



КАК ОСОБЕННОСТИ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ АСПАРТАТНЫХ ПРОТЕИНАЗ ОПРЕДЕЛЯЮТ ИХ СВОЙСТВА

© 2003 г. Н. С. Андреева

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117991, Москва, ул. Вавилова, 34
Поступила в редакцию 10.10.2002 г. Принята к печати 21.11.2002 г.

Дан краткий обзор особенностей взаимодействия некоторых аминокислотных остатков в молекулах аспартатных протеиназ как высших организмов, так и ретровирусов, которые определяют их важные свойства – аномально низкую изоэлектрическую точку пепсина и его стабильность при рН, близком к единице, дано объяснение, каким образом при различных значениях рН сохраняется необходимое для активности заряженное состояние одного активного карбоксила и протонированное состояние другого у протеиназ высших организмов, и показано, как такие состояния могут индуцироваться в ретровирусных протеиназах.

Ключевые слова: активный центр; аспартатные протеиназы; пепсиноподобные ферменты; ретровирусные протеиназы; трехмерные структуры.

Как известно, активный центр ферментов занимает очень небольшую часть трехмерной структуры их молекул, и роль оставшейся части, многократно превышающей по размерам активный центр, была предметом многих работ и дискуссий самого общего плана безотносительно к конкретным ферментам. В то же время попытка найти структурные основы свойств и функций конкретных ферментов неизбежно приводит к открытию роли групп взаимодействующих аминокислотных остатков, порождающих эти свойства. Чем шире спектр изучаемых свойств, тем больше групп, предназначение которых в трехмерной структуре удастся объяснить. Выявление особенностей взаимодействия аминокислотных остатков в молекулярной структуре ферментов, порождающих всю совокупность их свойств, – основная задача рентгеноструктурных исследований этих биомолекул. В настоящее время она отодвинута на второй план исследованиями прикладного характера, позволяющими использовать рентгеноструктурные данные для поиска эффективных ингибиторов ферментов, участвующих в патологических процессах. Основной акцент в этих работах делается на описании структурных особенностей связывания субстрата.

Здесь мы рассмотрим другой вопрос, связанный с попыткой понять, каким образом конкретные особенности трехмерной структуры аспартатных протеиназ определяют их свойства. Со временем список этих особенностей будет расширяться, так как охватить сразу все потенции сложной трехмерной структуры белка невозможно. В данной работе мы проанализируем лишь некоторые наиболее важные из них.

Попытка расширить представление о роли отдельных фрагментов молекулярной структуры в формировании свойств ферментов приводит к необходимости сравнительного анализа трехмерных структур ферментов одного класса, обладаю-

щих разными свойствами, и привлечения данных белковой инженерии. В этом отношении аспартатные протеиназы оказываются удобными объектами, так как к настоящему времени накоплен богатейший экспериментальный материал о трехмерных структурах этих ферментов, включая ретровирусные протеиназы.

Остановимся на трех выполненных нами исследованиях этого плана. Одной из первых работ по изучению структурных основ особых свойств аспартатных протеиназ была наша работа по выявлению групп, ответственных за низкую изоэлектрическую точку пепсина, обуславливающих наличие отрицательного заряда у молекул пепсина при рН 1 [1, 2] и их стабильность в таких экстремальных условиях. Оказалось, что остатки нескольких аспарагиновых кислот молекулы расположены во внутренней их части и окружены донорами протона, резко понижающими их рК. Все положительно заряженные группы молекулы, а их всего пять, нейтрализованы благодаря особому взаимному их расположению с карбоксильными группами. На рис. 1 приведен один из примеров такого расположения, когда гуанидиновая группа остатка Arg315 и карбоксильная группа Asp138 расположены в стык, образуя за счет водородных связей замкнутую систему. Такая система нейтральна в широком диапазоне рН и, образуясь при свертывании молекулы зимогена, сохраняется при переходе его в активный фермент. Простой подсчет показывает, что суммарный заряд молекулы при низком рН является очень небольшим, но отрицательным. Отрицательно заряженные группы располагаются далеко друг от друга и их взаимодействие не может привести к дестабилизации молекулярной структуры. Таким образом, стабильность молекулы и ее отрицательный заряд при экстремально низких значениях рН находят простое объяснение в особом взаимном расположении ее карбоксильных групп и основных остатков. Небольшой отрицательный заряд моле-

