



УДК 577.15.2.342

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСПАРТИЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ. VII*. НЕВАЛЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ АСПАРТИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ HIV-1 С СУБСТРАТОМ И СУБСТРАТОПОДОБНЫМ ИНГИБИТОРОМ

© 1999 г. М. Е. Попов[#], И. В. Кашпаров, 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 10.07.98 г. Принята к печати 07.06.99 г.

Структура невалентного комплекса аспартильной протеиназы вируса иммунодефицита человека (HIV-1) с субстратоподобным ингибитором JG-365 априорно воспроизведена методами компьютерного моделирования на основе подходов теоретического конформационного анализа и молекулярной механики. Среднеквадратичное отклонение полученной в результате расчета конформации ингибитора от кристаллографических данных составило 0,87 Å.

Полученные результаты позволили перейти к априорному расчету структуры невалентного комплекса протеиназы HIV-1 с гексапептидным фрагментом природного специфического субстрата Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val. В результате найдена единственно возможная ориентация расщепляемой пептидной группы и нуклеофильной молекулы воды относительно каталитически активных остатков Asp25 и Asp125 фермента, обеспечивающая последующую химическую трансформацию субстрата в сторону образования тетраэдрического промежуточного соединения. Анализ полученных расчетных расстояний позволил предложить механизм действия ферментов этого класса.

Показано, что оптимальное расположение молекул субстратов в активных центрах аспартильных протеиназ HIV-1 и ризопуспесина не сопровождается какой-либо стерической деформацией расщепляемой связи или формированием неблагоприятных контактов у молекул ферментов и их субстратов.

Ключевые слова: катализ; аспартильные протеиназы; HIV-1 PR; компьютерное моделирование; каталитический механизм.

ВВЕДЕНИЕ

Данное сообщение продолжает серию публикаций, посвященных изучению механизма ферментативного катализа аспартильных протеиназ [2]. Предложенный ранее подход [3], позволяющий количественно описать все стадии каталитического акта как спонтанного неравновесного процесса, основан на последовательном и независимом рассмотрении его конформационных и электронных аспектов. При этом конформационные аспекты рассматриваются на классической основе с использованием полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов, а электронные – на квантово-химической с помощью методов квантовой химии.

Цель настоящей работы – теоретическое исследование механизма образования невалентных комплексов протеиназы вируса иммунодефицита человека (HIV-1 PR). Сборка невалентного фермент-субстратного комплекса является необходимым этапом, определяющим ориентацию взаи-

модействующих функциональных групп фермента и субстрата и предопределяющим ход любой ферментативной реакции. В качестве первых шагов априорного исследования невалентных комплексов были определены наборы предпочтительных конформационных состояний свободных молекул субстрата [4] и ингибитора JG-365 [5] протеиназы HIV-1, а также рассмотрены конформационные возможности аминокислотных остатков активного центра нативного фермента [6]. Параллельно был выполнен аналогичный анализ для другой аспартильной протеиназы – ризопуспесина [1, 7], существенно отличающегося от HIV-1 PR своими динамическими конформационными свойствами.

Исследование протеиназы HIV-1, проведенное абсолютно независимо от полученных ранее результатов для ризопуспесина, преследует две цели. Первая состоит в выяснении конформационных аспектов образования невалентного комплекса и причин его электронной нестабильности. Вторая, более общая, заключается в сопоставлении независимо полученных для HIV-1 PR и ризопуспесина выводов о принципах функциониро-

* Сообщение VI см. [1].

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

вания этих двух ферментов, принадлежащих к одному и тому же классу протеиназ.

КОМПЛЕКС ПРОТЕИНАЗЫ HIV-1 С ИНГИБИТОРОМ JG-365

Трехмерная структура комплекса гомодимерной протеиназы HIV-1 с ингибитором JG-365 была получена А.Л. Свейном и сотр. с разрешением 2.5 Å [8] (структура 7hvp в Brookhaven Data Bank, www.pdb.bnl.gov). Субстратоподобный ингибитор представляет собой гептапептид Ac-Ser1-Leu2-Asn3-Phe4-ψ[-СНОН-СН₂-]Pro5-Phe6-Val7-OMe, в котором место расщепляемой пептидной связи Phe-Pro занимает негидролизующая гидроксизтиламиновая группа. Помимо роста длины основной цепи за счет дополнительного СН₂-звена, такая замена ведет к увеличению числа возможных конформационных состояний ингибитора.

В расчете мы принимали, что все остатки аспарагиновой кислоты являются ионизированными. Вопрос о состоянии карбоксилатов каталитически значимых остатков Asp остается дискуссионным. Ранее высказывались предположения [9], что, по крайней мере, одна из карбоксильных групп является протонированной. Однако согласно недавно полученным данным ЯМР ¹³C для нативной протеиназы HIV-1, карбоксильные группы обоих аспаргатов ионизованы [10]. Авторы работы [10], кроме того, предположили, что в ингибиторном комплексе HIV-1 PR один из остатков Asp имеет ионизированную, а второй – протонированную форму. Такой вывод представляется нам не в достаточной степени обоснованным: полученные в работе [10] данные ЯМР не противоречат и такой ситуации, когда оба Asp в ингибиторном комплексе находятся в ионизированной форме.

МОДЕЛЬ И МЕТОД РАСЧЕТА

При моделировании ингибиторного комплекса HIV-1 PR мы применяли метод последовательного наращивания полипептидной цепи лиганда в поле активного центра, использовавшийся ранее [1] в исследовании невалентных комплексов ризопуспепсина. Расчет энергии и оптимизация полипептидных структур проводились с помощью разработанного нами программного комплекса FAG. Модель белка представлялась во внутренних координатах (длина связи, валентный угол, двугранный угол) в предположении постоянных длин валентных связей и валентных углов. Параметры для расчета (длины связей, валентные углы и парциальные заряды на атомах) взяты из работы [11]. Для группы -СНОН-СН₂-, замещающей расщепляемую пептидную связь, использованы геометрические параметры и парциальные заряды боковой цепи треонина (С^βН₂-С^γН₂ОН). Геометрия и парциальные заряды остатка Pro5 соответ-

ствовали N-концевому остатку пролина с пирамидализованным азотом. Обозначения остатков соответствовали кристаллографическим данным, согласно которым остатки одного домена имеют нумерацию 1–99, а второго 101–199.

В расчете фермент-ингибиторного комплекса известными считались координаты 52 остатков (716 атомов) белка, находящихся в радиусе 7 Å от атомов ингибитора, а также координаты атома азота основной цепи остатка Asp3, который служил исходной точкой для последующего наращивания в направлении от N- к C-концу олигопептида. Этот атом в процессе расчета соединялся виртуальной связью с одним из аминокислотных остатков фермента. Начальные приближения для ориентации связи N-C^α были найдены при вращении в поле белка атомной группы N-C^α, у которой заместители при атоме C^α были заменены атомами водорода, вокруг трех виртуальных ортогональных осей при фиксированном атоме N. Для каждой пары углов были получены конформационные карты – сечения потенциальной поверхности в координатах двугранных углов вращения. Как и в случае ризопуспепсина [1], первоначально учитывались только вклады дисперсионных взаимодействий и водородных связей. Поскольку электростатическая компонента не приводит к образованию новых энергетических минимумов или изменению положения существующих, а лишь влияет на их относительную глубину [3], на этом этапе она была исключена из расчета, однако учитывалась при последующей оптимизации структур.

