f-efee-f</i>	$R^1-B_{11}^2-R_{21}^3-B_{31}^4-(1)-B_{31}^5-R_{211}^6-R_{311}^7$	4.0	-40.3	3.6	3.7
J'''	<i>f-eeff-e</i>	$R^1-B_{11}^2-B_{23}^3-R_{31}^4-(3)-B_{31}^5-B_{211}^6-B_{311}^7$	4.2	-40.6	3.7	4.0
G'''	<i>f-feef-f</i>	$R^1-R_{31}^2-B_{11}^3-B_{11}^4-(1)-R_{31}^5-R_{211}^6-B_{311}^7$	4.6	-37.7	2.9	2.3
F'''	<i>e-feff-f</i>	$B^1-R_{21}^2-B_{21}^3-R_{31}^4-(2)-R_{31}^5-R_{211}^6-R_{111}^7$	5.0	-37.7	3.3	2.4
K'''	<i>f-eeef-f</i>	$R^1-B_{21}^2-B_{31}^3-B_{21}^4-(1)-R_{31}^5-R_{211}^6-B_{311}^7$	5.0	-35.8	1.6	2.4
L'''	<i>f-fee-f</i>	$R^1-R_{31}^2-B_{31}^3-B_{31}^4-(3)-B_{31}^5-R_{211}^6-B_{311}^7$	5.4	-40.7	3.4	2.8
E'''	<i>e-eeee-e</i>	$B^1-B_{21}^2-B_{21}^3-B_{11}^4-(2)-B_{31}^5-B_{211}^6-R_{311}^7$	11.6	-36.4	8.2	2.8

Цифры (1), (2) и (3) между формами остатков Phe4 и Phe5 отвечают значениям двугранного угла ω^4 (рис. 1) соответственно в интервалах 0–120, 120...–120 и –120–0°.

дов *N*-ацетил-*L*-аминокислот (табл. 8 в [2]). Учитывались *R*, *B* и *L*-формы основной цепи остатков. Всего для минимизации энергии при варьировании двугранных углов (ϕ , ψ , ω и χ) было составлено 924 структурных варианта фрагмента Ac-Pro1 – Phe4 (ψ) (*a*), 1224 – фрагмента His3–Val6 (*b*) и 990 – Phe5–Tyr7 (*e*). Расчет не выявил у фрагментов *a*, *b*, *e* заметной энергетической дифференциации конформаций. Начальные приближения для минимизации энергии гексапептида (1408) составлены из оптимальных конформаций тетрапептидов *a*, *b* всех шейпов, энергия которых не превышала 8.0 ккал/моль. После минимизации энергии в интервал 0–2.0 ккал/моль попали 13 конформаций пяти шейпов, 0–4.0 ккал/моль – 40 конформаций 10 шейпов и 0–6 ккал/моль – 240 22 шейпов из 32 принципиально возможных. Напомним, что у [Phe4]субстрата в те же энергетические интервалы попали соответственно 6, 15 и 21 оптимальная конформация гексапептида шейпов 2, 3 и 6 (табл. 1). Так что ингибиторный фрагмент Pro1–Val6 обладает по сравнению с субстратным значительно большей конформационной свободой. Для расчета всей молекулы ингибитора были отобраны конформации гексапептида Pro1–Val6 и трипептида Phe5–Tyr7, относительная энергия которых не превышала 8.0 ккал/моль. Таких оказалось 2118.

Минимизация отобранных структур ингибитора оставила в интервале 0–6.0 ккал/моль 115 оптимальных конформаций 20 различных шейпов пептидного скелета. Эти цифры значительно превы-

шают число соответствующих конформаций и шейпов [Phe4]субстрата (43 и 10). Если у последнего конформеры с одинаковыми шейпами на участке Phe2–Val6 распределялись в указанном интервале по четырем группам (табл. 2), то у ингибитора – по десяти. Из-за различия в химических связях и высотах барьеров вращения вокруг связи C–N конформации ингибитора и субстрата на участке Phe4– ψ (CH₂-N)–Phe5 имеют у одноименных групп и шейпов разные формы основной цепи и отличающиеся расстояния между атомами C₄ ^{α} и C₅ ^{α} . Лучшие представители всех групп конформаций ингибитора, включая полностью развернутую E''' (*eeeeee*), приведены в табл. 6. Сопоставление представленных в ней и табл. 2 результатов расчета свидетельствует о существенном различии конформационных возможностей ингибитора и субстрата, столь незначительно отличающихся в отношении химического строения.