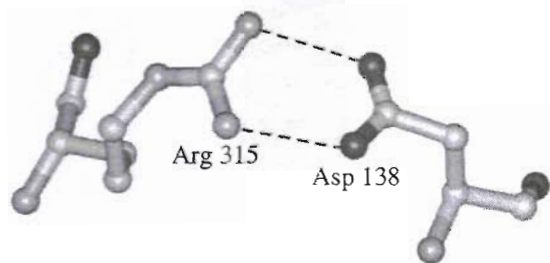


Рис. 1. Пример взаимного расположения заряженных аминокислотных остатков в молекуле пепсина – ионная пара Asp138 и Arg315. Водородные связи между этими остатками образуют замкнутую систему, которая стабильна в широком диапазоне значений pH [2].

кулы пепсина важен для формирования комплексов фермента с денатурированными и положительно заряженными в кислой среде молекулами субстрата.

Далее потребовалось объяснить, каким образом активный центр аспартатных протеиназ высших организмов, имеющий идентичную у всех представителей этого класса трехмерную структуру, может эффективно функционировать и при pH 1–2 (пепсин), и при pH 7–7.5 (ренин). Сравнение всех известных к настоящему времени трехмерных структур аспартатных протеиназ высших организмов и их комплексов с ингибиторами (всего 82 трехмерные структуры, координаты которых депонированы в международном банке PDB к июню 2001 г.) позволило понять структурные основы этой особенности ферментов.

Как было показано в свое время В.К. Антоновым и его коллегами, аспартатные протеиназы функционируют по принципу общего основного катализа [3]. Разработанный на основе данных о координатах атомов активного центра и координат атомов ингибиторов, имитирующих связанный в активном центре субстрат, стереохимический механизм активности этих ферментов требует, чтобы один из остатков активных аспарагиновых кислот был бы обязательно заряжен, а второй нейтрализован [4]. В проведенных нами сравнительных исследованиях [5] было показано, каким образом взаимодействие внешних кислородов активных карбоксилатов с аминокислотными остатками, окружающими активный центр этих ферментов, обеспечивает сохранение отрицательного заряда у одного из них и протонированное состояние у другого независимо от pH. Заряд на одном из карбоксилатов (Asp215) экранирован от растворителя взаимодействием с активной молекулой воды, расположенной между карбоксильными группами, и с гидроксильной группой остатка Thr218, которая после активации зимогена приобретает ориентацию, приводящую к экранированию этого карбоксила за счет образования дополнительной водородной связи. Расположение активной молекулы воды и близлежащего остатка серина Ser35 по отношению ко второму активному карбоксилу Asp32 в свободных фермен-

тах, функционирующих в кислой среде, не способствует такому его экранированию, и этот остаток оказывается протонированным (рис. 2). В ферментах, функционирующих в нейтральной среде, мы имеем обратную картину – карбоксил остатка Asp215, который должен быть заряжен, не требует для этого экранирования, так как его заряженное состояние естественно для нейтральной среды. Он действительно не экранирован, так как Thr218 либо заменен на аланин, либо его (или заменяющего его остатка серина) гидроксил повернут в противоположную сторону от активного карбоксила. Таким образом, этот карбоксил оказывается заряженным, как и любой другой при pH 7. В то же время в этих условиях второй карбоксил Asp32 экранирован от растворителя за счет очень короткой водородной связи с Ser35, в которой водород поделен между атомами O^γ Ser35 и O^δ Asp32.

