



УДК 577.15.2.342*36.02

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСПАРТАТНЫХ ПРОТЕИНАЗ 2*. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЫ СУБСТРАТА ПРОТЕИНАЗЫ HIV-1

© 1996 г. М. Е. Попов[#], И. В. Кашпаров, Е. М. Попов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 15.11.95 г.

Выполнен теоретический конформационный анализ гексапептидного фрагмента природного субстрата p17–p24 протеиназы вируса иммунодефицита человека (HIV-1). Определены геометрические и энергетические параметры всех возможных оптимальных конформаций. Полученные данные необходимы для последующего расчета механизма каталитического акта протеиназы HIV-1.

Ключевые слова: аспартатные протеиназы; протеиназа вируса иммунодефицита человека, субстраты, конформационный анализ.

В первом сообщении этой серии [1] был изложен подход, позволяющий количественно описывать механизм действия фермента как спонтанно протекающего, взаимообусловленного на всех своих стадиях непрерывного процесса. Он использован нами для изучения конформационных и электронных аспектов каталитического акта аспартатных протеиназ. Полученные результаты обсуждаются в этой и последующих публикациях.

Подход включает в себя общую теорию биокатализа, конформационный анализ и квантово-химические методы расчета [2, 3]. Он исходит не из функций биокатализаторов, химических, динамических и кинетических характеристик ферментативных и неферментативных реакций, как это имеет место до сих пор в энзиматических исследованиях [4]. Его основой служат данные о пространственном строении, динамических конформационных и электронных свойствах активного центра фермента и субстрата, т.е. структурной и структурно-функциональной организации молекул, взаимодействия между которыми приводят к вполне определенной каталитической реакции. Таким образом, применяемый нами для изучения аспартатных протеиназ подход ориентирован в направлении от структуры к функции, как неизбежному следствию фермент-субстратных взаимодействий. В этом отношении он является антитезой существующему эмпирическому подходу от функции к структуре.

* Сообщение 1 см. [1].

Использованные сокращения: HIV – вирус иммунодефицита человека.

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

Развиваемая нами общая теория исходит:

1) из представления о такой структурной организации белковых молекул, в основе которой лежит принцип согласованности всех внутримолекулярных взаимодействий валентно не связанных атомов [5],

2) из специфических особенностей биокаталитических реакций как нелинейных неравновесных процессов [2],

3) из предположения о возможности независимого рассмотрения конформационных и электронных стадий каталитического акта фермента. Это означает, что для всех химических стадий процесса допускается справедливость принципа Франка–Кондона, а для всех промежуточных конформационных стадий – справедливость принципа Борна–Оппенгеймера [2, 3].

В отношении конформационных стадий каталитической реакции теория и соответствующий метод расчета были апробированы при рассмотрении невалентных и валентных комплексов α -химотрипсина [6] и β -трипсина [7] с субстратом и ингибиторами. Настоящее исследование является первой попыткой на примере действия аспартатных протеиназ представить ферментативный катализ как автоматический процесс взаимообусловленных изменений конформационных и электронных состояний фермент-субстратного комплекса.

Для проведения исследования на атомно-электронном уровне механизм биологического катализа в направлении от структуры к функции необходимо располагать экспериментальными данными о трехмерной структуре нативного фермента и,

крайне целесообразно, о структуре его ингибиторного комплекса. Естественно, нужно знать химическое строение молекул субстрата и ингибитора. Этого достаточно для априорного расчета всех деталей каталитического процесса, начиная с формирования невалентного комплекса Михаэлиса и кончая высвобождением продуктов реакции и восстановлением исходной конформации белка. На этой же экспериментальной основе возможно конструирование химического строения новых ингибиторов, обладающих наперед заданными конформационно-сорбционными свойствами [5, 8]. По ходу исследования можно выяснить как причины самопроизвольного протекания каталитической реакции и ее многостадийный механизм, так и причины ингибирования процесса. Работа по достижению этих целей подразделяется на четыре последовательных этапа.

На первом этапе детально изучается структурная организация молекул фермента, субстратов и ингибиторов до начала их взаимодействия. В подходе от структуры к функции этот этап представляется крайне важным, так как спонтанно протекающая ферментативная реакция, согласно теории биокатализа [1–3], есть не что иное, как раскрытие тех потенциальных возможностей, которые заложены в нативных структурах свободных молекул. В современных исследованиях ферментативного катализа, направленных от функции к структуре, подобная работа, как правило, не проводится. Структурная организация фермента и взаимодействующих с ним лигандов специально (т.е. независимо от функции и друг от друга) не изучается. Представления о них стараются подстроить под тот или иной предполагаемый механизм каталитической реакции, опираясь на общепринятую точку зрения или субъективное восприятие и имеющийся экспериментальный материал, обычно недостаточный и неоднозначно трактуемый. В этом главная причина большого числа самых разнообразных как дополняющих, так и исключаящих друг друга концепций ферментативного катализа.

Исследование этапа I включает в себя, во-первых, теоретический конформационный анализ субстратов и ингибиторов с целью определения для каждого из них наборов предпочтительных по энергии конформационных состояний свободных молекул, во-вторых, изучение конформационных возможностей аминокислотных остатков активного центра в потенциальном поле нативного фермента, выявление взаимозависимости конформационно-электронного состояния каждого остатка от состояния других остатков и присутствующих в активном центре молекул воды, кофактора или иона металла и, в-третьих, анализ силового поля активного центра фермента, заключающийся в количественной оценке роли водородных

связей, дисперсионных и электростатических взаимодействий в стабилизации и конформационной свободе нативной структуры белковой молекулы.

Этап II (исследование механизма элементарного биокаталитического акта) заключается в изучении сорбции субстрата и ингибитора в активном центре, т.е. молекулярных механизмов образования невалентных фермент-субстратного и фермент-ингибиторного комплексов, нестабильного в первом случае и стабильного во втором. В результате должны быть получены ответы на вопросы: что собой представляет продуктивная конформация субстрата в комплексе Михаэлиса, в чем причины специфичности фермент-субстратных взаимодействий, каковы мотивы перестройки активного центра при сорбции субстрата, в чем заключается предрасположенность субстрата в невалентном комплексе к изменению своего валентного состояния, а также каково назначение многих других деталей каталитического процесса, недоступных для изучения с использованием существующих экспериментальных методов.

Следующий этап (III) состоит в последовательном рассмотрении альтернирующих конформационных и электронных стадий фермент-субстратных взаимодействий. Итогом здесь явится априорно рассчитанный с помощью классического метода конформационного анализа и полупирического метода квантовой химии механизм каталитического действия фермента в виде непрерывной реакции.

Решение задач этапов I–III сделает известными причины ингибирования и нормального протекания ферментативного каталитического акта, что откроет большие возможности перед прикладной энзимологией (этап IV). В частности, можно будет предвидеть до синтеза и биологических испытаний последствия тех или иных изменений в структурах лигандов, что сделает возможным решение обратной структурной задачи – целенаправленного поиска химического строения набора ингибиторов по заданным пространственным структурам, исключаяющим продуктивное расположение гидролизуемой связи в активном центре фермента [8].

Этапы II–IV будут подробно и в доказательном плане обсуждены нами позднее в специально посвященных им публикациям. В этой статье и двух следующих рассмотрены результаты той части работы на этапе I, которая касается конформационных возможностей свободных молекул субстратов и ингибиторов протеолитических ферментов – аспаргатной протеиназы HIV-1 и ризопус-пепсина.

Конкретное обсуждение начнем с обоснования выбора объектов исследования, и прежде всего с ответа на вопрос о причине проведения параллельного и независимого изучения механизмов

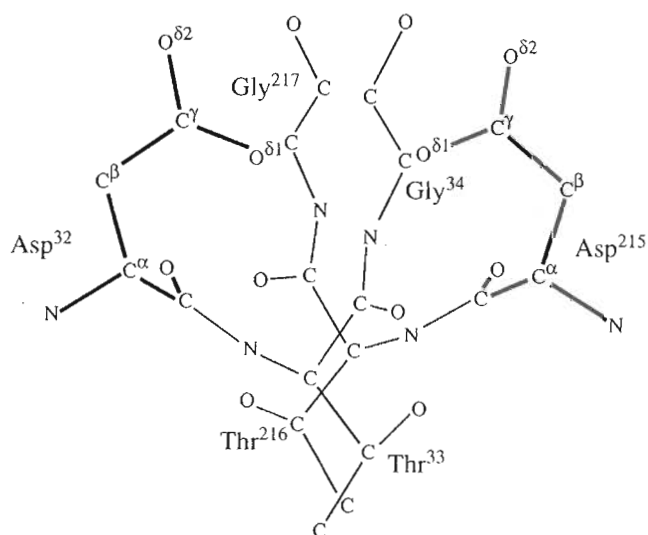


Рис. 1. Каталитически важные остатки активного центра аспартатных протеиназ.

