



УДК 577.15.04

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСПАРТАТНЫХ ПРОТЕИНАЗ. V. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ФРАГМЕНТОВ СУБСТРАТСВЯЗЫВАЮЩИХ УЧАСТКОВ РИЗОПУСПЕПСИНА И ПРОТЕИНАЗЫ HIV-1

© 1999 г. И. В. Кашпаров[#], М. Е. Попов, Л. Д. Румш, 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 21.12.98 г. Принята к печати 04.03.99 г.

Методом конформационного анализа исследованы конформационные состояния боковых цепей каталитических остатков аспарагиновой кислоты в активных центрах протеиназ вируса иммунодефицита человека (HIV-1) и ризопуспепсина в потенциальном поле свободных ферментов. Выявлены структурные факторы, обеспечивающие стабилизацию наблюдаемой конформации этих остатков в свободных ферментах. С использованием подходов молекулярной механики проведена оценка энергии стабилизации лабильных фрагментов Met46–Phe53 протеиназы HIV-1 в силовом поле своего ближайшего молекулярного окружения для конформации, характерной для свободного белка, и для конформации, аналогичной наблюдаемой в ингибиторных комплексах. Сделан вывод о том, что состояние указанных фрагментов в свободном ферменте в растворе сходно с тем, которое наблюдается в комплексе с лигандом, тогда как состояние Met46–Phe53 в свободной протеиназе HIV-1, выявленное методом рентгеноструктурного анализа обусловлено особенностями кристаллической упаковки.

Ключевые слова: аспартатные протеиназы; активный центр; конформационный анализ; HIV-1.

Предложенный ранее подход к моделированию последовательных стадий ферментативного катализа [1, 2] включает предварительный анализ динамических конформационных свойств свободных молекул ферментов и взаимодействующих с ними субстратов и ингибиторов. В настоящем сообщении, продолжающем серию наших статей о механизме каталитического действия аспартатных протеиназ [3–6], рассмотрены конформационные свойства боковых заместителей аминокислотных остатков лигандсвязывающих участков в нативных протеиназах – ризопуспепсине и протеиназе вируса иммунодефицита человека (HIV-1PR). Выбор этих двух ферментов в качестве объектов параллельного и независимого конформационного анализа связан, прежде всего, с наличием рентгеноструктурных данных о пространственном строении их ингибиторных комплексов [7, 8], что позволяет надежно проконтролировать результаты расчета. Интерес представляет также то обстоятельство, что при чрезвычайно сходном строении активного центра этих двух ферментов (и, следовательно, сходном каталитическом механизме их действия) они сильно различаются по структуре молекулярного окружения активного центра и обладают, если судить по данным рентгеноструктурного анализа, различаю-

щейся конформационной подвижностью. Так, в процессе фермент-ингибиторных взаимодействий протеиназы HIV-1 происходит чрезвычайно большая, не имеющая прецедентов в каталитических реакциях других ферментов конформационная перестройка значительной части нативной структуры [9, 10], тогда как в ингибиторных комплексах ризопуспепсина [7] смещения C^α-атомов гораздо менее значительны. Таким образом, с конформационной точки зрения ризопуспепсин и протеиназа HIV-1 представляют собой две принципиально различающиеся молекулярные системы с присущими каждой из них характерными чертами структурной организации, определяющими субстратную специфичность и структурные особенности связывания субстрата в активном центре в ходе реакции протеолиза. Поэтому при проведении теоретического исследования конформационных аспектов каталитического механизма аспартатных протеиназ интересно рассмотреть обеих молекулярных систем.

Осуществление динамической комплементарности при взаимодействии фермента с субстратом возможно лишь при их взаимных конформационных перестройках в процессе катализа. В связи с этим для понимания механизма каталитического акта наряду со знанием нативной структуры фермента, устанавливаемой экспериментально, представляется необходимым знать и потенциальные

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

возможности этой структуры к изменениям. Знание конформационных возможностей отдельных остатков активного центра, и прежде всего тех, важность которых для катализа была установлена экспериментально, необходимо и для выбора адекватной модели активных центров ферментов при независимом расчете пространственных структур их невалентных комплексов с субстратами и ингибиторами. Поэтому мы провели конформационный анализ боковых цепей каталитических остатков аспарагиновой кислоты Asp35, Asp218 ризопуспепсина и Asp25 HIV-1PR в потенциальном поле активных центров этих двух протеиназ, построенных на основании экспериментальных координат свободных ферментов 2arg (ризопуспепсин, [11]) и 1hhp (HIV-1PR, [10]) из международного банка трехмерных структур (<http://www.pdb.bnl.gov>).