В этой же работе [5] была выявлена роль второй, обнаруженной нами ранее, молекулы воды W2, которая участвует в формировании непрерывной цепочки водородных связей, замыкающихся на активных карбоксилатах Trp39-Tyr75-W2-Ser35-Asp32. Эта цепочка передает сигнал в активный центр о связывании субстрата и способствует одномоментному увеличению кислотности Asp32, что важно для развития каталитической реакции.

Такая система регуляции характерна для аспартатных протеиназ высших организмов, функционирующих в различных органах живого организма при различных значениях pH. Способность ферментов одного определенного типа с активным центром, построенным по единому плану, функционировать в широком диапазоне значений pH является результатом их эволюционной адаптации.

В ретровирусных протеиназах, условия функционирования которых в живых организмах ограничены сравнительно узким интервалом pH вблизи нейтрального значения, подобные взаимодействия не обнаружены. Внешние кислороды активных карбоксилатов в ретровирусных ферментах, помимо активной молекулы воды, имеют контакт только с растворителем. Таким образом, наличие или отсутствие заряда на активных карбоксильных группах свободных молекул ретровирусных ферментов определяется только величиной pH. Так как они функционируют при значениях pH, близких к нейтральному, казалось бы, что в свободных ферментах оба активных карбоксила, неэкранированных от растворителя, должны быть заряжены. Это согласуется с наличием собственной симметрии у молекул ретровирусных ферментов. Тогда возникает вопрос, как две заряженные карбоксильные группы могут располагаться так близко друг от друга, как это показывает рентгеноструктурный анализ [6]? Каким образом функционируют эти ферменты, как создается различная степень ионизации активных карбоксилатов, необходимая для катализа?

Частичный ответ на эти вопросы был получен в результате квантово-механического анализа воз-

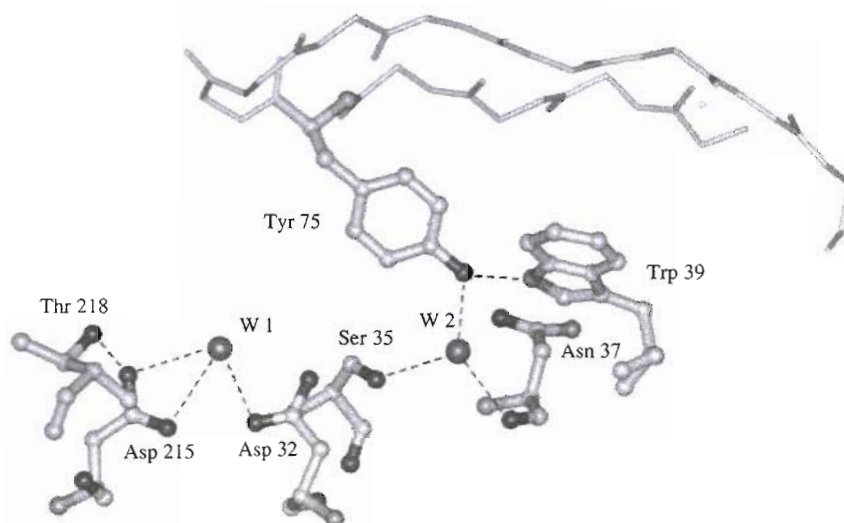


Рис. 2. Система взаимодействий активных карбоксильных групп в аспартатных протеиназах высших организмов. Водородная связь Thr218 с внешним кислородом карбоксила Asp215 и молекула воды W1 защищают этот карбоксил от протонирования в кислой среде. Карбоксил остатка Asp32 такой защиты не имеет и остается протонированным. Для высших организмов характерно наличие консервативной системы взаимодействующих групп, замыкающихся на активных карбоксилах Thr218-Asp215-Trp39-Tyr75-W2-Ser35-Asp32, которая способствует развитию каталитической реакции [5].