каталитической реакции двух ферментов, принадлежащих к одной и той же группе аспартатных протеиназ.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Список некоторых исследованных в настоящее время кристаллографическими методами аспартатных протеиназ позвоночных, микроорганизмов и ретровирусов представлен в табл. 1.

Аминокислотные последовательности перечисленных ферментов существенно отличаются друг от друга, однако трехмерные структуры молекул обнаруживают целый ряд общих черт. Все

Таблица 1. Аспартатные протеиназы, исследованные методом рентгеноструктурного анализа

Фермент	Разрешение, Å	Литература
Лепсин А свиньи	2.7; 2.0; 1.8	[9–12]
Пепсиноген	1.8	[13, 14]
Химозин	2.3	[15, 16]
Ренин	2.5	[17]
Пенициллопепсин	2.8; 1.8	[18, 19]
Эндотиапепсин	3.0; 2.4; 2.1	[20–22]
Ризопуспепсин	2.5; 1.8	[20, 23, 24]
Протеиназа вируса птичьего миелобластога	2.4	[25]
Протеиназа вируса саркомы Роуза	2.0	[26]
Протеиназа вируса иммунодефицита человека (HIV-1)	3.0; 2.8	[27, 28]

они построены из двух доменов или двух валентно не связанных полипептидных цепей, в том и другом случае симметрично расположенных и почти целиком состоящих из β -структур. Как домены, так и молекулы в димерных комплексах ретровирусных протеиназ воспроизводят один и тот же структурный мотив и содержат в активных центрах всех протеиназ фрагменты Asp-Thr-Gly [4]. Домены (или молекулы) в области контакта образуют щель, пересекающую большую часть глобулы белка (димерного комплекса). В центре щели находятся каталитически важные остатки Asp³² и Asp²¹⁵ (нумерация пепсина [9]), при замене хотя бы одного из которых на любой аминокислотный остаток фермент полностью теряет активность. Боковые цепи этих остатков сближены друг с другом и с несколькими другими остатками и молекулами кристаллизационной воды. Эта система стабилизирована сетью водородных связей, электростатическими и дисперсионными взаимодействиями. Приведенная на рис. 1 часть этой системы – наиболее важная составляющая активного центра, присутствующая в молекулах всех аспартатных протеиназ ([4] и цитируемые там работы). Более того, данные рентгеноструктурного анализа показывают, что у всех протеиназ эта область имеет одну и ту же геометрию (табл. 2).

Одинаковая для нативных конформаций аспартатных протеиназ взаимная ориентация боковых цепей и совпадение расстояний между всеми атомами функциональных остатков Asp³² и Asp²¹⁵ дают основание для утверждения, что в невалентных комплексах Михаэлиса этих ферментов реализуется одно и то же продуктивное расположение расщепляемой пептидной связи субстрата относительно указанной пары остатков активного центра. Это подкрепляется данными рентгеноструктурного анализа фермент-ингибиторных комплексов.

Исследование трехмерных структур комплексов аспартатных протеиназ с субстратоподобными ингибиторами (табл. 3) позволило для каждого фермента идентифицировать связывающие места активного центра и соотнести их с участками субстрата, отвечающими за специфичность ферментативной реакции.

Сопоставление трехмерных структур нативных аспартатных протеиназ и их ингибиторных комплексов (см. работы, указанные в табл. 1 и 3) показало, что во всех случаях сорбция олигопептидного лиганда, незначительно отличающегося от субстрата, сопровождается изменением исходной конформации белка. Было предположено [40], что конформационные перестройки необходимы для протекания ферментативной реакции и, следовательно, происходят также и при образовании фермент-субстратных невалентных комплексов.

Таблица 2. Расстояния (в Å) между атомами боковых цепей остатков Asp³² и Asp²¹⁵ (нумерация пепсина [9]) в кристаллографических структурах аспартатных протеиназ

Фермент	O ₃₂ ^{δ1} -O ₂₁₅ ^{δ1}	O ₃₂ ^{δ2} -O ₂₁₅ ^{δ2}	C ₃₂ ^γ -C ₂₁₅ ^γ	O ₃₂ ^{δ1} -O ₂₁₅ ^{δ2}	O ₃₂ ^{δ2} -O ₂₁₅ ^{δ1}	C ₃₂ ^β -C ₂₁₅ ^β	C ₃₂ ^α -C ₂₁₅ ^α
Пепсин	2.8	5.8	5.1	4.4	4.8	7.4	6.7
Ренин	2.9	6.2	5.3	4.8	4.8	7.4	6.6
Пенициллопепсин	2.9	5.8	5.2	4.4	4.8	7.5	6.6
Эндотиалепсин	2.9	5.7	5.2	4.4	4.8	7.6	6.6
Ризопуспепсин	3.1	6.1	5.4	4.4	5.0	7.7	6.8
HIV-1-протеиназа	3.0	5.8	5.2	4.7	4.7	7.4	6.6
RSV-протеиназа	2.8	5.6	5.0	4.6	4.2	7.4	6.4

Таблица 3. Рентгеноструктурный анализ трехмерных структур ингибиторных комплексов аспартатных протеиназ

Фермент	Ингибитор	Разрешение, Å	Литература
Пепсин	Phe(I ₂)TyrOMe	3.0	[29]
Пенициллопепсин	IvaValValStaOEt	1.8	[30, 31]
Эндотиалепсин	ProThrGluPheCH ₂ NHPheArgGlu	2.0	[32]
	BocPheHis-NHCH(CH ₂ Ph)CH(OH)N(CH ₂ CHMe ₂)COLysPhe	1.8	[33]
	BocHisProPheHisStaLeuPheNH ₂	2.2	[34]
Ризопуспепсин	Пепстатин	2.5	[35]
	D-HisProPheHisPheCH ₂ NHPheValTyr	1.8	[36]
Протеиназа (HIV-1)	ValSerGlnAsnLeuΨ[CH(OH)CH ₂]ValIleVal (U-85548e)	2.5	[37]
	AcSerLeuAsnPheΨ[CH(OH)CH ₂]ProIleValOMe (JC-365)	2.4	[38]
	AcThrIleNleCH ₂ NleGlnArgNHCH ₃ (MVT-101)	2.3	[39]

Наиболее значительная конформационная перестройка наблюдается у димерного комплекса протеиназы HIV-1 при его взаимодействии с субстратоподобными ингибиторами U-85548e, JG-365 и MVT-101 (см. табл. 3). Изменениям подвергаются не только конформационные состояния боковых цепей многих остатков активного центра, что обычно имеет место в подобных случаях, но и значительная часть основных цепей обеих молекул димера. Наибольшие смещения претерпевают два β-складчатых листа (остатки 45–57 одной молекулы и 145–157 другой), нависающих над активным центром и получивших название “флепов”. Флепы не участвуют в стабилизации димерной формы в нативном состоянии и сохраняют свое положение благодаря взаимодействиям сближенных участков 48–52 и 148–152, а также, по-видимому, за счет межмолекулярных контактов с соседним в кристаллической решетке димером [37].

Важную роль флепы начинают играть на стадии образования невалентного комплекса протеиназы HIV-1 с ингибитором. Если судить по атомам C^α, то смещения центральных остатков флепов (50, 51 и 150, 151) в комплексе протеиназы с

ингибитором JG-365 относительно нативной структуры составляют около 8.0 Å, постепенно затухая до 1.0 Å у концевых остатков 45, 57 и 145, 157 (рис. 2а). При сорбции лиганда концы флепов перемещаются к активному центру. Заметные изменения положения (до 2.0–3.0 Å), также приводящие к сужению субстратной полости активного центра, синхронно совершают остатки 77–81 и 177–181. Смещения атомов C^α у двух молекул димерной HIV-1 протеиназы HIV-1 (остатки 1–99, 100–199), как видно из рис. 2а, весьма близки, хотя и не полностью идентичны.