В энергетических минимумах полученных карт отбирались значения углов для последующей оптимизации. Критерием отбора наилучших конформаций на этом этапе была относительная энергия в 4 ккал/моль; в широких минимумах отбиралось несколько значений углов с шагом в 30°. В результате было получено 20 комбинаций трех углов, которые послужили начальными приближениями для последующей оптимизации с использованием полного потенциала, включающего электростатическую составляющую.

Затем к атому C^α были снова добавлены атомы C^β и C^γ с соответствующими заместителями и для всех найденных начальных приближений построены конформационные карты в координатах двугранных углов φ, ψ и χ¹, на которых отбирались энергетические минимумы в пределах 10 ккал/моль. Дальнейшее наращивание структуры велось в двух направлениях путем добавления атомных групп к основной и боковой цепи аминокислотного остатка Asp3. На каждом этапе строились конформационные карты по двугранным углам вращения, координирующим расположение добавляемых фрагментов.

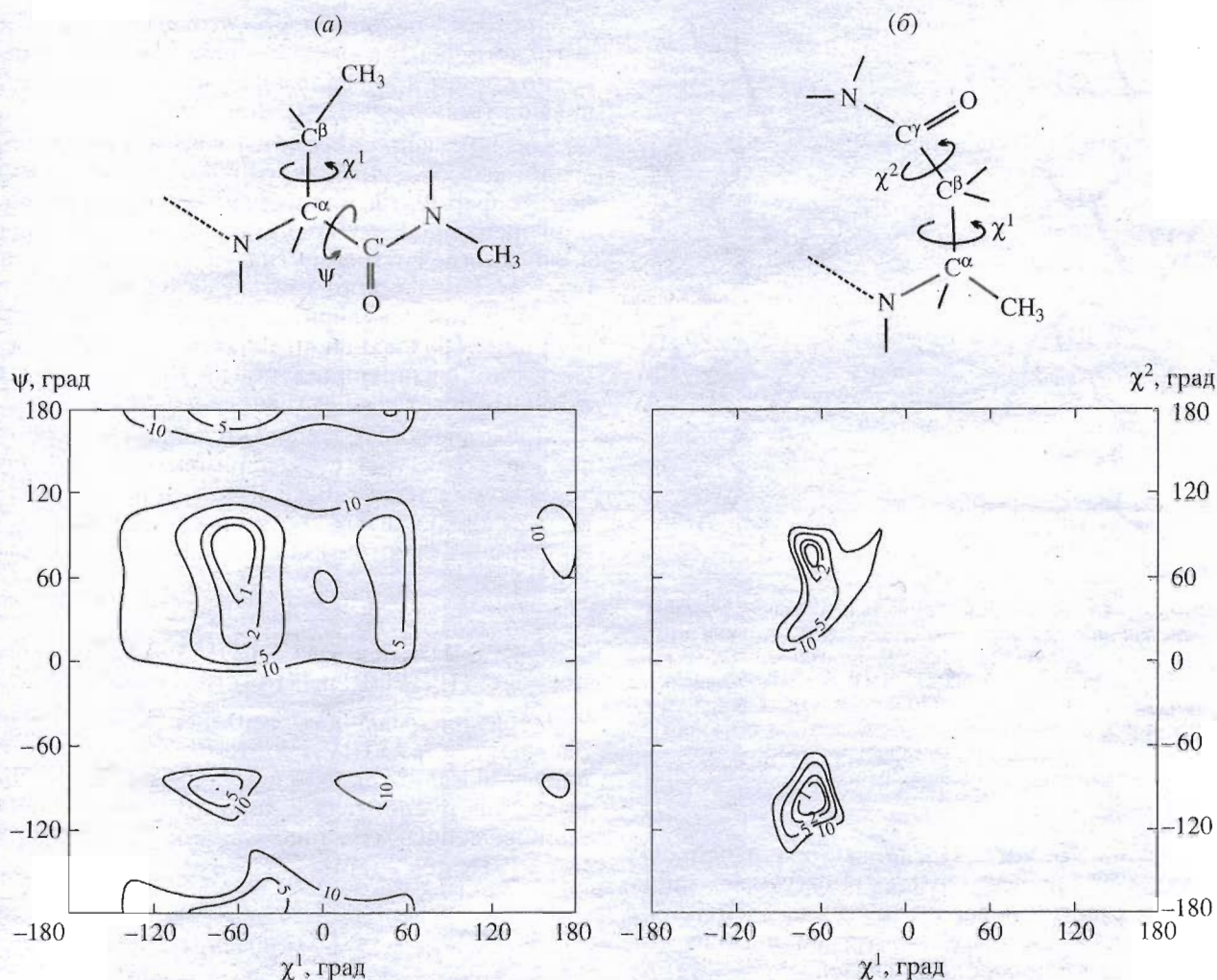


Рис. 1. Стадии последовательного наращивания цепи ингибитора JG-365, находящегося в активном центре протеиназы HIV-1. Исследование конформационных возможностей фрагментов Asn3: *a* – конформационная карта χ^1 – ψ первого фрагмента Asn3 (показан вверху рисунка); видны восемь областей низкой энергии, соответствующих разрешенным конформациям фрагмента; *b* – конформационная карта χ^1 – χ^2 второго фрагмента Asn3 (вверху), позволяющая определить значение $\chi^1 = -50^\circ$ и выбрать на карте χ^1 – ψ четыре начальных приближения для последующего наращивания цепи ингибитора.

Уже на этом этапе расчета выявилась дифференциация конформационных состояний, которая позволила выделить из большого числа рассмотренных сочетаний весьма ограниченный набор конформаций, обладающих низкой энергией. Многие ранее учитываемые варианты при наращивании цепи оказывались энергетически невыгодными главным образом из-за неблагоприятных стерических контактов и исключались из дальнейшего расчета.

Процесс поиска начальных оптимальных конформаций ингибитора иллюстрирует рис. 1. На рис. 1*a* представлена конформационная карта, отражающая зависимость энергии невалентных взаимодействий фрагмента Asn (показан на том же рисунке) от углов χ^1 , ψ . Как видно из этих

данных, он обладает большой конформационной свободой и имеет восемь предпочтительных ориентаций, соответствующих минимумам на конформационной карте. Аналогичная карта для другого фрагмента Asn3, подвижность которого определяется двугранными углами χ^1, χ^2 , показывает (рис. 1*b*), что в этом случае имеется единственное энергетически выгодное положение угла χ^1 и два положения угла χ^2 . Эта карта позволяет определиться не только с выбором угла χ^1 , но и сузить набор вариантов начальных приближений для угла ψ (рис. 1*a*).