можных состояний активных карбоксильных групп на базе данных о координатах их атомов [7]. Оказалось, что система, состоящая из двух карбоксилатов и молекулы воды, находящейся между их внешними кислородами, будет стабильной в том случае, если между их внутренними кислородами, на середине расстояния между ними, которое равно длине водородной связи, будет находиться протон (рис. 3). Водородная связь между этими кислородами оказалась замечательной тем, что энергетический барьер перехода протона от одного кислорода к другому оказался очень низким. Она была названа LBHB-связью (Low Barrier Hydrogen Bond) и протон, поделенный между карбоксилатами, LBHB-протоном [7]. Этот результат согласуется с собственной симметрией молекул ретровирусных протеиназ, в то же время он показывает, что малейшие отклонения от этой симметрии могут приводить к переходу протона к одному из кислородов.

Внутренние кислороды активных карбоксильных групп имеют консервативную водородную связь с NH-группами остатков глицина, расположенных в “активных” сегментах Asp-Thr-Gly обоих мономеров. Оказывается, поляризация пептидных групп Thr-Gly очень сильно влияет на электроотрицательность активных карбоксилатов [6].

Мы попытались проследить, как меняется эта поляризация при связывании субстрата и сохраняется ли она одинаковой для обоих мономеров [6]. Сравнительный анализ трехмерных структур ретровирусных протеиназ и их комплексов с ингибиторами, а также протеиназ высших организмов позволил выявить в этом плане одну интересную особенность – пептидные группы Thr-Gly всегда поляризованы за счет взаимодействий их карбонильных кислородов либо с аминокислотными

остатками, являющимися донорами протонов, либо за счет взаимодействий с молекулами воды. Часть из них является консервативной для всего класса аспартатных протеиназ. В ретровирусных протеиназах молекулы воды, образующие водородные связи с карбонильными кислородами остатков треонина, вовлечены в довольно длинные цепочки взаимодействий (рис. 4), которые замыкаются на группы, участвующие в связывании субстрата. Асимметрия пептидной цепи субстрата вносит “разность” в структуру таких цепочек в разных мономерах. Как может повлиять такая разность на различие поляризации пептидных групп Thr-Gly разных мономеров могут показать только специальные расчеты. Если она действительно вызывает различие в поляризации указанных пептидных групп, то LBHB-протон будет переходить

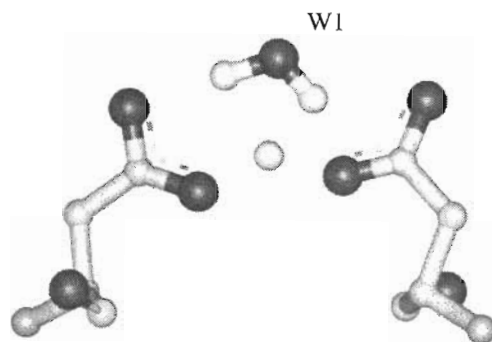


Рис. 3. Каталитический центр аспартатных протеиназ. Внешние кислороды активных аспартатов образуют водородные связи с консервативной молекулой воды W1, между внутренними кислородами в ретровирусных ферментах находится протон, который легко переходит на один из кислородов при нарушении собственной симметрии этих ферментов при связывании субстрата [7].