Прежде всего на это указывают совершенно иные порядки следования оптимальных форм двух молекул, расположенных по величинам относительной энергии. Так, конформация группы H''', глобальная у ингибитора ($\Delta U = 0$ ккал/моль), имеет очень высокую энергию у субстрата ($\Delta U = 12.9$ ккал/моль). Помимо этого, ряд других форм одной молекулы с ΔU менее 6.0 ккал/моль (табл. 6; F''', L'''), отсутствуют в низкоэнергетическом наборе конформаций другой молекулы (табл. 6) и наоборот. Из сравнения величин суммарной энергии невалентной стабилизации пептида Phe2–Val6 и остатков Pro1 и Tyr7 у са-

Таблица 7. Матрицы энергий внутри- и межостаточных взаимодействий (ккал/моль) валентно не связанных атомов для лучших конформаций групп Н^{'''}, В^{'''}, D^{'''}, А^{'''} и Е^{'''} ингибитора. Субматрица, отвечающая центральному фрагменту Phe2–Val6, выделена затемнением

	Форма	Pro1	Phe2	His3	Phe4	Phe5	Val6	Tyr7
Pro1	H ^{'''}	-2.1	-2.1	-1.1	-3.5	-0.5	0.0	-0.1
	B ^{'''}	-2.1	-2.4	-2.3	-3.3	-1.7	0.0	-0.3
	D ^{'''}	-2.1	-4.0	-0.8	0.1	0.2	0.0	-1.6
	A ^{'''}	-2.1	-3.9	0.1	0.1	0.2	-0.1	-0.3
	E ^{'''}	-2.3	-1.7	0.4	0.0	0.1	0.0	-0.3
Phe2	H ^{'''}		-0.1	-0.9	-1.3	-1.1	-2.5	-0.8
	B ^{'''}		-0.1	-0.6	-1.3	-3.6	-4.5	-0.1
	D ^{'''}		-0.1	-1.2	-0.6	-3.3	-4.3	-3.2
	A ^{'''}		0.0	-1.8	-1.6	-2.6	-1.8	-2.0
	E ^{'''}		-0.1	-2.9	3.0	0.0	0.0	0.0
His3	H ^{'''}			0.9	-3.2	-0.9	-2.6	-11.3
	B ^{'''}			0.6	-0.8	-1.2	-1.1	-7.4
	D ^{'''}			0.3	-1.8	0.1	0.0	-3.3
	A ^{'''}			0.5	-3.6	-1.8	-0.1	-7.4
	E ^{'''}			0.6	-1.8	-0.5	-2.1	-2.8
Phe4	H ^{'''}				-2.6	-0.5	-1.1	-1.8
	B ^{'''}				-2.1	-1.0	-1.3	-3.9
	D ^{'''}				-2.8	-3.7	-0.3	-1.4
	A ^{'''}				-2.8	-0.2	-0.4	-5.5
	E ^{'''}				-2.5	-3.7	-0.7	-0.6
Phe5	H ^{'''}					2.2	-1.4	-2.5
	B ^{'''}					1.6	-4.5	-2.1
	D ^{'''}					2.6	-1.9	-4.5
	A ^{'''}					2.3	-2.1	-4.6
	E ^{'''}					2.5	-1.7	-4.9
Val6	H ^{'''}						0.4	-3.3
	B ^{'''}						0.7	-1.6
	D ^{'''}						0.4	-3.3
	A ^{'''}						0.3	-1.7
	E ^{'''}						0.7	-1.9
Tyr7	H ^{'''}							1.9
	B ^{'''}							2.0
	D ^{'''}							2.0
	A ^{'''}							1.5
	E ^{'''}							1.6

мых предпочтительных конформаций различных групп молекул субстрата и ингибитора (рис. 3а, в) следует, что наблюдаемое при переходе от одного аналога к другому энергетическое перераспределение пространственных форм вызвано изменением соотношений между эффективностями межостаточных взаимодействий в центральной и периферийных частях молекул. У ингибитора эти взаимоотношения, как правило, реализуются в

пользу взаимодействий остатков Pro1 и Tyr7 с центральным фрагментом гептапептида, в то время как у субстрата превалируют взаимодействия остатков в пределах фрагмента Phe2–Val6. В первом случае исключением являются развернутые конформации группы E^{'''}, в которых из-за удаленности ослаблены контакты N- и C-концевых остатков, а во втором – конформации группы B^{'''}, имеющие α-спиральную форму основной це-

пи, сближающую эти остатки с центром молекулы. Детали внутримолекулярных взаимодействий лучших конформаций групп В", D", A" и H" ингибитора приведены в табл. 7.