Изменения в трехмерных структурах, особенно в ориентации флепов относительно активных центров, наблюдаются и у других аспартатных протеиназ. Однако они не так велики, как у протеиназы HIV-1. Например, у ризопуспепсина максимальные смещения атомов C^α при образовании фермент-ингибиторного комплекса составляют 1.1 и 0.7 Å (рис. 2б). Что касается других участков этого фермента, то они заметным образом вообще не реагируют на ассоциацию с ингибитором, очень близким по своей структуре истинному субстрату (табл. 3).

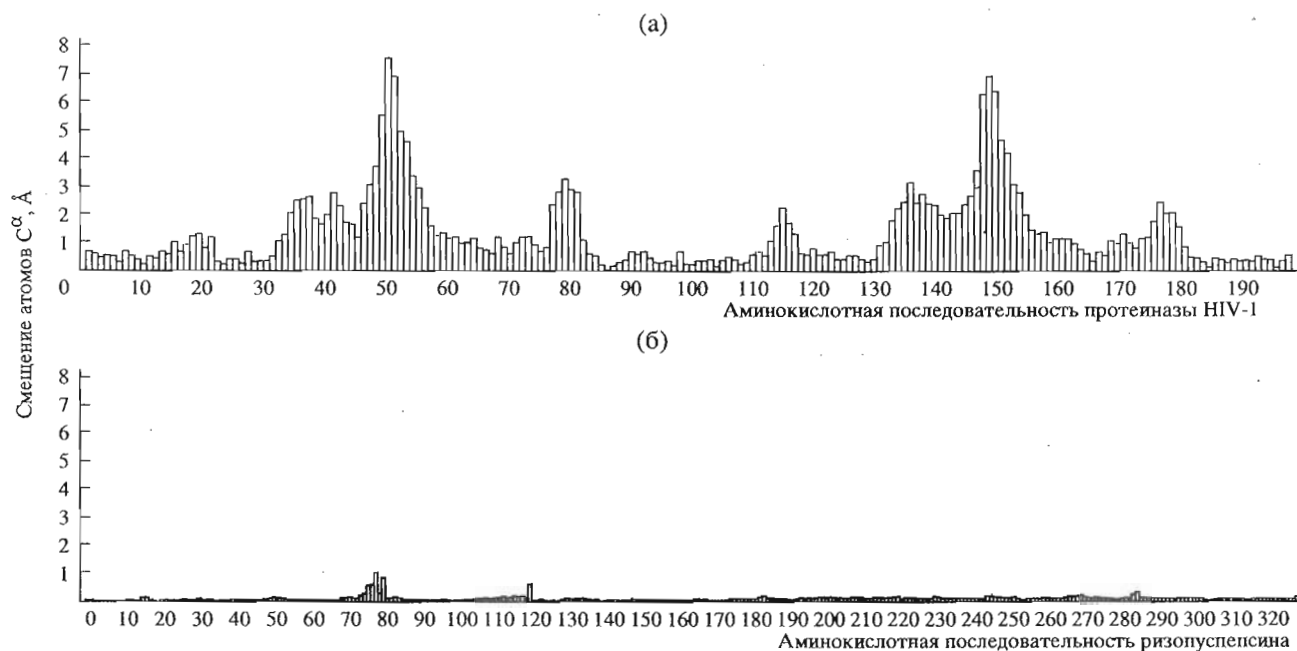


Рис. 2. Смещения атомов C^α в молекулах димерной HIV-1-протеиназы (а) и ризопуспеписина (б) при образовании невалентных комплексов с ингибиторами (табл. 2, [36–38]). Остаткам Asp³², Asp²¹⁵ в активном центре пепсина соответствуют остатки Asp²⁵, Asp¹²⁵ протеиназы HIV-1 и Asp³⁵, Asp²¹⁸ ризопуспеписина.

Таким образом, сопоставление трехмерных структур нативных аспартатных протеиназ со структурами соответствующих фермент-ингибиторных комплексов показывает, что каждой протеиназе свойственны характерные, существенно отличающие ее от других протеиназ конформационные реакции на сорбцию субстратоподобного ингибитора в активном центре. С другой стороны, мы уже обращали внимание на то, что в молекулах нативных ферментов как позвоночных, так и микроорганизмов и ретровирусов обнаруживается совпадение конформационных состояний аминокислотных остатков Asp³², Asp²¹⁵ и некоторых других в функционально самой важной части активного центра. Поскольку это же состояние у тех же остатков реализуется во всех ингибиторных комплексах, трехмерные структуры которых известны (табл. 3), то очевиден вывод, что комплексы Михаэлиса различных аспартатных протеиназ должны иметь геометрически одну и ту же продуктивную ориентацию чувствительного места субстрата относительно каталитически активных остатков аспарагиновой кислоты.

Итак, экспериментальные факты позволяют заключить, что различающиеся по кинематике и динамике невалентные взаимодействия различных аспартатных протеиназ со специфическими для каждого из них субстратами ведут во всех случаях к созданию геометрически и химически одинаковой электронно-неравновесной системы, включающей расщепляемую пептидную связь и

ответственные за катализ атомные группы фермента и молекулы воды. Иными словами, каталитические реакции различных аспартатных протеиназ обладают одинаковыми в чисто химическом отношении стартовыми условиями и протекают по одному и тому же механизму.

В принципе аналогичная ситуация имеет место у сериновых протеиназ α -химотрипсина и β -трипсина. Независимый расчет конформационных аспектов всех стадий каталитических актов этих ферментов показал, что при формировании их невалентных фермент-субстратных комплексов в области активных центров возникают во всех отношениях идентичные полифункциональные системы, предрасположенные к спонтанному гидролизу пептидной связи через реакцию ацилирования [2, 6, 7]. Специфика фермент-субстратных взаимодействий в этих двух случаях проявляется на стадии образования комплексов Михаэлиса; все же последующие стадии каталитических реакций α -химотрипсина и β -трипсина практически неразличимы.

Основанные на экспериментальных данных представления о создании подобной полифункциональной системы, единой в комплексах Михаэлиса всех аспартатных протеиназ, поддаются однозначной проверке при независимом априорном расчете невалентных взаимодействий двух ферментов, как можно больше различающихся по аминокислотным последовательностям и динамическим конформационным свойствам, с молекулами

соответствующих субстратов. Такими ферментами являются, например, аспартатные протеиназы HIV-1 и ризопусепсин, которые и стали объектами нашего исследования.

Выше отмечалось, что для количественного описания механизма биокаталитической реакции крайне желательно располагать данными рентгеноструктурного анализа о пространственном строении фермент-ингибиторных комплексов. Наличие такого экспериментального материала, тем более касающегося двух белков, позволяет надежно проконтролировать правильность результатов расчета. Дело в том, что теоретический конформационный анализ фермент-ингибиторного комплекса выполняется на основе нативной трехмерной структуры фермента и привлечения каких-либо дополнительных опытных данных не требует. Поэтому знание кристаллографической структуры ингибиторного комплекса представляет уникальную возможность прямого сопоставления результатов рентгеноструктурного анализа и независимого от него расчета. Совпадение теоретической и экспериментальной структуры фермент-ингибиторных комплексов протеиназы HIV-1 и ризопусепсина, принимая во внимание очень небольшие различия в химическом строении молекул соответствующих пар ингибитора и субстрата, по-видимому, не должно оставить сомнений в объективности результатов расчета продуктивных конформационных состояний фермент-субстратных комплексов Михаэлиса, не поддающихся непосредственной опытной проверке. Поэтому выбор для анализа молекул субстратоподобных ингибиторов был продиктован наличием в литературе данных о трехмерных структурах их комплексов с протеиназой HIV-1 и ризопусепсином. В свою очередь, отобранные гидролизующие пептиды являются естественными субстратами этих ферментов.

МЕТОД РАСЧЕТА И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Анализ структурной организации свободных молекул субстратов и ингибиторов аспартатных протеиназ основан на развитых ранее конформационной теории и расчетном методе [8, 41, 42]. Оценка энергии дисперсионных, электростатических, торсионных взаимодействий и водородных связей проведена с помощью потенциальных функций и параметризации, приведенных в работах [5, 43]. Для молекул использована классификация пептидных структур на конформации, формы и шейпы [5, 41, 43].

