



УДК 577.15.2.342

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСПАРТИЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ. VI\*. НЕВАЛЕНТНЫЕ ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОРНЫЙ И ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫЙ КОМПЛЕКСЫ АСПАРТИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ РИЗОПУСПЕПСИНА

© 1999 г. И. В. Кашпаров<sup>#</sup>, М. Е. Попов, Л. Д. Румш, **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 10.07.98 г. Принята к печати 15.04.99 г.

Методом теоретического конформационного анализа априорно воспроизведена структура комплекса грибной аспартильной протеиназы – ризопуспепсина с субстратоподобным ингибитором Pro1-Phe2-His3-Phe4-ψ(CH<sub>2</sub>-NH)-Phe5-Val6. Процедура поиска энергетически предпочтительных структурных вариантов лиганда основана на фрагментарном подходе с использованием динамической библиотеки пептидных фрагментов, последовательно наращиваемых в потенциальном поле белка. Среднеквадратичное отклонение положения атомов в рассчитанной конформации ингибитора и экспериментальной структуре составило 0.56 Å.

Аналогичный подход был использован для моделирования невалентного комплекса ризопуспепсина со специфическим субстратом Pro1-Phe2-His3-Lys4-Phe5-Val6. В результате рассчитаны две изоэнергетические структуры комплекса, различающиеся расположением расщепляемой пептидной группы и нуклеофильной молекулы воды. Рассмотрена возможность реализации каждой из этих конформаций в процессе каталитического акта. Показано отсутствие каких-либо структурных предпосылок для индукции искажения расщепляемой связи в активном центре фермента. На основании полученных структурных данных сделано предположение о возможности протонирования Asp35 не в основном состоянии комплекса, а позже, на стадии образования промежуточного тетраэдрического соединения.

*Ключевые слова:* катализ; аспартильные протеиназы; ризопуспепсин; компьютерное моделирование.

### ВВЕДЕНИЕ

Нелинейный и неравновесный процесс фермент-субстратных взаимодействий индуцирует синхронные и строго упорядоченные молекулярные перестройки, обеспечивающие сближенность и соответствующую ориентацию каталитических атомных групп реагирующих молекул. Первый этап таких взаимодействий заканчивается образованием продуктивного невалентного фермент-субстратного комплекса.

Поскольку динамические конформационные свойства взаимодействующих молекул предопределяют продвижение системы по координате химической реакции, то изучение деталей строения комплекса фермента с его специфическим субстратом в предкаталитической стадии является ключом к изучению специфики механизма каталитического акта на атомно-молекулярном уровне.

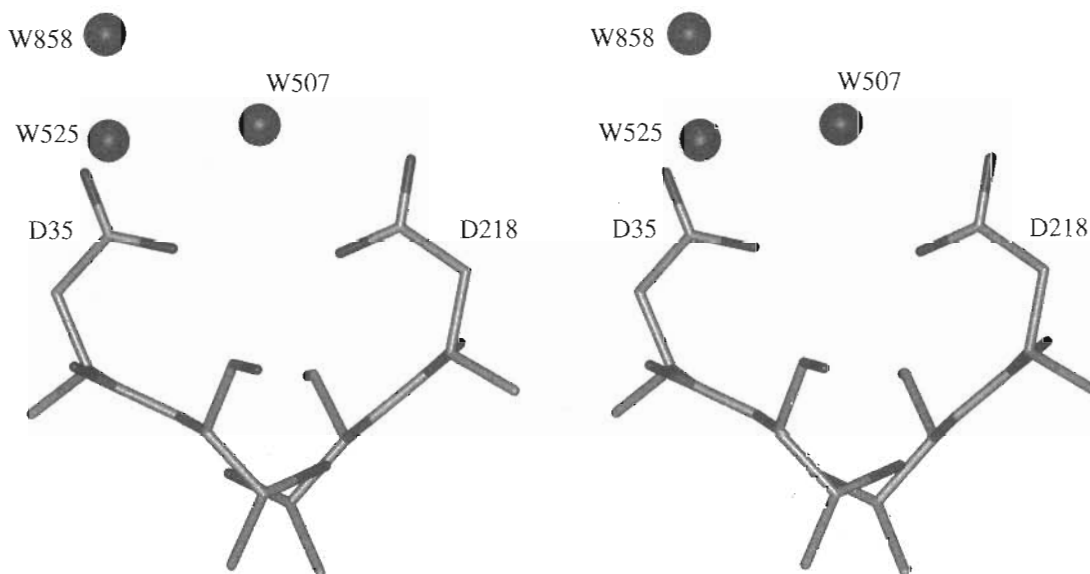
Предложенный одним из нас теоретический подход к изучению биокатализа [2] исходит из