При создании модели белкового окружения учитывались координаты всех остатков, атомы которых располагались в радиусе 6 Å от исследуемых остатков: соответствующие фрагменты белка включали по 18 аминокислот. Для Asp35 ризопуспепсина это: Asp35-Ser39, Tyr77, Leu122-Gly126, Tyr169, Asp218-Thr221, для Asp218: Asp35-Ser38, Trp195, Ile216-Leu223, Ile298-Asp301, Leu34, для Asp25 протеиназы HIV-1 потенциальное поле создавалось остатками Pro9, Leu23-Asp29, Ile84-Arg87, Leu90, Asp25-Ala28, Leu97. Специальная проверка показала, что учет большего числа остатков практически не сказывается ни на энергии взаимодействия исследуемых остатков с молекулярным окружением, ни на форме потенциальной поверхности создаваемого поля. Было отмечено лишь несущественное (менее 7%) изменение абсолютных значений внутренней энергии на конформационных картах боковых цепей рассматриваемых остатков активного центра без изменения площади поверхности минимумов и порядка их следования в шкале энергетической предпочтительности.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ОСТАТКОВ АСПАРАГИНОВЫХ КИСЛОТ В АКТИВНЫХ ЦЕНТРАХ РИЗОПУСПЕПСИНА И ПРОТЕИНАЗЫ HIV-1

Представление о конформационной свободе боковых цепей каталитических остатков аспарагиновых кислот в активных центрах свободных молекул ризопуспепсина и протеиназы HIV-1 и об их оптимальных формах было получено из конформационных карт χ^1 - χ^2 , построенных с шагом 5°. При этом учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, торсионные вклады и водородные связи.

На рис. 1 представлены конформационные карты χ^1 - χ^2 боковых цепей каталитических ос-

татков Asp35 и Asp218 ризопуспепсина (а) и остатка Asp25 ретровирусной протеиназы HIV-1 (б) на фоне профиля потенциальной энергии боковой цепи свободного изолированного метиламида *N*-ацетил-*L*-аспарагиновой кислоты, построенного при значениях углов ϕ , ψ основной цепи, аналогичных экспериментальным значениям для остатков Asp35 (Asp25) ризопуспепсина [11] и протеиназы HIV-1 [10]. Низкоэнергетическая область на полученных картах занимает небольшую площадь, ограниченную по углу χ^1 приблизительно в 10°, а по углу χ^2 – 50°. Она совпадает с низкоэнергетической областью свободной аминокислоты. Это обстоятельство, а также хорошее соответствие экспериментальных значений углов χ^1 и χ^2 теоретическому минимуму на конформационной карте свидетельствуют о том, что боковые цепи Asp35, Asp218 и Asp25 в нативных протеиназах не испытывают стерических напряжений, хотя и весьма ограничены по своей подвижности. Из рассмотрения конформационных карт на рис. 1 при сопоставлении контуров потенциальной поверхности этих остатков в поле белка с профилем свободной аспарагиновой кислоты следует, что ограничение конформационной свободы боковых цепей Asp35, Asp218 (ризопуспепсин) и Asp25 (протеиназа HIV-1) по углу χ^1 в существенной степени обусловлено взаимодействием с атомами своей основной цепи. Структурные предпосылки для ограничения конформационной свободы остатков Asp35, Asp218 и Asp25 по углу χ^2 становятся ясными при рассмотрении конформационных карт боковых цепей указанных остатков в теоретически модифицированном активном центре.

Конформационная карта боковой цепи χ^1 - χ^2 остатка Asp218, невозмущенная взаимодействием с боковой цепью Thr221, показана на рис. 2. Исключение влияния остатка Thr, боковая цепь которого при построении конформационной карты была заменена на атом водорода (Thr221 → Gly221), приводит к увеличению свободы вращения остатка Asp218 в интервале величин χ^2 . При этом ограничительная роль Thr221 в основном обусловлена влиянием атома C^β его бокового радикала. Таким образом, поддержание продуктивного конформационного состояния аспарагиновых кислот в активном центре может, помимо остатка Thr, обеспечиваться остатками любых других аминокислот с относительно небольшим боковым радикалом, например Ser или Ala, что и наблюдается, в частности, у ретровирусных протеиназ, где остаток Thr в структуре фермента заменен на Ala [8].