Аналогичным образом, путем построения конформационных карт, наращивались основная и боковые цепи ингибитора при его нахождении в активном центре HIV-1 PR в направлении от ос-

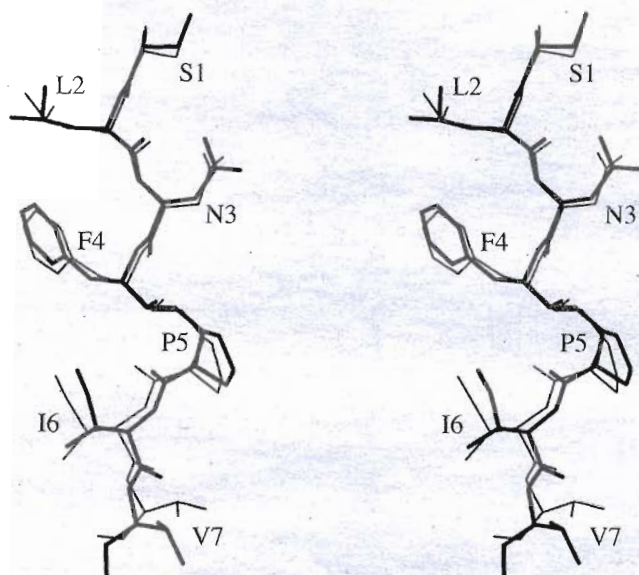


Рис. 2. Сопоставление априорного рассчитанной (жирная линия) и экспериментальной [8] (тонкая линия, по данным 7hvp) структуры ингибитора JG-365 в активном центре протеиназы HIV-1. Среднеквадратичное отклонение структур 0.82 Å. Отклонения на С-конце ингибитора могут быть связаны с низким разрешением опытной кристаллографической структуры (2.5 Å). Представлена стереопара.

татка Asn3 до Val7. После выбора начальных приближений во всех случаях проводилась минимизация энергии невалентных взаимодействий с учетом дисперсионных, электростатических взаимодействий и водородных связей.

Далее, наращивая пептидную цепь от атома N остатка Asn3 “в обратном направлении”, выяснили самые низкоэнергетические конформации фрагмента Ser1–Leu2. Таким образом был промоделирован весь ингибитор. Полученная низкоэнергетическая структура оптимизировалась с помощью программы Newton из программного пакета Tinker [12, 13] в стандартном силовом поле Amber-95 [14].

Окончательные результаты расчета фермент-ингибиторного комплекса вместе с экспериментальными данными [15] представлены на рис. 2. Сопоставление с экспериментом свидетельствует о хорошем совпадении результатов априорного теоретического анализа; среднеквадратичное отклонение атомов расчетной модели от опытной структуры составило 0.8 Å. При этом общая энергия ингибитора, рассчитанная в силовом поле Amber, составила –57.23 ккал/моль. Отклонения от опытных данных, заметные на N- и С-концах, объясняются плохим разрешением кристаллографической структуры (2.5 Å) [15]. Конформации всех остатков сорбированного гептапептида отвечают низкоэнергетическим состояниям свободных остатков, а молекула в целом – оптималь-

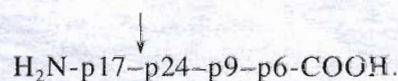
ной β-структуре ингибитора, которая для данного активного центра предоставляет максимальные возможности для реализации межмолекулярных невалентных взаимодействий.

Как показано ранее [5], развернутая конформация, которую ингибитор принимает в активном центре фермента, маловероятна для свободного олигопептида. Ее относительно высокая энергия в свободном состоянии (на 10 ккал/моль выше, чем у свернутых форм), объясняется малым вкладом внутримолекулярных взаимодействий, который при образовании комплекса восполняется за счет стабилизирующих контактов с аминокислотными остатками активного центра.

Практическое совпадение априорно рассчитанной структуры с экспериментальной свидетельствует о надежности метода и позволяет перейти к следующему этапу – расчету невалентного фермент-субстратного комплекса (комплекса Михаэлиса).

КОМПЛЕКС ПРОТЕИНАЗЫ HIV-1 С ПРИРОДНЫМ СУБСТРАТОМ

Последовательность гептапептидного субстрата протеиназы HIV-1 соответствует фрагменту вирусной полибелковой цепи Pr55gag, состоящей из белков нуклеотида и кора (p17, p24), а также белков, непосредственно связанных с провирусной мРНК (p9, p6) [4]:



Четыре аминокислотных остатка последовательности субстрата Ser1–Gln2–Asn3–Tyr4, предшествующие расщепляемой связи, принадлежат С-концевому участку белка p17, а три последующих, Pro5–Phe6–Val7, – N-концевому участку белка p24. От ингибитора JG-365 он отличается только наличием расщепляемой пептидной связи между остатками P₁ (Tyr4) и P₁' (Pro5), а также заменами двух остатков – Leu2 на Gln2 и Phe4 на Tyr4. Кроме того, субстрат имеет иную геометрию остатка Pro5, поскольку его атом азота не пирамидализован [4].

Предварительно проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что кристаллографическая структура нативного фермента [15] маловероятна для свободной молекулы. Как было нами показано [6], опущенное состояние прикрывающих активный центр β-шпилек (флепов), в котором они находятся в комплексе с ингибитором [9], энергетически более предпочтительно для свободной молекулы фермента даже в отсутствие лиганда в активном центре за счет выгодных внутримолекулярных контактов. Поэтому для моделирования невалентных комплексов было выбрано конформационное состояние протеи-

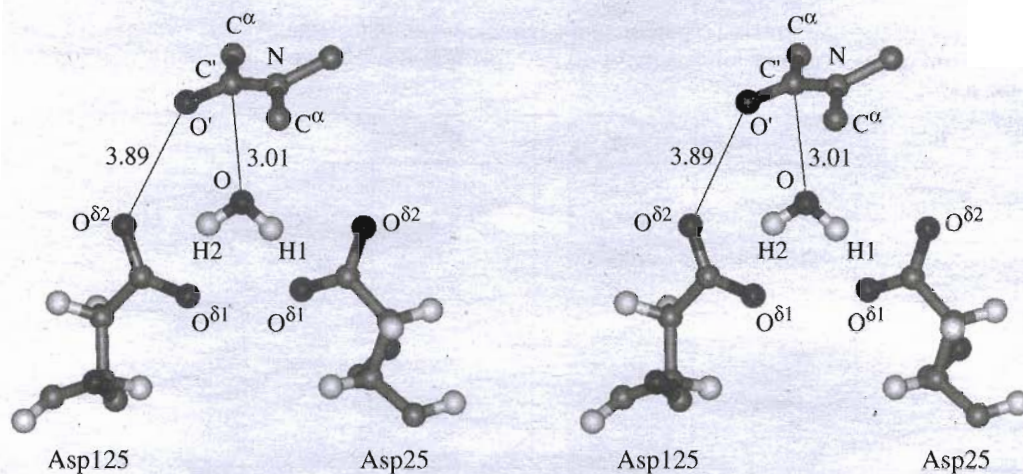


Рис. 3. HIV-1 PR: взаимное расположение расщепляемой пептидной группы субстрата, каталитически активных остатков Asp25, Asp125 и нуклеофильной молекулы воды. Указаны важнейшие расстояния (в Å). Представлена стереопара.

назы HIV-1, которое она имеет в фермент-ингибиторном комплексе.

В расчете не учитывали молекулу связанной воды, располагающуюся между каталитическими остатками Asp и, таким образом, не делали никаких предположений о возможной локализации атакующего нуклеофила.