предположения о возможности независимого и поочередного рассмотрения конформационных и электронных аспектов ферментативной реакции.

Невалентные фермент-субстратные взаимодействия реализуются, как правило, в системах, состоящих из многих сотен атомов. Поэтому их количественный анализ может проводиться лишь на основе подходов молекулярной механики и динамики с привлечением полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов. Есть все основания полагать, что решение на этой классической основе многоатомной конформационной задачи откроет перспективу для исследований на квантово-механической основе химических стадий катализа, протекающих в ограниченном объеме и для ограниченного числа атомов [3]. Можно также ожидать, что полученные в результате классического и квантово-механического моделирования количественные характеристики взаимодействия между ферментом и субстратом позволят описать все стадии каталитического акта как спонтанный и согласованный процесс.

\* Сообщение V см. [1].

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: ilko@enzyme.siobc.ras.ru).



**Рис. 1.** Молекулы связанной воды W507, W858, W525 в активном центре нативного ризопуспепсина [5], потенциально способные выполнять функции нуклеофила.

Используемый подход к изучению особенностей каталитического механизма аспартильных протеиназ ранее был апробирован в исследовании фермент-субстратных взаимодействий сериновых протеиназ  $\alpha$ -химотрипсина и  $\beta$ -трипсина со своими специфическими субстратами и ингибиторами [2]. Априорный количественный анализ привел к развитию системы взглядов о природе и побудительных мотивах биокатализа.

В настоящей работе на примере аспартильной протеиназы ризопуспепсина рассматриваются результаты решения конформационной задачи о взаимодействии низкомолекулярных лигандов с субстратсвязывающим участком ризопуспепсина на стадии образования невалентного фермент-субстратного комплекса Михаэлиса.

#### НЕВАЛЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ АСПАРТИЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ С ИНГИБИТОРАМИ И ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ О СОСТОЯНИИ РАСЩЕПЛЯЕМОЙ СВЯЗИ В СУБСТРАТЕ

Принято считать, что катализ гидролиза пептидных и сложноэфирных связей с участием аспартильных протеиназ протекает по общекислотному – общесновному (а не ковалентному) механизму, в котором роль нуклеофила приписывается молекуле воды, валентно не связанной с ферментом [4].

Свободный от лиганда активный центр ризопуспепсина и ряда других представителей этого семейства протеиназ содержит, по данным рентгеноструктурного анализа [5], одну или несколь-

ко молекул связанной воды, находящихся в непосредственной близости от гидролизуемой пептидной группы субстрата и потенциально способных выполнить роль атакующего агента. В структурной организации ризопуспепсина интерес, с этой точки зрения, представляют три из них, обозначаемые как W507, W858 и W525 (рис. 1) [5]. Все они, однако, вытесняются при связывании ингибитора [6]. Наблюдаемый уход молекул связанной воды из каталитической области фермента, имеющий место не только для ингибиторных комплексов ризопуспепсина, но и для большинства известных невалентных комплексов аспартильных протеиназ с различными по химическому составу пептидными и непептидными ингибиторами [7], чрезвычайно затрудняет выбор реагирующих групп – участников каталитического акта на основании лишь одних экспериментальных данных. Имеющийся на сегодняшний день обширный кристаллографический материал не позволяет однозначно решить взаимозависимые вопросы о выборе атакующего расщепляемую связь нуклеофила и об ориентации расщепляемой связи относительно каталитически активных групп белка. Именно по этой причине на основании чрезвычайно сходного экспериментального материала различными авторами была предложена не одна, а несколько различных стереохимических моделей катализа (см. обзор [3]). В предлагаемых структурах выбор групп – участников каталитического акта – сильно зависит от исходных посылок, используемых при построении модели. Это прежде всего касается положения, занимаемого в комплексе Михаэлиса карбоксильным кислородом расщепляемой

группы субстрата. Рассмотрим эту ситуацию подробнее.