Определяющее значение для структуры активного центра ризопуспепсина имеют остатки Gly37 и Gly220 из повторяющегося в аспартатных протеиназах симметричного триплета Asp-Thr-Gly. Любой остаток в положении 220 (37), имеющий боковой радикал, приводит к возникновению не-

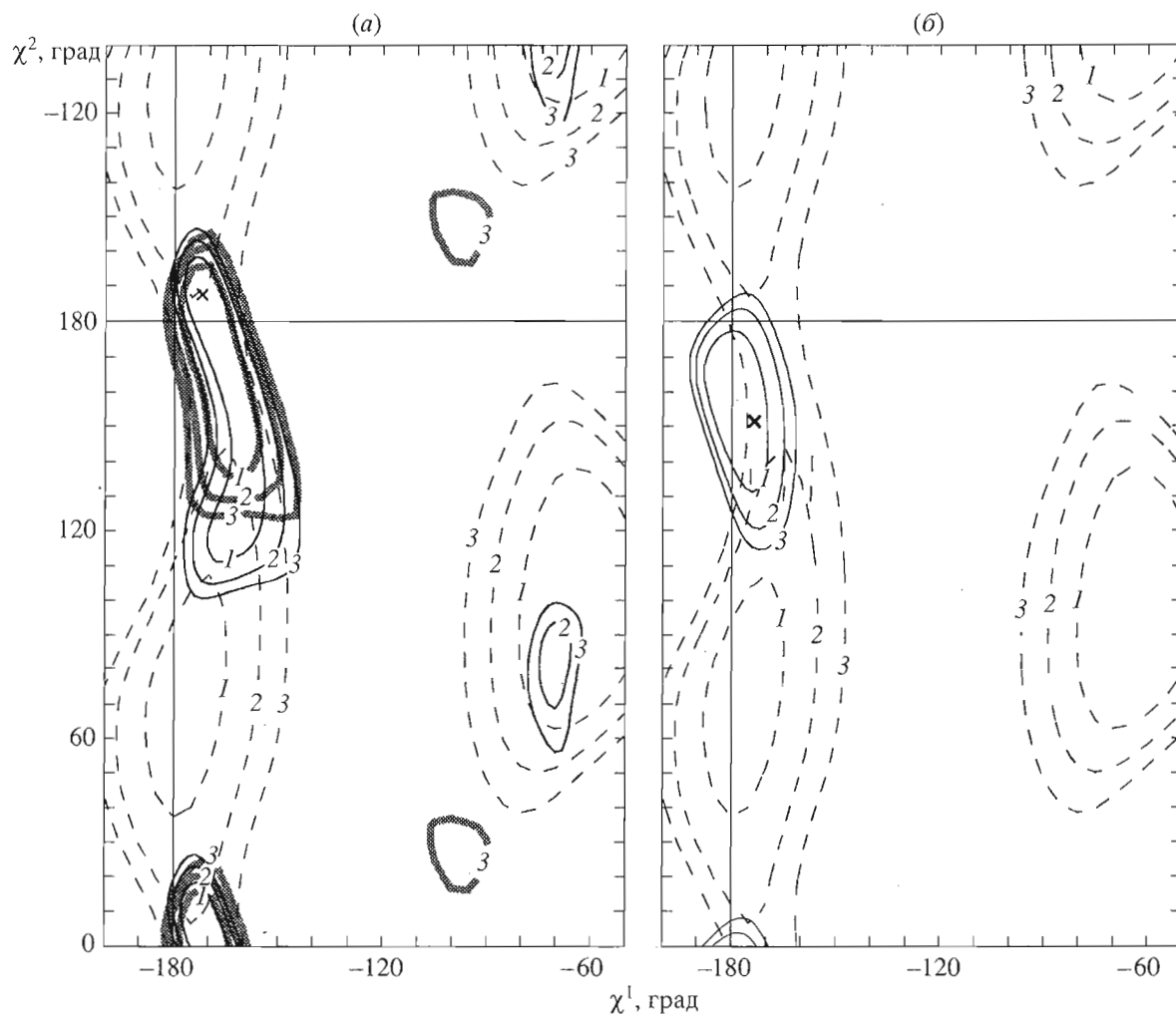


Рис. 1. Конформационные карты χ^1 - χ^2 каталитически активных остатков ризопуспесина Asp35 (тонкий контур), Asp218 (жирный контур) (а) и Asp25 протеиназы HIV-1 (б) (сплошная линия) в потенциальном поле активного центра фермента. Область активного центра моделировалась 18 остатками в радиусе 6 Å от исследуемого остатка Asp35/Asp218 (Asp25). Штриховой линией обозначена область низкой энергии для свободного метиламида *N*-ацетил-*L*-аспарагиновой кислоты. Цифры на эквипотенциалах указывают значения относительной энергии (ккал/моль) соответствующей области конформационного пространства.

снимаемых стерических наталкиваний на боковую цепь каталитического остатка аспарагиновой кислоты Asp35 (218) из противоположного домена. Это обстоятельство иллюстрирует конформационная карта χ^1 - χ^2 остатка Asp218 ризопуспесина, построенная в силовом поле активного центра фермента, в котором остаток Gly37 заменен на остаток Ala (рис. 3). Расчет показывает, что наличие бокового радикала, даже минимального из возможных, запрещает экспериментальный конформационный минимум в области значений углов χ^1 - χ^2 вблизи 170° , -170° и смещает его в область -80° , 20° . При этом абсолютное значение энергии стабилизации для боковой цепи остатка Asp218 увеличивается, согласно нашим оценкам, примерно на 20 ккал/моль. Аналогич-

ные результаты были получены и для остатков Asp35 ризопуспесина и Asp25 HIV-1PR.