В качестве исходной точки были выбраны координаты атома N^{α} остатка Asn3. Поиск конформации субстрата, как и в случае с ингибитором, осуществлялся методом поэтапного наращивания по направлению к С-концу. Однако после успешного встраивания остатков Asn3, Phe4 и Pro5 дальнейшее наращивание цепи оказалось невозможным. При добавлении атомов остатка Phe6 возникли стерические наталкивания на боковые и основные цепи остатков фермента Gly111, Asp113, Val116 и Ile122. Эта ситуация наиболее вероятно связана с тем, что реальное положение атома N^{α} остатка Asn3 при посадке субстрата в активном центре фермента заметно отличается от того, что было принято на основе данных ингибиторного комплекса, поскольку основная цепь ингибитора имеет дополнительное звено CH_2 . В связи с этим для посадки субстрата была избрана другая начальная точка – атом C' остатка Phe6. На этот раз наращивание цепи шло в обратную сторону – к N-концу, в направлении от Phe6 к Ser1. После успешного завершения процедуры был достроен и остаток Val7. Отбирая на каждом этапе наращивания основной и боковых цепей все возможные низкоэнергетические конформации, мы получили набор из трех низкоэнергетических структур. Эти варианты имеют идентичное расположение основной и боковых цепей остатков Asn3, Tyr4, Pro5, Phe6 и Val7 и отличаются лишь конформациями остатков Ser1 и Gln2.

В настоящее время отсутствуют доступные рентгеноструктурные данные о координатах молекул воды в структуре свободной HIV-1 PR. Выполненный нами расчет показал, что единственно возможная позиция для кислорода молекулы воды в радиусе 4 Å от карбонильного атома углерода расщепляемой связи находится в плоскости карбонильных групп активных аспаратов на расстоянии ~ 3 Å от атома C' расщепляемой пептидной группы. Она близка к положению молекулы связанной воды, обнаруженной в активном центре всех аспартильных протеиназ (W507 в ризопуспсине (2apr) [16], W355 в пепсине (4rep) [17], W2 в эндотиапепсине (4ape) [16] и т.д.).

Три конформации субстрата с учетом положения молекулы H_2O оптимизировались с помощью программы Newton [12] в силовом поле Amber-95. Координаты атомов субстратсвязывающего участка при оптимизации считались фиксированными, за исключением 24 а.о. флепов Lys45–Val56 и Lys145–Val156. В результате была получена единственно возможная конформация субстрата в активном центре HIV-1 PR (рис. 3). Разность энергий между самым низкоэнергетическим вариантом и следующим за ним составила ~ 20 ккал/моль.

Основная цепь природного субстрата протеиназы HIV-1 (так же, как ее ингибитора и лигандов ризопуспсина) принимает в активном центре полностью развернутую конформацию, которая предоставляет наилучшие условия для образования максимального числа стабилизирующих контактов в активном центре. Все остатки имеют отрицательные значения полной внутренней энергии, а их двугранные углы занимают на конформационных картах соответствующих монопептидов низкоэнергетические области (табл. 1).

Таким образом, эффективные стабилизирующие взаимодействия субстрата с ферментом не

Таблица 1. Геометрические параметры (град) и энергетические вклады (ккал/моль) отдельных аминокислотных остатков в общую энергию стабилизации априорно рассчитанной структуры природного субстрата в активном центре протеиназы HIV-1

	ω	ϕ	ψ	χ^1	χ^2	χ^3	ΔU , ккал/моль
Ser			162.1	-64.6			-0.05
Gln	-169.2	-136.7	150.6	-63.3	-68.1	110.9	-22.66
Asn	-163.8	-151.1	103.5	-67.0	-104.2		-28.06
Phe	-162.1	-109.8	45.1	-64.7	-63.9		-9.91
Pro	-171.4		96.5				-4.01
Ile	171.1	-73.7	124.5	-62.8	126.6		-6.76
Val	-178.3	-126.4	-0.1	-66.3			-7.58
$\Delta U_{\text{общ}}$							-73.69

приводят к возникновению каких-либо стерических напряжений или принудительных деформаций в его структуре. Расчет показал, что водородные связи, в которых участвуют основные и боковые цепи остатков субстрата в активном центре (табл. 2), способствуют стабилизации низкоэнергетической конформации, не внося никаких стерических искажений. Атомы H^{δ} Asn3 и O боковой цепи Thr4 также образуют между собой водородную связь длиной 2.15 Å. Кроме этого, посредством молекулы воды (W301 в нумерации комплекса 7hvp) кислород основной цепи Asn3 оказывается связанным и с остатками флепов Ile50 и Ile150. Расстояние от атомов HN этих ос-

татков до O воды составляет 2.10 и 2.14 Å, а от водорода молекулы воды до O' Asn3 – 1.79 Å.

Способность протеиназы HIV-1 расщеплять субстраты с остатком Pro в положении P₁ представляет уникальную возможность установить ориентацию расщепляемой связи в активном центре и сделать аргументированное предположение о механизме ферментативной реакции. В результате теоретического исследования невалентных комплексов другой аспартильной протеиназы – ризопуспесина, были получено две изоэнергетические конформации гидролизуемой пептидной группы, находящейся между остатками Lys4-Phe5 [1]. В первой из них карбонильный кислород расщепляемой связи располагается между активными аспартатами и вытесняет связанную молекулу воды (W507 в нумерации ризопуспесина [16]). Единственно возможное положение нуклеофильной молекулы воды в активном центре для этой ориентации расщепляемой связи показано на рис. 4а. Во второй возможной низкоэнергетической конформации комплекса связанная вода, находящаяся между активными аспартатами, не вытесняется и может осуществлять нуклеофильную атаку на карбонильный углерод. В этом случае карбонильный кислород расщепляемой связи направлен в сторону остатка Asp125 (рис. 4б).

В отличие от ризопуспесина, в HIV-1 PR возможно только одно положение расщепляемой связи, показанное на рис. 3. Ориентирующую роль остатка Pro5 иллюстрирует рис. 5. Пространственное расположение остатка Tyr4 однозначно определяется его боковой цепью, жестко фиксированной в кармане связывания; при этом положение расщепляемой связи задается вращением двугранного угла ψ Tyr4 и угла ω Pro5 (находящегося между Tyr4 и Pro5). Если исключить из расчета боковую цепь Pro (заменяв его на Gly), то конформационная карта ω (Pro5) – ψ (Tyr4) будет содержать два минимума (рис. 5а), при значении угла ϕ (Tyr4) приблизительно 15° и 150°. Положение карбонильного кислорода расщепляемой связи для

Таблица 2. Расчетные длины водородных связей, образованных остатками субстрата в активном центре протеиназы HIV-1

Субстрат		Фермент		Длина водородной связи, Å
остаток	атом	остаток	атом	
Ser1	H ^γ	Asp30	O ^{δ2}	2.73
	O'	Gly48	HN	2.54
Gln2	HN	Asp29	O ^{δ2}	2.09
	O'	Asp29	HN	1.97
Asn3	HN	Gly48	O'	1.98
	O'	W301*	H	1.79
	O ^{δ1}	Asp30	HN	2.73
	H ^δ	Tyr4**	O ^ε	2.15
Tyr4				
Pro5				
Ile6	HN	Gly127	O'	2.30
Val7	HN	Gly148	O'	2.57

* Связанная вода W301 (нумерация 7hvp) также образует водородные связи с остатками флепа: O(W301)–HN(Ile50) 2.10 Å, O(W301)–HN(Ile150) 2.14 Å.