Под понятием "конформация" подразумеваются строение количественные характеристики геометрии аминокислотного остатка, фрагмента или молекулы, которые позволяют вычислить значения энергии внутри- и межостаточных взаимодействий. Двугранные углы вращения φ ($N-C^\alpha$),

ψ ($C^\alpha-C'$) основной цепи всех аминокислотных остатков в пептидах и белках всегда находятся на конформационных картах в низкоэнергетических областях R , B , L и H . Понятие "форма" основной цепи остатка означает принадлежность его конформационного состояния к одной из указанных областей пространства $\varphi-\psi$. Форма основной цепи фрагмента или молекулы отражает общий характер взаимодействий атомов пептидного скелета и боковых цепей. Формы, имеющие аналогичный ход основной цепи, относятся к одному типу, или шейпу.

Пространственная классификация пептидных структур по конформациям, формам и шейпам построена по принципу "дерева". Все конформации делятся по формам основной цепи, а формы — по шейпам. Количество форм в каждом шейпе определяется числом возможных комбинаций R -, B -, L - и H -формы остатков. Число конформаций каждой формы зависит от природы остатка. Распределение форм основной цепи дипептидных фрагментов в белках, трехмерные структуры которых известны, выявило наличие четкой корреляции между углами ψ_i и φ_{i+1} смежных остатков, позволившей разделить все формы основной цепи на два типа — шейпы f и e , единственной характеристикой которых является двугранный угол (θ) вращения вокруг виртуальной связи $C_i^\alpha-C_{i+1}^\alpha$, приблизительно равный сумме углов $\psi_i + \varphi_{i+1}$ [5]. В общем случае у фрагмента или молекулы из n аминокислотных остатков могут реализовываться формы основной цепи 2^{n-1} различных шейпов.

При обсуждении результатов расчета конформационные состояния пептидов представлены не численными значениями углов вращения φ , ψ , ω и χ , а охарактеризованы идентификаторами типа X_{ij}^n , где X обозначает форму основной цепи остатка (R , B , L , H), а индексы $ij\dots = 11\dots, 12\dots, 13\dots, 21\dots$ и т.д. отвечают положениям боковой цепи (χ^1, χ^2); индекс 1 соответствует значениям углов χ в области $0^\circ-120^\circ$, индекс 2 — области $120^\circ \dots -120^\circ$, а индекс 3 — области $-120^\circ-0^\circ$. Кроме того, основная цепь характеризуется шейпом, который представляет собой сочетание символов f и e , обозначающих соответственно свернутую и развернутую конфигурацию связей $-C_i^\alpha-C_{i+1}^\alpha-C_{i+2}^\alpha-C_{i+3}^\alpha-$. Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют международной номенклатуре [44].

СУБСТРАТ (p17-p24) АСПАРТАТНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ HIV-1

Субстрат протеиназы HIV-1, конформационные возможности которого здесь рассматриваются, является фрагментом вирусной полипептидной цепи Pr55gag, состоящей из белков нуклеокапсида

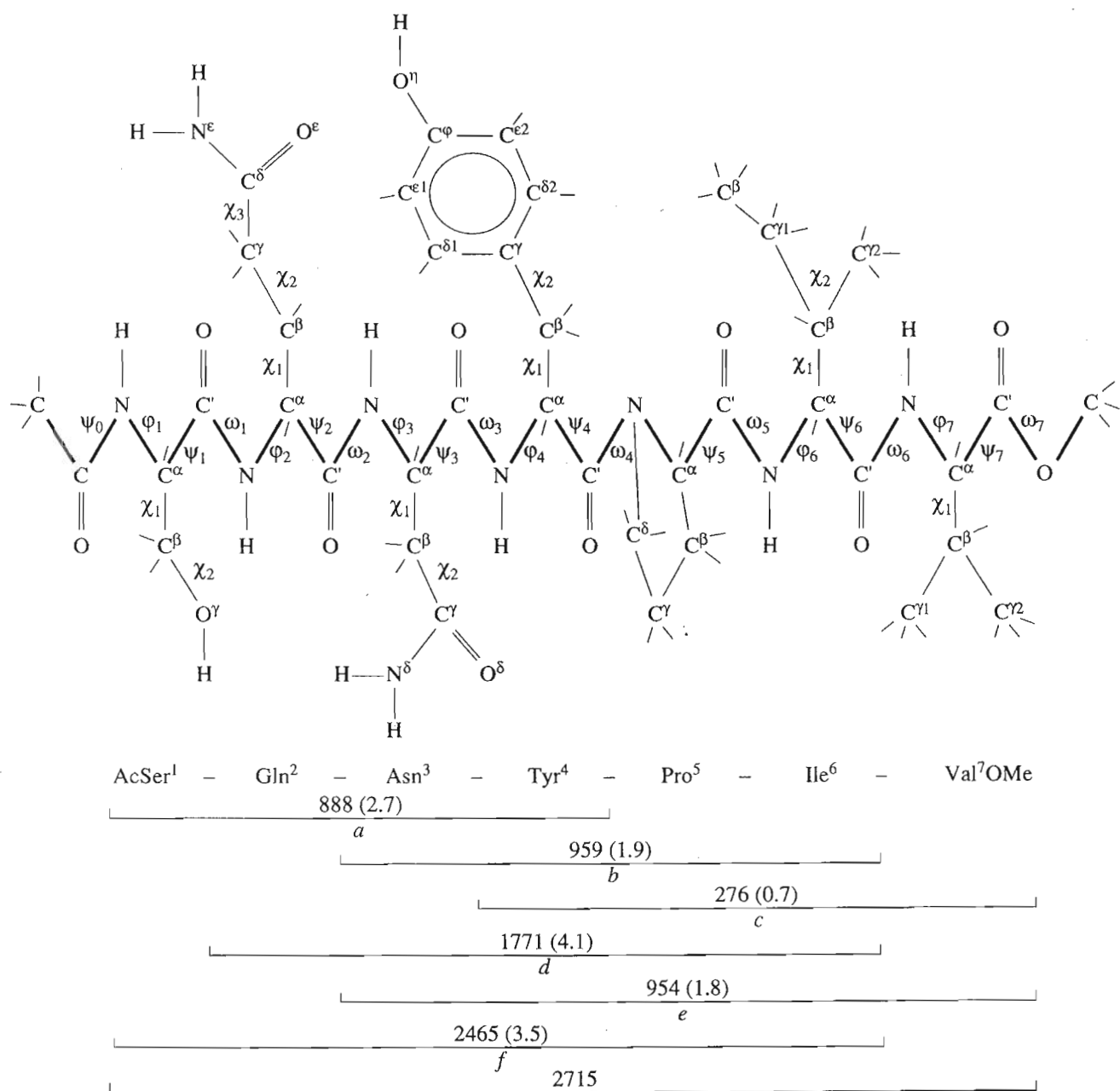
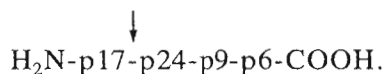


Рис. 3. Расчетная модель и схема конформационного анализа молекулы субстрата (p17–p24) протеиназы HIV-1. Для каждого фрагмента указаны число рассчитанных его структурных вариантов и относительная энергия конформационного состояния (в скобках, ккал/моль), соответствующего состоянию данного фрагмента в глобальной структуре субстрата.

и кора (p17, p24), а также белков, непосредственно связанных с провирусной мРНК (p9, p6):



Четыре аминокислотных остатка последовательности субстрата, предшествующие расщепляемой пептидной связи, Ser¹-Gln²-Asn³-Tyr⁴, принадлежат С-концевому участку белка p17, а три

последующих, Pro⁵-Ile⁶-Val⁷, – N-концевому участку белка p24.