Экспериментальные данные по имеющимся фермент-ингибиторным комплексам аспартильных протеиназ предполагают две возможности взаимного расположения расщепляемой связи субстрата относительно каталитических групп фермента.

1. Для ингибиторов пепстатинового типа гидроксильная группа статина занимает положение центральной (см. рис. 1) молекулы воды W507 (нумерация ризоупспепсина) и, если это отвечает положению карбоксильного кислорода специфического субстрата, то возможное положение атакующего нуклеофила должно изучаться дополнительно. Один из вариантов, предложенный в работе [8] на основании изучения невалентных комплексов пенициллопепсина, предполагает в качестве нуклеофила молекулу воды, соответствующую в ризоупспепсине атому W858 и занимающую, по мнению авторов, оптимальную позицию как для атаки карбоксильного атома углерода, так и для образования водородной связи с остатком Asp35, выступающим в роли общего основания.

2. В случае если статиновый гидроксил соответствует положению нуклеофильной молекулы воды [6, 9, 10], расщепляемая группа субстрата должна принять иную ориентацию относительно каталитических остатков активного центра. При этом, как считают авторы работ [6, 9], ей соответствует энергетически невыгодная, искаженная конформация, облегчающая протекание катализа и позволяющая молекуле предполагаемого нуклеофила оставаться в положении, оптимальном для атаки на карбоксильный углерод.

Выбор между этими представлениями при наличии лишь экспериментального материала по фермент-ингибиторным комплексам, всегда отличающимся (в чем именно, неизвестно) от продуктивного комплекса Михаэлиса, в существенной степени зависит от субъективных предпочтений исследователя. В таких случаях сюжетов может быть много и потому выбор адекватного подхода к решению задачи невозможен, на наш взгляд, без привлечения теоретических методов исследования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления деталей расположения расщепляемой пептидной связи относительно каталитических остатков активного центра мы предприняли попытку априорного расчета геометрии связывания олигопептидных субстратов с ферментом-мишенью – аспартильной протеиназой ризоупспепсина. Структурная модель исследования строилась на основании данных о геометрии

[5, 6] и конформационных свойствах аминокислотных остатков субстратсвязывающих участков указанных ферментов [1] с использованием формальных критериев поиска и отбора предпочтительных конформаций лиганда в потенциальном поле фермента по методу, изложенному ниже.

При решении такого рода задач определение геометрии фермент-ингибиторного комплекса служит “пробным камнем” для проверки адекватности выбранного метода: удовлетворительное предсказание геометрии субстратоподобного негидролизуемого аналога позволяет перейти к расчету особенностей связывания близкого к нему по химическому строению специфического субстрата.

При проведении вычислений мы не привлекали никакие известные из эксперимента представления о связывании молекул лигандов и до окончания моделирования не постулировали никаких структурных особенностей исследуемой ферментной системы экспериментального или феноменологического плана. Предполагалось, что все существенные для протекания каталитического акта характеристики рассматриваемых невалентных комплексов должны выявляться расчетным методом автоматически на основании формальных критериев поиска и отбора предпочтительных структурных вариантов.

### *Модель и метод расчета*

Предложенный нами метод поиска энергетически предпочтительных структур лигандов в активном центре протеиназ основан на фрагментарном подходе, включающем анализ всех возможных конформационных состояний фрагментов в потенциальном поле фермента при постепенном наращивании длины молекулы.