** Tyr4 субстрата.

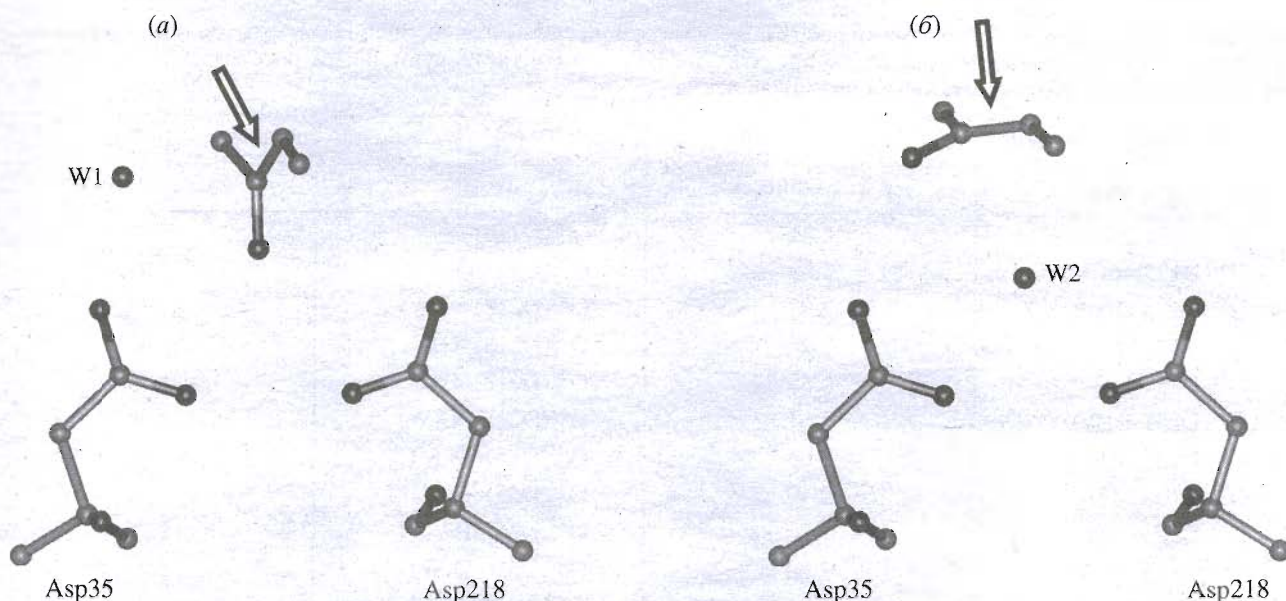


Рис. 4. Две низкоэнергетические конформации расщепляемой пептидной группы в активном центре ризопупелсина. Расщепляемая связь отмечена стрелкой. Роль нуклеофила выполняет молекула воды W1 (а) или молекула воды W2 (б).

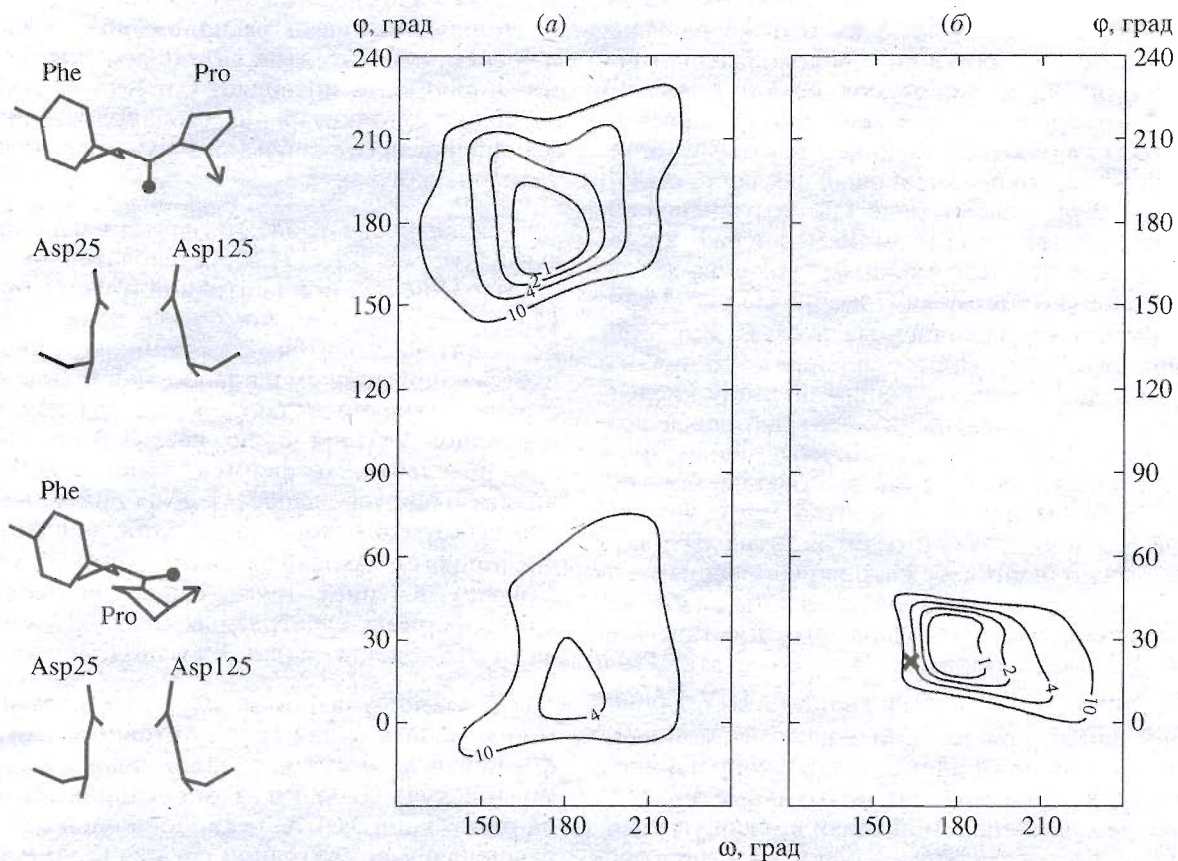


Рис. 5. Конформационные карты ω (Pro5) – ψ (Phe4) фрагмента природного субстрата протеиназы HIV-1. Слева показано схематическое расположение карбонильного кислорода (темный кружок) расщепляемой пептидной группы относительно каталитически активных остатков Asp25, Asp125 активного центра фермента. а – расчет в отсутствие боковой цепи остатка Pro5; карта содержит два минимума; б – при учете боковой цепи Pro5 из двух минимумов карты (а) остается только нижний; на конформационной карте значения углов в полной рассчитанной структуре субстрата отмечены крестиком.