Наборы начальных структурных вариантов *a*, *b* и *c* расчетной модели субстрата (рис. 3) формировались исходя из низкоэнергетических оптимальных конформаций рассчитанных нами метиламидов N-ацетилдипептидов, перекрывающихся по одному остатку, и трипептидов, перекрывающихся по двум остаткам. Все мыслимые структурные варианты тетра-, пента- и гексапептидов

Таблица 4. Энергетическое распределение оптимальных конформаций фрагментов субстрата аспаратной протеиназы HIV-1

Фрагмент (обозначение)*	Шейп	Низкоэнергетическая конформация	Интервал относительной энергии, ΔU , ккал/моль						
			0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	>6
AcSer ¹ -Tyr ⁴ (a)	<i>eee</i>	$B_{31}-B_{121}-B_{13}-R_{31}$	5	15	10	25	42	8	—
	<i>ffe</i>	$R_{11}-R_{223}-B_{31}-B_{11}$	1	5	23	51	33	—	—
	<i>fee</i>	$R_{13}-B_{121}-B_{13}-R_{31}$	—	7	16	24	27	11	—
	<i>eef</i>	$B_{11}-B_{213}-R_{21}-B_{31}$	—	1	9	44	71	—	—
	<i>fef</i>	$R_{11}-B_{211}-R_{33}-B_{11}$	—	—	7	45	61	18	—
	<i>fff</i>	$R_{21}-R_{333}-R_{21}-R_{31}$	—	—	2	2	8	5	—
	<i>eff</i>	$B_{11}-R_{333}-R_{21}-B_{31}$	—	—	1	4	16	11	—
	<i>efe</i>	$B_{11}-R_{223}-B_{31}-B_{11}$	—	—	—	20	44	23	—
Asn ³ -Ile ⁶ (b)	<i>eef</i>	$B_{21}-B_{31}-R-R_{33}$	13	39	68	81	51	48	28
	<i>fef</i>	$R_{21}-B_{31}-R-R_{33}$	5	25	34	77	75	21	12
	<i>eee</i>	$R_{21}-B_{31}-R-R_{33}$	—	4	41	66	62	26	11
	<i>fee</i>	$R_{21}-B_{11}-B-B_{33}$	—	5	20	43	55	43	6
Tyr ⁴ -Val ⁷ OMe (c)	<i>eff</i>	$B_{11}-R-R_{33}-B_1$	3	—	3	4	6	3	35
	<i>efe</i>	$B_{11}-R-B_{22}-B_3$	—	—	6	17	12	8	51
	<i>eef</i>	$B_{11}-B-R_{33}-R_2$	—	—	—	2	12	15	25
	<i>eee</i>	$B_{11}-B-B_{33}-R_2$	—	—	—	—	7	24	53
Gln ² -Ile ⁶ (d)	<i>efee</i>	$B_{213}-R_{31}-B_{11}-B-B_{33}$	7	26	37	51	76	99	99
	<i>efef</i>	$B_{223}-R_{31}-B_{11}-R-B_{12}$	6	24	58	123	126	111	69
	<i>feef</i>	$R_{223}-B_{31}-B_{11}-R-B_{12}$	—	—	4	14	53	71	127
	<i>eeef</i>	$B_{211}-B_{11}-B_{31}-R-R_{33}$	—	—	12	56	68	86	69
	<i>ffef</i>	$R_{211}-R_{21}-B_{31}-R-R_{33}$	—	—	—	6	28	29	50
	<i>ffee</i>	$R_{223}-R_{31}-B_{11}-B-B_{33}$	—	—	—	—	6	16	72
	<i>eeee</i>	$B_{213}-R_{21}-L_{31}-R-L_{33}$	—	—	—	—	12	23	49
	<i>feee</i>	$R_{223}-B_{13}-B_{31}-R-L_{33}$	—	—	—	—	—	—	7
Asn ³ -Val ⁷ OMe (e)	<i>feff</i>	$R_{23}-B_{11}-R-R_{33}-B_1$	2	15	18	19	12	5	3
	<i>eeff</i>	$B_{23}-B_{11}-R-R_{33}-B_1$	1	20	22	34	20	17	3
	<i>eefe</i>	$B_{21}-B_{31}-R-B_{33}-R_2$	—	7	37	71	73	56	59
	<i>fefe</i>	$R_{13}-B_{31}-R-B_{33}-R_2$	—	1	30	52	47	29	35
	<i>feef</i>	$R_{23}-B_{11}-B-R_{33}-R_2$	—	—	—	2	21	51	6
	<i>feee</i>	$R_{21}-B_{11}-B-B_{33}-R_2$	—	—	—	4	11	39	42
	<i>feee</i>	$B_{11}-B_{11}-B-R_{33}-R_2$	—	—	—	—	1	13	12
	<i>eeee</i>	$B_{11}-B_{11}-B-B_{33}-R_2$	—	—	—	—	1	5	7

* См. рис. 3.

в общем случае подразделяются соответственно на 8, 16 и 32 шейпа пептидного скелета. Однако у субстратных фрагментов *b*, *c*, *d* и *e* число их сокращается наполовину, поскольку у остатка, предшествующего Pro (если он не Gly), практически запрещенной оказывается форма *R* из-за перекрытия ван-дер-ваальсовых радиусов метиленовых групп C^βH₂ и C^δH₂ боковых цепей двух остатков [45–47]. Поэтому входящий во фрагменты *b–e* дипептид Tyr⁴-Pro⁵ может принимать только развернутые формы основной цепи, принадлежащие шейпу *e*.

В табл. 4 для тетра- и пентапептидных фрагментов участков *a–e* субстрата представлено энергетическое распределение конформаций, полученных после минимизации энергии при вариации двугранных углов ϕ , ψ , ω и χ (рис. 3).

Расчет фрагментов AcSer¹-Tyr⁴ (*a*) и Asn³-Ile⁶ (*b*) не выявил заметной энергетической дифференциации; в интервал 0–3.0 ккал/моль попали соответственно 102 и 254 структурных варианта всех шейпов пептидного скелета. Иная ситуация имеет место у C-концевого тетрапептида Tyr⁴-Val⁷OMe (*c*), у которого в том же интервале оказались

Таблица 5. Энергия (ккал/моль) межостаточных взаимодействий валентно не связанных атомов в наиболее предпочтительных конформациях фрагмента Tyr⁴-Pro⁵-Ile⁶-Val⁷OMe (фрагмент *c*)

Межостаточные взаимодействия	<i>eff</i> $B_{11}-R-R_{33}-B_1$ $\Delta U = 0.0$	<i>efe</i> $B_{11}-R-B_{22}-B_3$ $\Delta U = 2.4$	<i>ef</i> $B_{11}-B-R_{33}-R_2$ $\Delta U = 3.3$	<i>eee</i> $B_{11}-B-B_{33}-R_2$ $\Delta U = 4.1$
Tyr ⁴ ...Val ⁷ OMe	-5.8	-3.5	-0.1	-0.4
Tyr ⁴ ...Pro ⁵	-3.5	-4.2	-4.3	-4.4
Pro ⁵ ...Ile ⁶	-2.4	-2.1	-1.2	-1.5
Ile ⁶ ...Val ⁷ OMe	-2.7	-2.9	-2.7	-2.7
Pro ⁵ ...Val ⁷ OMe	-0.7	-0.3	-1.1	-0.7
Tyr ⁴ ...Ile ⁶	-2.1	-2.4	-4.0	-4.3

представители лишь двух шейпов (*eff* и *efe*), обеспечивающих наиболее плотную упаковку данной последовательности и реализацию максимального числа стабилизирующих контактов между всеми участками цепи.

В глобальной конформации фрагмента *c* (*eff*) главным стабилизирующим элементом становится остаток Tyr⁴, энергия взаимодействий которого с другими остатками составляет -11 ккал/моль, т.е. почти две трети всей энергии невалентных взаимодействий тетрапептида (табл. 5). Самые выгодные контакты боковая цепь Tyr осуществляют с остатками Val⁷OMe (-5.8 ккал/моль) и Pro⁵ (-3.5 ккал/моль). Значительные вклады в понижение энергии этой конформации также вносят взаимодействия Ile⁶ со сближенными в шейле *eff* остатками Pro⁵ и Val⁷OMe.

Лучшая конформация среди вариантов шейпа *efe* фрагмента *c* ($\Delta U = 2.4$ ккал/моль) отличается от рассмотренной конформации формой основной цепи остатка Ile⁶ и ориентацией Val⁷OMe относительно остальной части фрагмента. Переход от свернутой формы дипептида Ile⁶-Val⁷OMe к развернутой приводит к ослаблению взаимодействия остатка Tyr⁴ с Val⁷OMe и усилению с Ile⁶. Энергия остальных невалентных контактов остается практически неизменной. Конформации шейпов *eff* и *efe* предпочтительны не только в отношении энергетического фактора, но и энтропийного (а следовательно, свободной энергии Гиббса), о чем свидетельствует наличие нескольких низкоэнергетических состояний этих шейпов, различающихся положением боковых цепей (табл. 4).