Для решения задачи по расчету геометрии связывания фермент-ингибиторного комплекса в качестве модельного объекта был выбран гексапептидный фрагмент Pro1-Phe2-His3-Phe4-ψ(CH<sub>2</sub>-NH)-Phe5-Val6 (номенклатура согласно Спатолы [11]) ингибитора аспартильной протеиназы ризоупспепсина, имеющий восстановленную пептидную связь между остатками Phe4 и Phe5. Ранее, его структура в комплексе с ферментом была изучена методом рентгеноструктурного анализа, а кристаллографические данные помещены в Международный банк трехмерных структур ([www.pdb.bnl.gov](http://www.pdb.bnl.gov), 3apr) [6]. Координаты атомов указанной структуры использовались нами для построения структурной модели фермент-ингибиторного и фермент-субстратного комплексов. Аналогичное, но независимое исследование комплексов ретровирусной протеиназы HIV-1 было проведено с использованием ингибитора JG-365 [12], представляющего собой гептапептид Ac-Ser1-Leu2-

Asn3-Phe4-ψ[СНОН-СН<sub>2</sub>]-Pro5-Ile6-Val7-ОМе, в котором расщепляемая пептидная связь между остатками Phe4 и Pro5 заменена негидролизуемой этиламинной связью. Результаты этой работы в настоящее время готовятся к печати.

При построении структурной модели ризоупепсина считались известными координаты атомов субстратсвязывающего участка фермента и молекул связанной воды, расположенных в радиусе 7 Å от каждого атома ингибитора (всего таких остатков насчитывается 48). Координаты атомов молекулы ингибитора считались неизвестными и поэтому не использовались для теоретического предсказания его положения в поле активного центра фермента. Единственное исключение составили координаты азота остатка Pro1, положение которого задавалось интерактивно. Принимая, однако, во внимание относительную удаленность этого атома от чувствительного места каталитического центра протеиназы и тот факт, что определение координат остальных 112 атомов молекулы ингибитора было выполнено независимым образом, проведенное исследование можно считать в существенной степени априорным.

При расчете учитывались невалентные и электростатические взаимодействия всех валентно не связанных атомов, водородные связи и заторможенное вращение вокруг одинарных и π-сопряженных (пептидных) связей боковых и основных цепей остатков. Энергия невалентных взаимодействий оценивалась по потенциалу Леннарда-Джонса с параметрами Скотта и Шераги [13], электростатические взаимодействия – в монополярном и дипольном приближениях с парциальными зарядами на атомах, предложенными в работе Момани и соавт. [14], при диэлектрической постоянной ε, равной 4, соответствующей малой полярности среды в области контактов активного центра и лиганда [15]. Водородные связи описывали потенциалом типа Морзе с оптимальным значением энергии связи 2.0 ккал/моль [16]. Торсионные потенциалы вращения вокруг связей субстрата и боковых цепей подвижных остатков взяты из работы Момани и соавт. [14]. Положение всех остатков лигандсвязывающего участка на этапе поиска начальных приближений фрагментов считались фиксированными, однако на стадии оптимизации полученных начальных приближений боковые цепи остатков фермента раскрепощались и оптимизировались в своих экспериментальных локальных минимумах совместно с фрагментами ингибитора. Оптимизация найденных конформаций фрагментов осуществлялась программой Newton комплекса Tinker [17] с использованием потенциального поля Amber-95 [18].

Профиль потенциальной поверхности лигандсвязывающего участка белка формируется дисперсионными взаимодействиями. Именно этот

компонент внутренней энергии благодаря резкой ( $\sim 1/R^{12}$ ) зависимости от расстояния ( $R$ ) между взаимодействующими атомами ответственен за формирование локальных конформационных минимумов и максимумов, тогда как электростатический компонент потенциала, более мягко зависящий от расстояния ( $\sim 1/R$  и  $\sim 1/R^2$  для взаимодействий типа “заряд-заряд” и “диполь-диполь” соответственно), а также водородные связи влияют лишь на распределение разрешенных пространственных структур в шкале их энергетической предпочтительности. Поэтому оценка профилей потенциальной поверхности и отбор предпочтительных конформаций для фрагментов лиганда производился с использованием только потенциальной функции дисперсионных и торсионных взаимодействий, а их оптимизация – с учетом полного потенциала, включающего электростатический компонент (в монополярном и дипольном приближении) и потенциал водородных связей.