Таким образом, наблюдаемая эволюционная консервативность остатков Gly37 (220) у всех без исключения представителей семейства аспартатных протеиназ обусловлена, по-видимому, тем обстоятельством, что его замена на любой другой остаток с неизбежностью вела бы к структурным перестройкам, запрещающим наблюдаемую в структуре свободного ризопуспесина продуктивную взаимную ориентацию карбоксильных групп остатков Asp35, Asp218 и к инактивации активного центра фермента.

Боковые цепи ближайших соседей Asp35 и Asp218 – остатков Thr36 и Thr219 – направлены в сторону взаимно противоположных доменов и образуют с ними эффективные контакты [11]. Эти

остатки служат, по-видимому, своеобразными якорями, которые стабилизируют геометрию активного центра и, не вступая в непосредственные контакты с остатками Asp, поддерживают необходимую для катализа ориентацию их боковых цепей. Об этом свидетельствует и обнаруженный нами факт, что конформационные карты χ^1 - χ^2 остатков Asp35 и Asp218 ризопуспелсина, полученные с учетом и без учета взаимодействий с остатками Thr, идентичны. Консервативность остатков Thr в активных центрах аспартатных протеиназ, по-видимому, связана в основном с необходимостью обеспечения тонкой комплементарности потенциальных поверхностей их боковых цепей и соответствующих доменов.

КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ФРАГМЕНТОВ Lys45-Val56 В ПРОТЕИНАЗЕ HIV-1

Одна из особенностей ретровирусной протеиназы HIV-1 – способность ее структуры к осуществлению довольно значительных конформационных движений, если судить по различиям между трехмерными структурами свободной протеиназы HIV-1 [9, 10] и ее комплексов с ингибиторами JG-365 [8], U 85548e [12] и MVT-101 [13]. Изменения при связывании лиганда затрагивают не только конформации боковых цепей многих остатков, но, что встречается реже, состояние больших фрагментов основной цепи. Это область так называемого флепа, в котором смещения атомов C^α на участке Lys45-Val56 достигают 6–8 Å.