Относительная энергия заметно возрастает у конформаций фрагмента *c* с развернутыми формами основной цепи шейпов *ef* и *eee*. Это не связано с образованием каких-либо неблагоприятных контактов, поскольку конформации этих шейпов имеют низкую энергию торсионных взаимодействий. Величины ΔU возрастают главным образом из-за потери эффективных стабилизирующих контактов между удаленными друг от дру-

га концевыми остатками Tyr⁴ и Val⁷OMe, а также менее благоприятной для взаимодействия ориентации боковых цепей Pro⁵ и Ile⁶. Лишь частично эти потери компенсируются образованием стабилизирующих контактов остатка Tyr⁴ с Pro⁵ и Ile⁶ (табл. 5).

В расчете пентапептидного участка субстрата Gln²-Ile⁶ (*d*) исходные приближения для минимизации формировались из конформаций фрагмента Asn³-Ile⁶ (*b*) с величинами ΔU в интервале 0-5.0 ккал/моль и конформационных состояний трипептида Gln²-Asn³-Tyr⁴. В результате присоединения остатка Gln² появляется незначительная энергетическая дифференциация, выражающаяся в том, что варианты со структурой *efe* участка Gln²-Pro⁵ имеют энергию в среднем на 2 ккал/моль более низкую, чем следующие за ними структуры шейпов *feef* и *eeef*. Однако при дальнейшем наращивании цепи гептапептидного фрагмента AcSer¹-Ile⁶ (*f*), начальные приближения которого формировались из конформаций тетрапептида *a* и пентапептида *d*, по энергии не превышающих 5.5 ккал/моль, дифференциация пропадает и гексапептид имеет конформации 11 шейпов с энергией, не превышающей 3 ккал/моль.

Другая картина складывается при расчете C-концевого пентапептида (фрагмент *e*). Результаты минимизации энергии, представленные в табл. 4, свидетельствуют о дальнейшей дифференциации пентапептида по сравнению с тетрапептидом *c* и превращении структуры последнего в конформационно достаточно жесткую нуклеацию *eff*. Ее стабильность не нарушается при переходе от развернутой формы дипептида Asn³-Tyr⁴ к свернутой, что делает предпочтительные состояния шейпов *eeff* и *feff* фрагмента *e* практически изоэнергетичными. В узкий интервал 0-2.0 ккал/моль попадает 38 представителей этих шейпов, а в 0-3.0 ккал/моль - около 80 (табл. 4). Следующие за ними конформации типов *eefe* и *fefe* имеют большую энергию и не так многочисленны. Структурные варианты всех других шейпов следует отнести к высокоэнергетичным; лучший из них

Таблица 6. Энергетическое распределение оптимальных конформаций субстрата аспаргатной протеиназы HIV-1

Группа	Шейп*	Низкоэнергетическая конформация	Интервал относительной энергии, ΔU , ккал/моль								
			0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	более 8
A	<i>fffeff</i>	$R_{11}-R_{223}-R_{31}-B_{11}-R-R_{32}-B_1$	2	2	4	2	—	—	—	—	11
	<i>fefeff</i>	$R_{11}-B_{211}-R_{33}-B_{11}-R-R_{32}-B_1$	2	23	26	17	38	41	36	15	13
	<i>ffeeff</i>	$R_{11}-R_{333}-B_{31}-B_{11}-R-R_{33}-B_1$	1	9	13	14	7	4	3	2	1
	<i>eefeff</i>	$B_{11}-B_{213}-R_{23}-B_{11}-R-R_{32}-B_1$	2	16	25	26	35	51	42	27	26
	<i>effeff</i>	$B_{31}-R_{223}-R_{31}-B_{11}-R-R_{33}-R_1$	—	4	11	14	11	5	2	—	32
	<i>eeeeff</i>	$B_{11}-B_{123}-B_{23}-B_{31}-R-R_{31}-R_2$	—	—	3	8	11	14	15	3	9
	<i>efeeff</i>	$B_{21}-R_{333}-B_{23}-B_{11}-R-R_{32}-B_1$	—	—	1	8	18	11	6	6	16
	<i>feeeff</i>	$R_{11}-B_{211}-B_{11}-B_{11}-R-R_{33}-B_1$	—	—	—	8	11	10	7	6	2
B	<i>effefe</i>	$B_{11}-R_{333}-R_{21}-B_{31}-R-B_{33}-B_3$	2	8	26	26	33	21	4	1	—
	<i>fefefe</i>	$R_{12}-B_{121}-R_{21}-B_{31}-R-B_{33}-B_1$	—	—	1	17	69	103	98	45	14
	<i>eeefefe</i>	$L_{31}-B_{123}-R_{21}-B_{31}-R-B_{33}-R_1$	—	—	—	35	115	145	112	60	18
	<i>feeeefe</i>	$R_{11}-B_{333}-B_{11}-B_{31}-R-B_{33}-R_2$	—	—	—	8	15	28	27	15	5
	<i>eeeeefe</i>	$B_{31}-B_{123}-B_{23}-B_{31}-R-B_{33}-R_2$	—	—	—	2	13	21	20	14	—
	<i>ffeefe</i>	$R_{11}-R_{211}-B_{33}-B_{31}-R-B_{33}-R_2$	—	—	—	—	7	12	6	1	—
	<i>fffeefe</i>	$R_{11}-R_{211}-R_{21}-B_{31}-R-B_{33}-R_2$	—	—	—	—	1	2	6	3	16
	<i>efeefe</i>	$B_{11}-R_{333}-B_{31}-B_{31}-R-B_{33}-R_3$	—	—	—	—	—	5	11	15	—
C	<i>effeef</i>	$B_{31}-R_{223}-R_{31}-B_{31}-B-R_{33}-R_2$	—	—	1	2	7	4	6	—	—
	<i>eefeef</i>	$B_{11}-B_{213}-R_{23}-B_{11}-B-R_{33}-R_2$	—	—	1	5	22	45	36	3	1
	<i>fefeef</i>	$R_{21}-B_{213}-R_{23}-B_{11}-B-R_{33}-R_2$	—	—	—	3	21	39	37	5	—
	<i>fffeef</i>	$R_{11}-R_{223}-R_{31}-B_{11}-B-R_{12}-B_3$	—	—	—	—	—	1	—	1	—
	<i>feeeef</i>	$R_{11}-B_{333}-B_{11}-B_{31}-B-R_{33}-R_2$	—	—	—	—	—	1	1	5	10
	<i>eeeeef</i>	$B_{11}-B_{211}-B_{13}-B_{31}-B-R_{33}-R_2$	—	—	—	—	—	—	—	3	7
	<i>ffeeef</i>	$R_{11}-R_{223}-B_{13}-B_{31}-B-R_{33}-R_2$	—	—	—	—	—	—	—	1	5
	D	<i>eefeeee</i>	$B_{11}-R_{213}-R_{23}-B_{11}-B-B_{33}-B_3$	—	—	1	14	21	45	44	12
<i>effeeeee</i>		$B_{31}-R_{211}-R_{31}-B_{11}-B-B_{32}-B_2$	—	—	1	4	11	15	5	1	—
<i>fefeeee</i>		$R_{11}-B_{211}-R_{31}-B_{11}-B-B_{33}-B_3$	—	—	—	9	17	51	37	17	5
<i>eeeeeee</i>		$B_{11}-B_{333}-B_{11}-B_{21}-B-B_{33}-R_2$	—	—	—	—	—	1	3	13	98
<i>feeeeee</i>		$R_{21}-B_{333}-B_{11}-B_{31}-B-B_{33}-R_2$	—	—	—	—	—	—	2	2	—
<i>fffeeee</i>		$R_{31}-R_{223}-R_{31}-B_{11}-B-B_{32}-R_2$	—	—	—	—	—	—	2	4	—

* Полужирным шрифтом выделен шейп фрагмента *c*, входящего в субстрат.

принадлежит шейпу *feef* и уступает глобальной конформации шейпа *eeff* 3.7 ккал/моль.