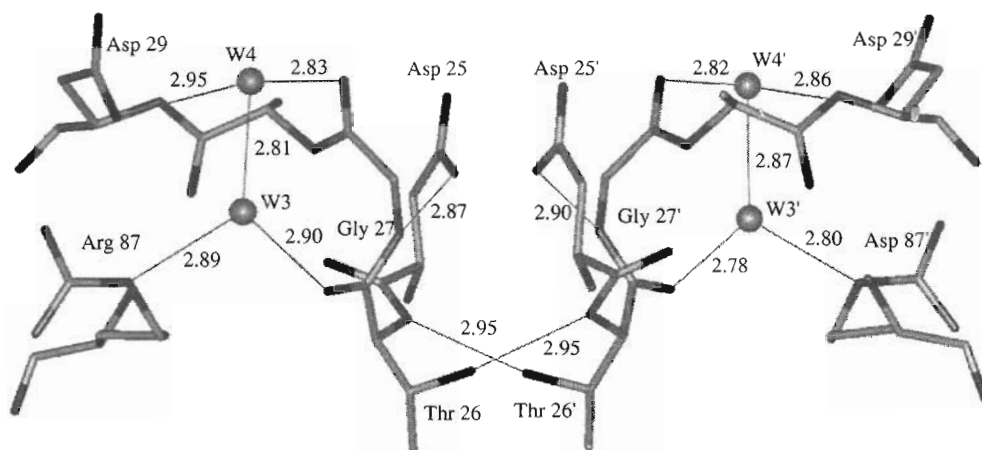


Рис. 4. Система взаимодействий внутренних кислородов активных карбоксиллов в ретровирусных протеиназах. Поляризация пептидных групп Thr-Gly, которые связаны водородными связями с активными карбоксиллами, оказывает существенное влияние на их свойства. Эта поляризация осуществляется за счет контактов с молекулами воды, образующими непрерывные цепочки водородных связей, замыкающиеся на группах, контактирующих с субстратом. При связывании субстрата симметрия этих цепочек нарушается, что приводит к неравноценности взаимодействия пептидных групп с внутренними кислородами активных карбоксиллов. Это способствует переходу протона, локализованного между ними, на один из карбоксиллов.

на тот карбоксил, который контактирует с менее поляризованной пептидной группой.

Однако также несомненно, что разность состояния активных карбоксильных групп – первое следствие связывания субстрата, так как образуемые им водородные связи не являются симметричными. Легкость перехода ЛВНВ-протона к одному из кислородов – основной фактор, создающий асимметрию распределения зарядов между карбоксиллами и определяющий возможность развития каталитической реакции. Коль скоро такой переход реализовался, реакция может развиваться далее по стандартной схеме.

Таким образом, в ретровирусных протеиназах каталитической реакции предшествует появление заряда на одной из карбоксильных групп, при сохранении нейтрального состояния другой, что происходит за счет взаимодействия фермента с субстратом. В протеиназах высших организмов заряженное состояние одного из карбоксиллов и нейтральное состояние другого существует изначально до связывания субстрата и обусловлено особым характером взаимодействия внешних кислородов

этих карбоксиллов с аминокислотными остатками, окружающими каталитический центр. В ретровирусных протеиназах таких взаимодействий нет. В этом состоит важное отличие структуры и соответственно свойств аспартатных протеиназ ретровирусов и высших организмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreeva N.S., James M.N.G. Structure and Function of Aspartic Proteinases. N. Y.: Plenum Press, 1992. P. 39–45.
2. Андреева Н.С. // Молекулярн. биология. 1994. Т. 28. С. 1400–1406.
3. Antonov V.K., Ginodman L.M., Rumsh L.D., Kapitannikov Y.V., Barshevskaja T.N., Yavashev L.P., Gurova A.G., Volkova L.I. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. P. 195–200.
4. Davies D.R. // Annu. Rev. Biophys. Chem. 1990. V. 19. P. 189–215.
5. Andreeva N.S., Rumsh L.D. // Protein Science. 2001. V. 10. P. 2439–2450.
6. Андреева Н.С., Понов М.Е. // Молекулярн. биология. 2002. Т. 36. С. 1–6.
7. Piana S., Carloni P. // Proteins: Structure, Function, Genetic. 2000. V. 39. P. 26–36.

Special Features of the Three-Dimensional Structure Defining Properties of Aspartic Proteases

N. S. Andreeva

Phone: +7 (095) 135-0237; e-mail: andreeva@genome.cimb.relarn.ru

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34, Moscow, 117991 Russia

There is given a brief account of the specific interactions of some amino acid residues in aspartic proteases of both higher organisms and retroviruses that determine their important properties: an anomalously low isoelectric point of pepsin and its stability at pH close to unity; the ability of one of the carboxyl groups in the active site of proteases of higher organisms to retain charged state at any pH value and protonated state of another carboxyl, which is necessary for their enzymatic activity. It is also explained how such states can be induced in retroviral proteases. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: active site, aspartic proteases, pepsin-like enzymes, retroviral proteases, three-dimensional structures