Таблица 3. Расстояния между атомами расщепляемой группы субстрата, активных аспаргатов и молекулы воды в рассчитанном невалентном комплексе протеиназы HIV-1 и соответствующие им расстояния в невалентном комплексе аспартильной протеиназы ризопусепсина

Протеиназа HIV-1		Ризопусепсин	
атомы	расстояние, Å	атомы	расстояние, Å
O ^{δ2} (D25)-N	4.31	O ^{δ2} (D218)-N	4.56
O ^{δ2} (D125)-O'	3.89	O ^{δ2} (D35)-O'	3.05
O ^{δ2} (D25)-O(W)	2.98	O ^{δ2} (D218)-O(W)	3.15
O ^{δ2} (D25)-H1	2.24	O ^{δ2} (D218)-H1	2.48
O ^{δ1} (D25)-H1	1.69	O ^{δ1} (D218)-H1	1.70
O ^{δ1} (D25)-O(W)	2.61	O ^{δ1} (D218)-O(W)	2.66
O ^{δ2} (D125)-O(W)	2.96	O ^{δ2} (D35)-O(W)	3.10
O ^{δ2} (D125)-H2	2.10	O ^{δ2} (D35)-H2	2.21
O ^{δ1} (D125)-H2	1.80	O ^{δ1} (D35)-H2	1.78
O ^{δ1} (D125)-O(W)	2.60	O ^{δ1} (D35)-O(W)	2.59
O(W)-C'	3.01	O(W)-C'	2.90
H ¹ -N	3.95	H ¹ -N	3.68
H ² -O'	3.30	H ² -O'	3.12

обоих минимумов показано на том же рисунке. При расчете конформации с боковой цепью Pго (рис. 5б) из двух минимумов остается только нижний, который при этом несколько смещается. В положении, соответствующем верхнему минимуму на рис. 5а, пирролидиновый цикл остатка Pго встречает серьезные стерические затруднения из-за взаимодействия с остатком Pe50 флепа и, кроме этого, становится невозможным наращивание основной цепи ингибитора к С-концу. На рис. 5 также показано направление связи C^α-C' Pго (обозначено стрелкой). Присоединение к Pго любого остатка ведет к наталкиваниям на аминокислотные остатки "дна" активного центра (прежде всего на Gly111 [8]), вне зависимости от значений угла ψ Pго и двугранных углов присоединяемого остатка. Если бы на месте остатка Pго находился другой аминокислотный остаток, этих наталкиваний можно было избежать варьированием его двугранного угла φ, однако угол φ остатка Pго жестко фиксирован благодаря его циклической структуре. Таким образом, наличие остатка Pго в положении P₁' субстрата протеиназы HIV-1 однозначно задает ориентацию расщепляемой пептидной связи и позволяет сделать выбор в пользу одного из двух возможных низкоэнергетических положений расщепляемой связи в ризопусепсине. Поскольку структура активного центра у обеих протеиназ практически одинакова, не вызывает сомнений, что их невалентные комплексы должны иметь геометрически одну и ту же продуктивную ориентацию расщепляемой связи субстрата относительно каталитически активных остатков аспарагиновой кислоты.

Полученное нами расположение расщепляемой связи относительно каталитически активных групп фермента позволяет оценить полученный комплекс с точки зрения его продуктивности в отношении протекания последующих стадий каталитического акта.

Как видно из табл. 1, угол ω расщепляемой связи составляет 171.4°, следовательно, плоскость расщепляемой пептидной группы в рассчитанном невалентном комплексе практически не искажена и находится в состоянии, которое не является напряженным и в свободной молекуле субстрата. Сходное расположение расщепляемой пептидной группы было независимо получено для невалентного фермент-субстратного комплекса ризопусепсина [1]. Карбонильный углерод субстрата находится от ближайшего к нему кислорода O^{δ1} Asp125 на расстоянии 3.89 Å (3.05 Å в ризопусепсине). Другие существенные расстояния в фермент-субстратных комплексах протеиназы HIV-1 даны на рис. 3 и в табл. 3.

Связующим звеном между субстратом и системой карбоксильных групп активных аспаргатов фермента является располагающаяся между ними молекула воды. Ее атом кислорода находится на расстоянии 3.01 Å от карбонильного углерода расщепляемой пептидной группы (2.90 Å в ризопусепсине), а водородные атомы H1 и H2 – на расстояниях 1.69–2.24 Å от карбоксильных атомов кислорода Asp25 и Asp125, образуя с ними сильные водородные связи. Рассмотрим теперь полученный нами невалентный фермент-субстратный комплекс с точки зрения его продуктив-

ности для дальнейших стадий каталитического акта аспартильных протеиназ.

Трудами многих исследователей установлено ([18] и ссылки в этой работе), что катализ аспартильных протеиназ протекает по общесловному – общекислотному механизму, что предполагает присутствие в системе трех компонентов – нуклеофила, общего основания и общей кислоты. В настоящее время предложен ряд гипотез, детально описывающих невалентные фермент-субстратные комплексы и стадии каталитического акта аспартильных протеиназ [9, 19–26]. Более подробно они рассматриваются в первом сообщении данной серии [2] и работе, посвященной невалентным комплексам ризопусепсина [1]. Стереохимические модели были предложены на основании кристаллографических структур комплексов аспартильных протеиназ с субстратоподобными ингибиторами и имеют ряд общих черт, хотя различаются в деталях. Многие модели предполагают необходимость принудительной деформации гидролизующей группы субстрата в невалентном комплексе как движущей силы ферментативного катализа. Этот вывод – прямое следствие способа построения гипотетической модели субстрата, когда в качестве исходных используются координаты фрагментов ингибитора, имитирующих невалентный комплекс, а тетраэдрическое промежуточное состояние. Функцию нуклеофила все без исключения авторы приписывают молекуле связанной воды, находящейся между карбоксильными группами активных аспаратов. Общим основанием, принимающим на себя протон во время нуклеофильной атаки, считается остаток Asp215 в нумерации пепсина (у ризопусепсина ему соответствует Asp218, а в рассчитанном невалентном комплексе HIV-1 PR – Asp25). Существует мнение, что этот остаток осуществляет протонирование уходящей аминогруппы. Все схемы также предполагают электрофильную активацию карбонильной группы субстрата протоном, который помещается на внешний кислород Asp32 (Asp35 в ризопусепсине, Asp125 в HIV-1 PR). Водородная связь между этим протоном и кислородом карбонильной группы предположительно способствует поляризации последнего и тем самым уменьшает л-порядок пептидной связи.

Результаты проделанного нами расчета невалентного фермент-субстратного комплекса не противоречат описанной выше стереохимической схеме катализа. Однако на основе полученных геометрических параметров может быть предложен другой механизм каталитического акта, который дает непротиворечивое объяснение известным экспериментальным данным. В основе предлагаемого механизма лежит предположение о том, что карбоксильные группы активных аспаратов находятся в ионизированном состоянии как в нативном ферменте, так и на стадии об-

разования невалентного фермент-субстратного комплекса. В пользу этого свидетельствуют следующие экспериментальные факты. Во-первых, согласно исследованиям методами ЯМР синтетической HIV-1 PR с ^{13}C -мечеными атомами Asp25 и 125, состояние этих остатков в нативном ферменте полностью соответствует их ионизированному состоянию в коротких пептидах при тех же условиях. Во-вторых, описанный в работе [27] мутант HIV-1 PR имеет максимум каталитической активности при pH 8.5, а при pH 11 сохраняет 60% своей активности. Все стереохимические модели, привлекающие для объяснения механизма катализа изначально протонированный аспарат, не предполагают в то же время каких-либо убедительных объяснений существенного повышения его pK_a , необходимого даже при более низких значениях pH среды.