Таким образом, расчет фрагмента *e* показал, что присоединение остатка Asn^3 к достаточно жесткому участку цепи *c* приводит к еще большей энергетической дифференциации конформаций и образованию на С-концевой последовательности субстрата нуклеации *eff*. Анализ фрагмента *d* также подтвердил тенденцию, обнаруженную во фрагменте *a*, а именно склонность N-концевого участка молекулы к практически равновероятной реализации структурных вариантов всех шейпов.

Конформационные возможности всей молекулы субстрата оценены по данным, полученным из расчета перекрывающихся по четырем остаткам пентапептидов *e* и *f* (рис. 3). И у того, и у другого

фрагмента в качестве нулевых приближений использованы конформации всех шейпов с величинами ΔU от 0 до 6.0 ккал/моль. Минимизации энергии при вариации двугранных углов φ , ψ , ω и χ (рис. 3) было подвергнуто 2715 структурных вариантов (см. рис. 3). Полученные в результате расчета конформации представляют 29 шейпов из 32 возможных. Три шейпа — *ffeeeee*, *efeeeee* и *efeefe* — отсеялись на предыдущих этапах расчета.

Рассчитанные конформационные состояния субстрата протеиназы HIV-1 распадаются на 4 группы: А, В, С и D (табл. 6).

В группу А входят структуры, представляющие собой комбинации конформационно жесткой нуклеации, обнаруженной при расчете фрагментов *c* и *e* на С-концевой части последовательности

Таблица 7. Совмещенные треугольные матрицы энергий внутри- и межостаточных взаимодействий валентно не связанных атомов (ккал/моль) в наиболее низкоэнергетических конформациях шейпов *fffeff* (A), *effefe* (B) и *eeeeee* (D) (соответственно верхняя, средняя и нижняя строки в каждой ячейке). Выделена область, отражающая взаимодействия фрагментов AcSer¹-Asn³ и Pro⁵-Val⁷OMe

	AcSer ¹	Gln ²	Asn ³	Tyr ⁴	Pro ⁵	Ile ⁵	Val ⁷ OMe
AcSer ¹	-0.8	-1.6	-0.8	-1.6	-2.4	-	-
	-0.9	-4.4	-0.6	-1.4	-1.5	-0.3	-3.1
	-1.2	-4.1	-2.7	-	-	-	-
Gln ²		-0.5	-3.4	-0.9	-0.1	-	-
		-0.6	-0.8	-1.2	-0.1	-	-0.2
		-0.2	-1.5	-0.3	-	-	-
Asn ³			-0.1	-2.0	-0.4	-	-
			0.3	-3.8	-0.7	-0.1	-0.1
			-0.1	-0.7	-1.2	-	-
Tyr ⁴				0.7	-3.6	-1.9	-5.5
				0.8	-2.9	-1.8	-1.5
				1.0	-5.1	-3.2	-2.1
Pro ⁵					-0.3	-1.8	-0.7
					0.3	-2.9	-1.1
					0.3	-1.6	-2.0
Ile ⁶						0.2	-2.8
						0.3	-2.0
						0.8	-2.0
Val ⁷ OMe							1.5
							1.8
							1.5

с конформационно лабильными состояниями всех возможных шейпов пептидного скелета, ставших известными из анализа фрагментов *a* и *d*. Эти комбинации образуют самые предпочтительные

в отношении как энергетического фактора, так и энтропийного пространственные формы молекулы. Аналогичным образом построены структуры группы В, отличающиеся от А формой основной цепи С-концевого дипептида. Представители этой группы по сравнению со структурными вариантами группы А имеют в среднем более высокую энергию и не столь многочисленны. Конформации остальных 13 шейпов, образующих группы С и D, значительно менее предпочтительны по энергии, и поэтому их реализация у свободной молекулы маловероятна.

В табл. 7 для самых низкоэнергетических представителей конформаций групп А (*fffeff*) и В (*effefe*), а также полностью развернутой конформации D (*eeeeee*), приведены совмещенные треугольные матрицы энергетических вкладов от внутри- и межостаточных невалентных взаимодействий. На рис. 4 изображены шейпы, дающие ориентировочное представление о форме основных цепей и сближенности остатков в этих конформациях, а на рис. 5 приведена их геометрия, построенная по координатам атомов. Отметим особенности, наглядно иллюстрируемые рис. 4 и 5,

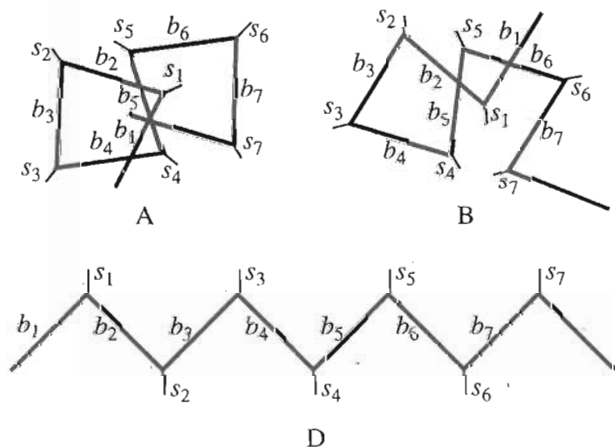


Рис. 4. Шейпы пептидного скелета *fffeff* (A), *effefe* (B) и *eeeeee* (D) субстрата (p17-p24) протеиназы HIV-1 (табл. 6, 7). b_n и s_n обозначают основную и боковую цепь остатка *n*.

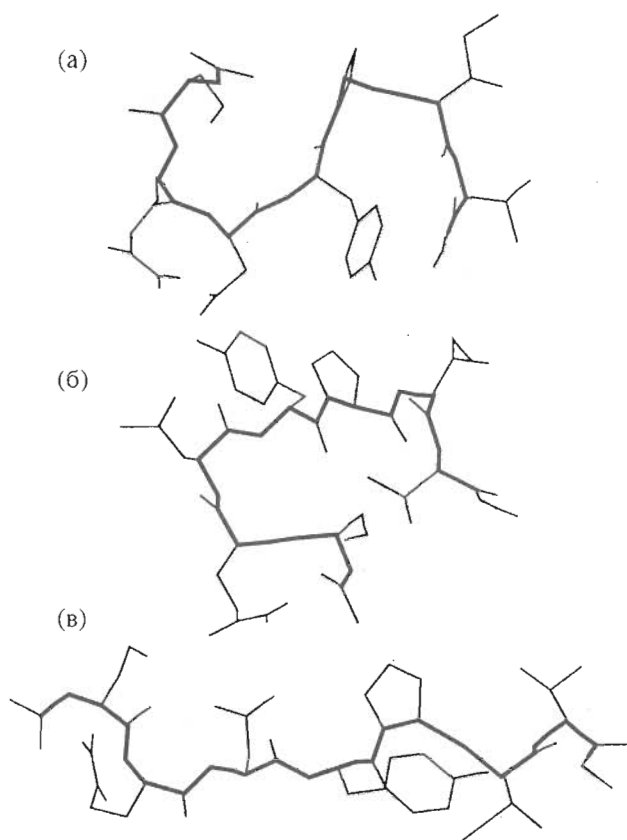


Рис. 5. Конформации $R_{11}^1 - R_{223}^2 - R_{31}^3 - B_{11}^4 - R^5 - R_{32}^6 - B_1^7$ (А; *fffeff*; $\Delta U = 0$ ккал/моль) (а), $B_{11}^1 - R_{333}^2 - R_{21}^3 - B_{31}^4 - R^5 - R_{33}^6 - B_3^7$ (В; *effefe*; $\Delta U = 0.41$ ккал/моль) (б) и $B_{11}^1 - B_{333}^2 - R_{11}^3 - B_{21}^4 - B^5 - B_{33}^6 - R_2^7$ (D; *eeeeee*; $\Delta U = 5.93$ ккал/моль) (в) субстрата (p17–p24) протеиназы HIV-1 (табл. 6, 7).

характерные для всех рассматриваемых структур. Прежде всего обращает на себя внимание то, что они четко делятся на две субматрицы невалентных взаимодействий внутри фрагментов AcSer¹–Tyr⁴ и Tyr⁴–Val⁷OMe и недиагональную часть, отражающую взаимодействия трипептидных фрагментов AcSer¹–Asn³ и Pro⁵–Val⁷OMe, расположенных на противоположных концах последовательности. Во всех случаях элементы обеих субматриц практически совпадают с элементами матриц соответствующих фрагментов, конформации которых рассчитывались независимо.