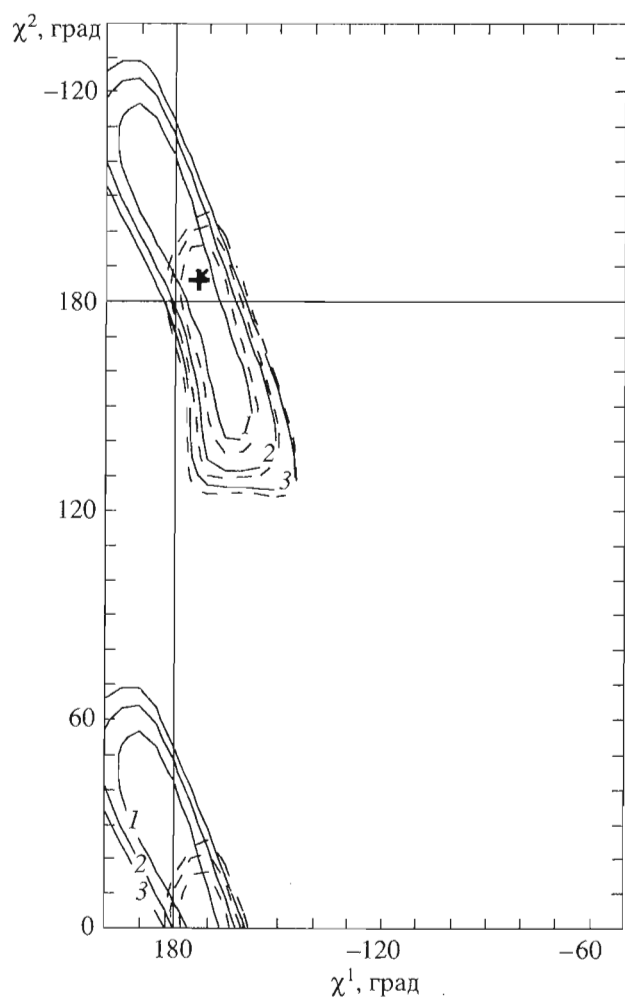


Рис. 2. Конформационная карта χ^1 - χ^2 остатка Asp218 (тонкий контур) в отсутствие взаимодействия с боковой цепью Thr221. Штриховой линией показан потенциальный профиль Asp218 в нативном белке. Цифры на эквипотенциалах указывают значения относительной энергии (ккал/моль) соответствующей области конформационного пространства.

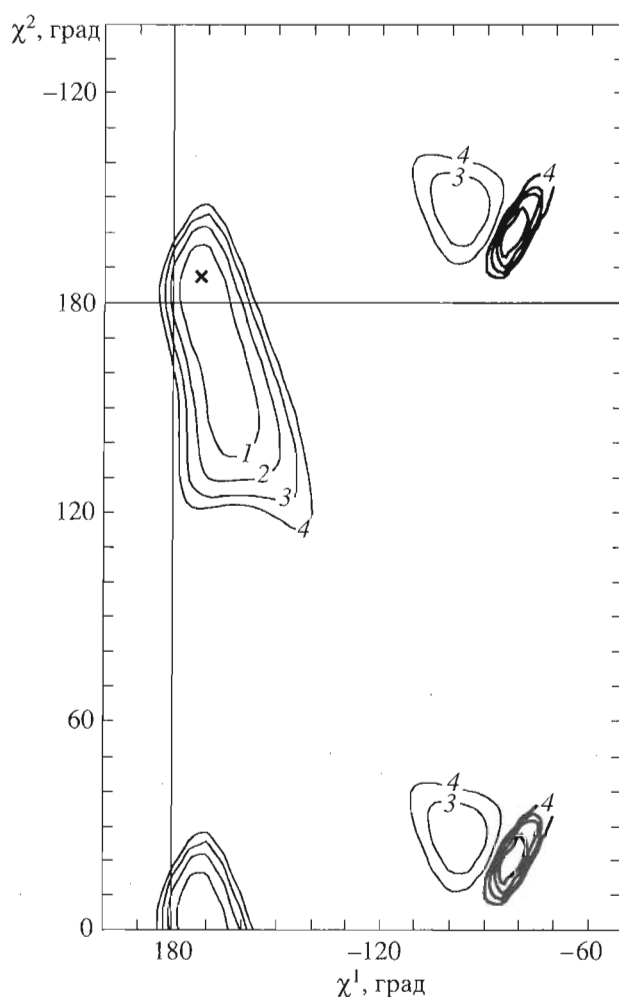


Рис. 3. Конформационная карта χ^1 - χ^2 остатка Asp218 в потенциальном поле активного центра ризопуспелсина с заменой Gly37Ala (жирная линия). Тонкой линией обозначена область конформационной подвижности боковой цепи Asp218 в нативном ферменте. Цифры на эквипотенциалах указывают значения относительной энергии (ккал/моль) соответствующей области конформационного пространства.