Возникает вопрос, возможно ли протекание каталитического акта при отсутствии протона в карбоксильных группах аспаратов на начальных стадиях каталитического акта? На основании полученных результатов мы считаем, что на него можно дать положительный ответ, более того, именно такое состояние активных групп представляется нам наиболее вероятным. На рис. 3 и 6а в расчетном невалентном комплексе протоны молекулы воды располагаются симметрично относительно карбоксильных групп Asp25 и Asp125. Такое состояние является наиболее низкоэнергетическим в использованном нами силовом поле при предположении, что обе карбоксильные группы ионизированы. В этом случае вода образует с остатками Asp25 и Asp125 четыре сильных водородных связи (см. табл. 2), энергия которых оценивается нами в гидрофобном окружении в 10–15 ккал/моль. Необходимо отметить, что молекула воды не встречает значительных энергетических барьеров при вращении вокруг всех трех пространственных осей и может, в принципе, иметь другую ориентацию. Если предположить, что Asp125 протонирован, наиболее низкоэнергетической становится другая ориентация молекулы воды, при которой один из ее атомов водорода направлен “вниз” и находится на одинаковых расстояниях от $\text{O}^{\delta 1}$ Asp25 и $\text{O}^{\delta 1}$ Asp125.

Как известно [18], нуклеофильность молекулы воды, даже поляризованной водородными связями, недостаточна для эффективной атаки резонансно-стабилизированной пептидной группы. В то же время, ее ионизация путем переноса протона на карбоксилат-ион одного из Asp – термодинамически невыгодный процесс, который может протекать лишь с очень низкой скоростью ([16] и ссылки в этой работе). В связи с этим необходимо, чтобы отрыв протона от молекулы воды и нуклеофильная атака происходили одновременно, в едином элементарном акте.

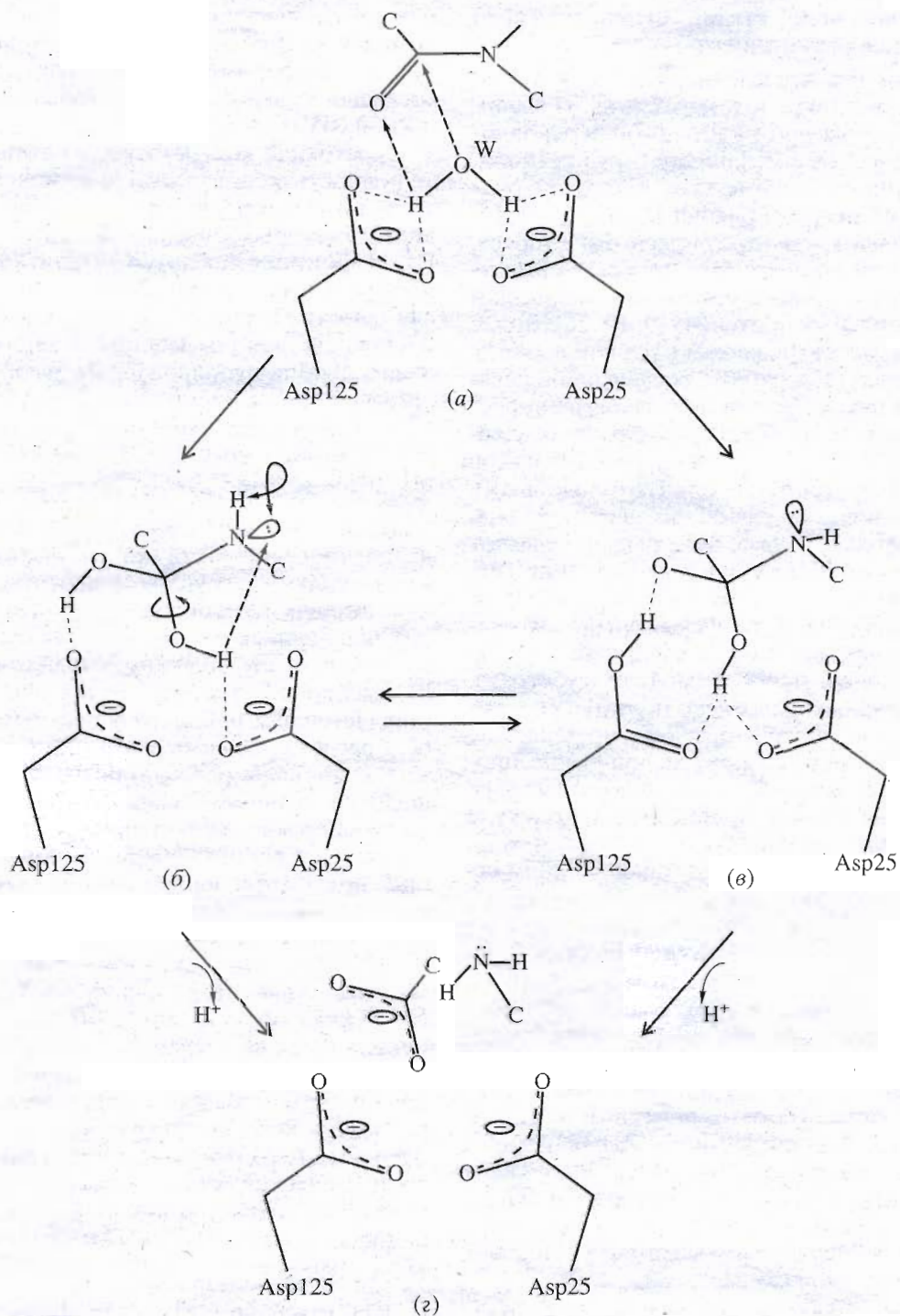


Рис. 6. Предложенная на основе моделирования невалентных фермент-субстратных комплексов схема каталитического действия аспартильных протеиназ. *a* – нуклеофильная атака с одновременным переносом протона молекулы воды на кислород гидролизуемой связи субстрата; *б*, *в* – образование тетраэдрического промежуточного соединения с возможностью переноса протона на Asp125; *г* – протонирование уходящей группы и освобождение продуктов реакции.

Как видно из рис. 3, атом С' субстрата находится на расстоянии 3.01 Å от атома О воды. Взаимодействие неподеленных электронных пар кислорода воды с π-электронами атома С', способствуя депротонированию H₂O, ведет к разрыхлению

связи N–С' и одновременно способствует увеличению парциального отрицательного заряда на карбонильном кислороде субстрата.