Отмеченная особенность оптимальных конформаций субстратоподобного ингибитора обусловлена наличием трех конформационных минимумов при $\omega^4 = 60, 180$ и -60° и относительной свободой вращения вокруг связи C'-N между остатками Phe4 и Phe5. При $\omega^4 = 60$ и -60° , т.е. при повороте в ту или иную сторону на 120° от плоского расположения связей $C_4^\alpha-C'-N-C_5^\alpha$, изменяется ход основной цепи, структура становится компактнее, и, что наиболее существенно, отрицательно заряженный остаток Tyr7 сближается с положительно заряженной боковой цепью His3. В глобальной конформации H" ингибитора стабилизирующий вклад невалентных взаимодействий этих остатков составляет -11.3 ккал/моль (табл. 7).

В заключение рассмотрим конформацию E", форма основной цепи которой относится к развернутому β -структурному типу (шейп eeeee; табл. 6, 7). Она представляет, как отмечалось выше, особый интерес, поскольку обнаруживается в фермент-ингибиторных комплексах исследованных аспартатных протеиназ. Высокая относительная энергия этой конформации у ингибитора (11.6 ккал/моль), а также у [Phe4]- и [Lys4]субстратов (соответственно 9.2 и 11.2 ккал/моль), практически исключает ее реализацию у свободной молекулы. Однако положение конформации E" (E', E") среди других оптимальных форм резко меняется при взаимодействии ингибитора со специфическим активным центром и образованием невалентного комплекса, стабильного в данном случае и неравновесного в случае субстрата. Неоспоримые преимущества этой пространственной формы заключаются, во-первых, в очень низкой

энергии невалентных взаимодействий в пределах центрального пентапептида Phe2 – Val6 (рис. 2a–в) и, во-вторых, в наибольшей предрасположенности к межмолекулярным взаимодействиям из-за развернутого характера основной цепи. Поэтому можно предположить, что β -структурные конформации субстратов и подобных им ингибиторов окажутся самыми предпочтительными в комплексах Михаэлиса и фермент-ингибиторных комплексах. Это предположение поддается независимой проверке путем априорного расчета фермент-ингибиторного комплекса и сопоставления его результатов с данными рентгеноструктурного анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 1107–1138.
2. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989.
3. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
4. Попов Е.М., Кашипаров И.В., Попов М.Е. // Успехи биол. химии. 1994. Т. 34. С. 40–82.
5. Попов Е.М., Кашипаров И.В., Попов М.Е. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 323–338.
6. Попов М.Е., Кашипаров И.В., Попов Е.М. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 510–522.
7. Suguna K., Padlan E.A., Smith C.W., Carlson W.D., Davies D.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7009–7013.
8. Hoffman T., Hodges R.S., James M.N.G. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 635–643.
9. Popov E.M. // Int. J. Quant. Chem. 1979. V. 16. P. 707–737.
10. Akhmedov N.A., Akhverdieva G.A., Godjaev N.M., Popov E.M. // Int. J. Peptide Protein Res. 1986. V. 27. P. 95–111.
11. Попов Е.М. // Успехи химии. 1995. Т. 64. С. 1143–1182.

Mechanism of Action of Aspartic Proteases. IV. Conformational Characteristics of a Substrate and an Inhibitor of Rhizopuspepsin

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

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

On the basis of theoretical conformational analysis of separate peptide fragments, the conformational characteristics of two substrates and a substrate-like inhibitor of aspartic protease rhizopuspepsin were studied. It was shown that the spatial structure of these molecules is described by several families of conformations, the transition between which does not require the overcoming of high energy barriers. It was assumed that the stabilization of β -structural conformations experimentally observed in inhibitor complexes is due to the greater predisposition of extended structures to the formation of effective intermolecular contacts with amino acid residues of the active site of the enzyme.

Key words: aspartic proteases, conformational analysis, rhizopuspepsin

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