Меньшие, но заметные изменения претерпевают также участки Leu33–Leu38 и Val77–Asn83 (рис. 2 в [4]). У ризопусепсина область флепа представлена 7 остатками β -складчатого листа (фрагмент 75–81 [11]). Сравнение трехмерных структур свободной молекулы ризопусепсина [11] и ее ингибиторного комплекса [7] методом молекулярного наложения свидетельствует лишь о незначительном смещении остатков этого фрагмента в сторону активного центра при связывании молекулы лиганда. Первое напрашивающееся объяснение структурных изменений у протеиназы HIV-1 – отнести их за счет связывания субстрата. Однако существует неясность в отношении того, взаимодействия какого типа могут поддерживать структуру флепов, поднятых над активным центром [10]. Была выдвинута альтернативная гипотеза, связывающая положения флепов с межмолекулярными взаимодействиями в кристаллической решетке [14].

В молекуле HIV-1PR флепы (фрагмент Lys45–Val56 в обоих доменах белка) представляют собой две направленные навстречу друг другу антипараллельные β -структуры, которые, подобно консолям, нависают над активным центром [9, 10]. Их подвижные концы содержат пары Ile50, Gly51 и Ile150, Gly151, которые в свободном ферменте могут взаимодействовать друг с другом с определенным стабилизирующим эффектом. В ингибиторном комплексе атомы C^α остатков Ile и Gly смещаются приблизительно на 8 Å в сторону активного центра [8]. При переходе от нативной структуры к ингибиторному комплексу флепы совершают сложные движения, которые можно представить как трансляционное смещение с одновременным поворотом. В процессе трансляции их подвижные концы скользят относительно друг друга и образуют конечную структуру, в которой шесть остатков фрагмента (Gly48–Phe53) в первом домене находятся против шести остатков аналогичного фрагмента в противоположном домене на расстоянии 3 Å, обеспечивая, тем самым, стабилизирующие дисперсионные контакты. Каждый из противоположных гексапептидов содержит по четыре остатка Gly и является поэтому весьма подвижным, что, по-видимому, необходимо для эффективного взаимодействия с молекулой субстрата и освобождения продуктов протеолиза. Таким образом, оптимизация энергии взаимодействия флепов сопровождается конформационной адаптацией, особенно заметной на участках Gly49–Gly52 обоих доменов HIV-1PR.

Возникает вопрос, может ли указанная адаптация происходить в свободном белке при отсутствии в активном центре фермента молекулы лиганда, или связывание последнего абсолютно необходимо для осуществления указанных конформационных перестроек?

Ответ на вопрос о вероятном состоянии флепов, как наиболее лабильных фрагментов HIV-1PR, в свободном ферменте и в его комплексе с лигандом, представляется важным в виду того, что при моделировании взаимодействия фермента с субстратами точность предсказания продуктивной структуры лиганда в невалентном комплексе существенным образом зависит от корректности выбора начального приближения для структурной модели субстратсвязывающего участка [3].

Поэтому мы довольно просто оценили энергию взаимодействия фрагмента флепа 46–53 со своим молекулярным окружением в структуре свободной молекулы HIV-1PR и в структуре, которую этот фермент имеет в ингибиторном комплексе [8]. Поскольку нас интересовали два возможных состояния именно свободного фермента, то энергия взаимодействия с молекулой ингибитора при этом не учитывалась. В качестве исходных были взяты молекулярные координаты 1hhp [10] и 7hvp [8] из международного банка трехмерных структур. Потенциальное поле модели создавалось остатками протеиназы HIV-1, находящимися в интервале 6 Å от исследуемых фрагментов флепа. Таких остатков насчитывается 34 для свободной протеиназы HIV-1 и 42 – для ее структуры в комплексе с ингибитором. Затем к структурной модели согласно стереохимическим правилам добавлялись атомы водорода, после чего боковые радикалы остатков модели оптимизировались в своих локальных конформационных минимумах для снятия минорных стерических проблем. Исследуемые фрагменты флепов, включающие остатки 46–53, подвергались процедуре минимизации энергии с учетом дисперсионных, электростатических, торсионных взаимодействий, а также с учетом энергии водородных связей при использовании потенциальных функций и параметризации приведенных в работе [15].