Такое перераспределение электронной плотности приводит к росту основности О' субстрата

и, следовательно, увеличивает его способность акцептировать протон. Источником протона может служить атом водорода молекулы воды, находящейся между карбоксильными группами аспартатов. По нашим оценкам, расстояние между атомами O' субстрата и H молекулы воды по мере развития атаки может уменьшаться, что будет способствовать увеличению ее нуклеофильности. За счет происходящих согласованных перестроек электронных оболочек взаимодействующих атомных групп создаются все условия для отрыва протона молекулы воды и акцептирования его либо атомом кислорода субстрата, либо боковой цепью Asp125. В любом случае атака завершается образованием тетраэдрического аддукта, две возможные резонансные формы которого показаны на рис. 6б, в. Каталитическая реакция не может завершиться без протонирования атома азота гидролизуемой пептидной группы. В рассмотренной ситуации ближайшим донором протона может служить HO-группа промежуточного соединения, находящаяся между Asp25 и Asp125 (рис. 6б, в). По предварительным оценкам, расстояние между ее протоном и атомом азота уходящей группы может составлять 2.3–2.4 Å.

Перечисленные атомные группировки вовлечены в единую, согласованную в отношении своих внутренних связей систему с положительной обратной связью. Ее назначение состоит в трансформации невалентных взаимодействий в цепь сопряженных химических превращений: депротонирование атома O воды, образование связи O–C(O), ослабление N–C(O), переход от двойной к одинарной связи C–O и переход sp^2 -гибридизации атомов N и C(O) к sp^3 .

Возникает также вопрос, какую роль в каталитическом механизме играет остаток Asp25. Мы считаем, что его функция сводится к двум основным моментам: во-первых, он участвует в поляризации молекулы воды, что необходимо для эффективной нуклеофильной атаки. Во-вторых, остаток Asp25 может облегчать перенос протона с одного из кислородов интермедиата на уходящую аминогруппу.

Есть все основания полагать, что в полученном нами невалентном комплексе самое энергетически выгодное расположение субстрата активного центра протеиназы HIV-1 с неискаженной пептидной группой является в то же время каталитически активным. Следовательно, при создании условий, необходимых для протекания каталитического акта нет нужды в принудительной деформации расщепляемой связи.

Инициация реакций может произойти за счет синфазных нормальных колебаний макромолекулярного комплекса. Возникшая в результате случайных необратимых флуктуаций первая би-

фуркационная точка является исходной для дальнейшего развития неравновесного процесса [2].

К описанному комплексу сопряженных реакций неприменимо понятие "энергии активации", которая учитывается при расчете неферментативных реакций. Нет никаких физических оснований для введения подобного термина равновесной термодинамики в описание механизма нелинейного неравновесного и, следовательно, детерминированного процесса. Кроме того, образование такой замкнутой системы, которая, по сути, сводит реакцию протеолиза к мономолекулярной, практически невероятно в неферментативных условиях.

Полученная расчетная конформация невалентного комплекса позволяет перейти к следующему этапу – рассмотрению методами квантовой химии чисто химической стадии катализа с участием весьма ограниченного числа взаимодействующих атомных групп. Итогом исследования явится априорно рассчитанный с помощью классического и полуэмпирического методов механизм каталитического действия фермента в виде непрерывной реакции, состоящей из альтернирующих конформационных и электронных стадий фермент-субстратных взаимодействий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кашипаров И.В., Попов М.Е., Руми Л. Д., Попов Е.М. // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 747–762.
2. Попов Е.М., Кашипаров И.В., Попов М.Е. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 323–338
3. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
4. Попов М.Е., Кашипаров И.В., Попов Е.М. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 510–522.
5. Попов М.Е., Кашипаров И.В., Руми Л.Д., Попов Е.М. // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 418–422.
6. Кашипаров И.В., Попов Е.М., Попов М.Е., Руми Л.Д. // Биоорган. химия, 1999. Т. 25. С. 598–603.
7. Кашипаров И.В., Попов М.Е., Руми Л.Д., Попов Е.М. // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 423–434.
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. 8809.
9. 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.
10. Smith R., Brereton I.M., Chai R.Y., Kent S. B. // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. P. 946–950
11. Popov E.M. // Int. J. Quant. Chem. 1979. V. 16. P. 707–737.
12. Kong Y., Ponder J.W. // J. Chem. Phys. 1997. V. 107. P. 481–492.
13. Dudek M.J., Ponder J.W. // J. Comput. Chem. 1995. V. 16. P. 791–816.

14. Pearlman D.A., Case D.A., Caldwell J.W., Ross W.S., Cheatham T.E., DeBolt S., Ferguson D., Seibel G., Kollman P. // *Comp. Phys. Commun.* 1995. V. 91. P. 1–41.
15. Spinelli S., Liu Q.Z., Alzari P.M., Hirel P.H., Poljak R.J. // *Biochimie*. 1991. V. 73. P. 1391–1396.
16. 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.
17. Sielecki A.R., Fedorov A.A., Boodhoo A., Andreeva N.S., James M.N. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 214. P. 143–170.
18. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991.
19. Hyland L.J., Tomaszek T.A.J., Meek T.D. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 8454–8463.
20. Hyland L.J., Tomaszek T.A.J., Roberts G.D., Carr S.A., Magaard V.W., Bryan H.L., Fakhoury S.A., Moore M.L., Minnich M.D., Culp J.S. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 8441–8453.
21. James M.N., Sielecki A.R. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 3701–3713.
22. James M.N., Sielecki A.R., Hayakawa K., Gelb M.H. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 3872–3886.
23. 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.
24. Pearl L.H. // *FEBS Lett.* 1987. V. 214. P. 8–12.
25. Silva A.M., Cachau R.E., Sham H.L., Erickson J.W. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 255. P. 321–346.
26. Veerapandian B., Cooper J.B., Sali A., Blundell T.L., Rosati R.L., Dominy B.W., Damon D.B., Hoover D.J. // *Protein Sci.* 1992. V. 1. P. 322–328.
27. Dergousova N.I., Leonova Yu.F., Zinchenko A.A., Rumsh L.D., Andreeva N.S. // *Protein and Peptide Letters*. 1997. V. 4. P. 321–328.

Mechanism of Action of Aspartyl Proteases.

VII. Noncovalent Complexes of HIV-1 Aspartic Protease with Substrate and Substrate-like Inhibitor

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, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

A computer model of a noncovalent complex of HIV-1 aspartyl protease with substrate-like inhibitor JG-365 was *a priori* constructed by using the approaches of theoretical conformational analysis and molecular mechanics. The root mean square deviation of the calculated conformation of the inhibitor from the X-ray diffraction analysis data was 0.87 Å.

These results enabled the *a priori* calculation of the structure of noncovalent complex of HIV-1 protease with a hexapeptide fragment of its native specific substrate Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val. The only possible orientation of the cleavable peptide bond in this and the nucleophilic water molecule relative to the catalytically active Asp residues of the enzyme (Asp25 and Asp125) was found that provides for the chemical transformation of the substrate to a tetrahedral intermediate. An action mechanism of enzymes of this class was proposed on the basis of the analysis of calculated distances. We showed that neither steric distortion of the cleavable bond nor the formation of unfavorable contacts in molecules of the enzymes and their substrates accompany the optimum orientation of substrate molecules at the active sites of HIV-1 aspartyl proteases and rhizopuspepsin.

Key words: catalysis, aspartyl proteases, HIV-1 protease, computer modeling, catalytic mechanism

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