Для конформаций всех групп характерны также сравнительно небольшие вклады в их стабилизацию за счет взаимодействий между N- и C-концевыми тетрапептидными фрагментами. Количественно об этом можно судить по сумме элементов недиагональной части энергетической матрицы. Взаимодействия, скрепляющие обе части молекулы в единую пространственную структуру, осуществляются боковой цепью остатка Tyr⁴,

занимающего центральное положение. Энергия этих взаимодействий является мерой отклонения от аддитивной суммы энергий конформационных состояний свободных фрагментов AcSer¹–Tyr⁴ (а) и Tyr⁴–Val⁷OMe (с).

В заключение этого сообщения обратим внимание на один результат конформационного анализа молекулы субстрата, представляющий большой интерес при изучении механизма элементарного каталитического акта. Подробно он будет обсужден нами в последующих публикациях. Сейчас лишь отметим, что, согласно данным рентгеноструктурного анализа, субстратоподобные ингибиторы U-85548e [37], JG-365 [38] и MVT-101 [39] имеют в комплексах с аспаргатной протеиназой HIV-1 полностью развернутую форму основной цепи шейпа *eeeeee*. Между тем наш расчет показал, что даже самая низкоэнергетическая конформация этого типа обладает весьма значительной энергией ΔU (5.3 ккал/моль) и, следовательно, нереальна для свободной молекулы субстрата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов Е.М., Кашипаров И.В., Попов М.Е. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22.
2. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
3. Попов Е.М., Кашипаров И.В., Попов М.Е. // Успехи биол. химии. 1994. Т. 34. С. 40–82.
4. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991.
5. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989.
6. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. С. 5–41.
7. Попов Е.М., Алиев Р.Э., Годжаев Н.М. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 2. С. 102–119.
8. Попов Е.М. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 1107–1138.
9. Andreeva N.S., Gustchina A.E., Fedorov A.A. // Adv. Exp. Med. Biol. 1977. V. 95. P. 23–31.
10. Андреева Н.С., Федоров А.А., Гуцина А.Е. // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. С. 922–935.
11. Андреева Н.С., Жданов А.С., Федоров А.А. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. С. 313–322.
12. Sielecki A.R., Fedorov A.A., Boodhoo A., Andreeva N.S., James M.N.G. // J. Mol. Biol. 1990. V. 214. P. 148–170.
13. James M.H.G., Sielecki A.R. // Nature. 1986. V. 319. P. 33–38.
14. Hartsuck J.A., Remington S.J. // Abstr. 18th Linderstrom-Lang Conf. on Aspartic Proteinases (4–8 July 1988, Elsinore). 1988. P. 40.
15. Сафро М.Г., Андреева Н.С., Жданов А.С. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. С. 400–411.
16. Gilliland G.L., Winborne E.L., Nuchman J., Wlodawer A. // Abstr. 18th Linderstrom-Lang Conf. on Aspartic Proteinases (4–8 July 1988, Elsinore). 1988. P. 29.

17. Sielecki A.R., Hayakawa E., Fuginaga M., Murphy M.E.P., Fraser M., Muir A.K., Carilli C.T., Lewicki J.A., Buxter J.D., James M.N.G. // *Science*. 1989. V. 243. P. 1346–1351.
18. Hsu I.N., Delbaere L.T.J., James M.N.G., Hoffman Th. // *Nature*. 1977. V. 266. P. 140–145.
19. James M.H.G., Sielecki A.R. // *J. Mol. Biol.* 1983. V. 163. P. 229–361.
20. Subramanian E., Swan I.D.A., Lin M., Davies D.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 556–559.
21. Wong Chi-h., Lee T.J., Lu T.-H. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. P. 1638–1640.
22. Blundell T., Jenkins J.A., Sewell B.T. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 211. P. 919–941.
23. Subramanian E., Lin M., Swan I.D.A., Davies D.R. // *Adv. Exp. Biol. Med.* 1977. V. 95. P. 33–41.
24. Suguna K., Bott R.R., Padlan E.A., Subramanian E., Sheriff S., Cohan G.A., Davies D.K. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 196. P. 877–900.
25. Fraser M.E., Hayakawa K., Yoshinaka Y. // *Viral Proteinases as Targets for Chemotherapy*. N.Y.: Cold Spring Harbor. Lab., 1989.
26. Miller M., Jaskolski M., Rao M.J.K., Leiss J., Wlodawer A. // *Nature*. 1989. V. 337. P. 576–579.
27. Navia M.A., Fitzgerald P.M.D., McKeever B.M., Springer J.P., Poe M., Bodger J., Hoogsteen K. // *Nature*. 1989. V. 337. P. 615–620.
28. Wlodawer A., Miller M., Jaskolski M., Sathyanarayana B.K., Baldwin E., Weber I.T., Selk I.M., Clawson I., Schneider I.H., Kent S.B. // *Science*. 1989. V. 245. P. 616–621.
29. Andreeva N.S., Zdanov A.S., Gustchina A.E., Fedorov A.A. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 11353–11365.
30. James M.N.G., Sielecki A., Salituro F., Rich F.D.H., Hoffmann T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 6137–6141.
31. James M.N.G., Sielecki A., Hofmann Th. // *Aspartic Proteinases and their Inhibitors* / Ed. V. Kostka. B.; N.Y.: Walte de Gruyter, 1985. P. 163–177.
32. Cooper J.B., Foundling S., Hemminge A., Blundell T.L., Jones D.M., Hallett A., Szelke M. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 169. P. 215–221.
33. Sali A., Veerapandian B., Cooper J.B., Blundell T.L., Jones D.M., Hallett A., Szelke M. // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 2179–2188.
34. Cooper J.B., Foundling S., Boger J., Jupp R.A., Kay J., Blundell T.L. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 8596–8603.
35. Bott R., Subramanian E., Davies D. // *Biochemistry*. 1982. V. 28. P. 6956–6962.
36. Suguna K., Padlan E.A., Smith C.M., Carlson W.D., Davies D.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. P. 7009–7013.
37. Jaskolski M., Tomasselli A.G., Sawyer T.K., Staples D.S., Hendrikson R.L., Sneider J., Kent S.B.H., Wlodawer A. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 1600–1609.
38. Swain A.L., Miller M., Green J., Rich D.H., Schneider J., Kent S.B.H., Wlodawer A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 8805–8809.
39. Miller M., Schneider J., Sathyanarayana B.K., Carlson W.D., Davies D.R. // *Science*. 1989. V. 246. P. 1149–1152.
40. Sali A., Verapandian B., Cooper J.B., Foundling S.I., Hoover D.J., Blundell T.L. // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 2179–2188.
41. Попов Е.М. // *Int. J. Quant. Chem.* 1979. V. 16. P. 707–737.
42. Попов Е.М. // *Успехи химии*. 1994. Т. 63. С. 1004–1026.
43. Akhmedov N.A., Akhverdieva G.A., Godjaev N.M., Попов Е.М. // *Int. J. Peptide Protein Res.* 1986. V. 27. P. 95–111.
44. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature // *Biochem. Biophys. Acta*. 1971. V. 19. P. 1–17.
45. Schimmel P.R., Flory P.J. // *J. Mol. Biol.* 1968. V. 34. P. 105–120.
46. Sheraga H.A. // *Adv. Phys. Org. Chem.* 1968. V. 6. P. 103–184.
47. Попов Е.М., Липкин Г.М., Архипова С.Ф. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1971. № 2. С. 312–319.

Mechanism of Action of Aspartic Proteases. 2. Conformational Possibilities of a Substrate of the HIV-1 Protease

M. E. Popov, I. V. Kashparov, and E. M. Popov

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

Abstract—Theoretical conformational analysis of a hexapeptide fragment p17–p24 of the native substrate of the HIV-1 protease was reported. The geometrical and energy parameters of all possible optimal conformations were determined. The data which are necessary for the calculation of the mechanism of the catalytic act of HIV-1 protease were obtained.

Key words: aspartic proteases; HIV-1 protease, substrates; conformational analysis.