Расчет показывает, что энергия взаимодействия указанных фрагментов протеиназы со своим молекулярным окружением, соответствующая положению флепов, близкому к таковому в ингибиторном комплексе 7hvp, по крайней мере на 15 ккал/моль ниже энергии взаимодействия этих же фрагментов белка в кристаллической структуре 1hhp свободной протеиназы HIV-1. Этот факт свидетельствует в пользу того, что различия в положении флепов в свободной протеиназе HIV-1 и в ее ингибиторном комплексе могут быть обусловлены особенностями кристаллической упаковки, характерной для свободного фермента. Таким образом, энергетически предпочтительные конформации флепов в свободном ферменте в растворе должны быть близкими к таковым в ингибиторном комплексе.

Вывод о том, что конформация протеиназы HIV-1 в растворе близка к структуре этого фермента в ингибиторном комплексе, подтверждается наблюдениями для высокомолекулярной ретровирусной протеиназы SIV [14], имеющей иные характеристики кристаллической ячейки и, следовательно, иной тип межмолекулярных взаимодействий в кристалле. В свободной структуре протеиназы SIV координаты атомов основной цепи фермента совпадают с таковыми в ингибиторных комплексах, которые, в свою очередь, по строению весьма близки к ингибиторным комплексам протеиназы HIV-1 [14].

Полученное представление о факторах структурной стабилизации каталитических остатков аспарагиновых кислот в свободных активных центрах ризоуспепсина и протеиназы HIV-1 и о вероятном конформационном состоянии фрагмента 46–53 флепа протеиназы HIV-1 в свободном состоянии может оказаться полезным для построения адекватных теоретических моделей субстратсвязывающих участков ризоуспепсина и протеиназы HIV-1 при изучении особенностей структурной организации их субстратных комплексов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
2. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. С. 5–41.
3. Попов Е.М., Каунаров И.В., Попов М.Е. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 323–338.
4. Попов М.Е., Каунаров И.В., Попов Е.М. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 510–522.
5. Попов М.Е., Каунаров И.В., Руми Л.Д., Попов Е.М. // Биоорг. химия. 1999. Т. 25. С. 418–422.
6. Каунаров И.В., Попов М.Е., Руми Л.Д., Попов Е.М. // Биоорг. химия. 1999. Т. 25. С. 423–434.
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. Swain A.L., Miller M.M., Green J., Rich D.H., Schneider J., Wlodawer A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8805–8809.
9. Wlodawer A., Miller M., Jaskolski M., Sathyanarayana B.K., Baldwin E., Weber I.T., Selk L.M., Clawson L., Schneider J., Kent S.B. // Science. 1989. V. 245. P. 616–621.
10. Spinelli S., Liu Q.Z., Alzari P.M., Hirel P.H., Poljak R.J. // Biochimie. 1991. V. 73. P. 1391–1396.
11. Suguna K., Bott R.R., Padlan E.A., Subramanian E., Sheriff S., Cohen G.H., Davies D.R. // J. Mol. Biol. 1987. V. 196. P. 877–900.
12. Jaskolski M., Tomasselli A.G., Sawyer T.K., Staples D.G., Heinrikson R.L., Schneider J., Kent S.B., Wlodawer A. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 1600–1609.
13. Miller M., Schneider J., Sathyanarayana B.K., Toth M.V., Marshall G.R., Clawson L., Selk L., Kent S.B., Wlodawer A. // Science. 1989. V. 246. P. 1149–1152.
14. Wilderspin A.F., Sugrue R.J. // J. Mol. Biol. 1994. V. 239. P. 97–103.
15. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989.

Mechanism of Action of Aspartic Proteases. V. Conformational Characteristics of Fragments of Substrate-binding Sites in Rhizopuspepsin and HIV-1 Protease

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

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

The conformational states of side chains of catalytic Asp residues in active sites of HIV-1 protease and rhizopuspepsin in the potential field of free enzymes were studied by using theoretical conformational analysis. Structural factors that stabilize the conformation of these residues in free enzymes were revealed. Methods of molecular mechanics were used to estimate the stabilization energy of the Met46–Phe53 labile fragments of HIV-1 protease in the potential field of their nearest surrounding amino acid residues for the conformations characteristic of the free protein and similar to that of the protein in enzyme–inhibitor complexes. In solution, the conformational state of the fragments of the free enzyme was concluded to be similar to that observed in the enzyme complex with the ligand and different from that determined by X-ray diffraction analysis. This difference was ascribed to the effect of crystal packing.

Key words: aspartic proteases, active site, conformational analysis, HIV-1

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