Процедуру поиска оптимальных пространственных форм лиганда и оценку их энергетической предпочтительности рассмотрим на примере дипептидного фрагмента Pro1-Phe2, ингибитора ризоупепсина. Координаты атома азота первого остатка (Pro1) были взяты из эксперимента [6]. Возможные положения в пространстве пролинового цикла в предположении жесткой валентной схемы определяются значениями виртуальных (фиктивных) двугранных углов вращения α, β и γ вокруг ортогональных связей с малыми длинами, такими, что при изменении указанных двугранных углов положение атома азота можно было считать фиксированным (рис. 2а). С помощью анализа попарной зависимости энергии невалентных взаимодействий как функции трех пар углов – α-β, α-γ и β-γ – путем построения конформационных карт (сечений функции потенциальной энергии в координатах указанных двугранных углов) были выявлены области с низкой энергией, определяющие возможные положения пролинового кольца и карбонильного атома углерода этого остатка. Всего при таком попарном рассмотрении зависимости внутренней энергии стабилизации от значений виртуальных углов вращения α, β, γ было выявлено 9 возможных положений пролинового цикла относительно остатков субстратсвязывающего участка (рис. 3). При этом конформация, близкая к экспериментальной, имела наиболее низкую среди всех найденных структур внутреннюю энергию (-21.2 ккал/моль против -18.4 у ближайшей в распределении по энергии конформации).

Далее фрагмент наращивался на 2 атома (рис. 2б) и для значений пары углов α-β, соответствующих наиболее низкоэнергетическим областям на конформационной карте, положение пролинового цикла уточнялось путем построения карты γ-ψ<sub>1</sub> (Pro1) для всех обнаруженных вариантов (рис. 4а). Далее для всех найденных структур

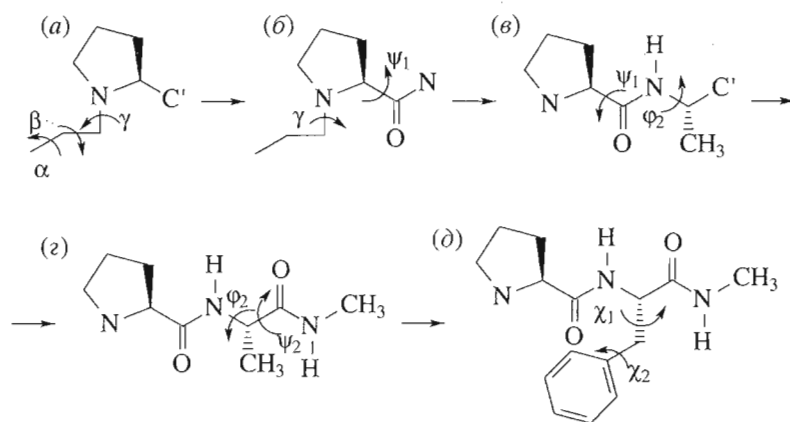


Рис. 2. Схема и этапы (а)–(д) расчета энергетически предпочтительных конформационных состояний пептидного лиганда в активном центре ризопуспепсина на примере дипептидного фрагмента Pro1 – Phe2.

ных вариантов с помощью программы Newton комплекса Tinker [17] в силовом поле Amber-95 [18] проводилась минимизация энергии и поиск их оптимальной геометрии.

На следующем этапе исследовались конформационные возможности пептидной группы между остатком Pro1, считавшимся неподвижным, и остатком Phe2, у атома  $C^\alpha$  которого находятся метильная группа и карбонильный углерод. Возможные положения этого фрагмента в активном центре определяются по конформационной карте  $\psi_1$ - $\psi_2$  при фиксированном значении двугранного угла  $\omega$  пептидной группы, равном  $180^\circ$  (рис. 2в). Один из вариантов сечений потенциальной поверхности, построенной для локальной ориентации остатка Pro1, близкой к экспериментальной, приведен на рис. 4б. Наборы найденных разрешенных значений угла  $\psi_1$  служили исходными вариантами для вариации углов  $\psi_2$ - $\psi_2$  (рис. 2г), определяющих положение основной цепи остатка Phe2 (рис. 4в). При этом боковая цепь остатка Phe2 временно заменялась на аланиновую. На последующем шаге для набора конформационных точек по углу  $\psi_2$  определялись возможные положения боковой цепи Phe2 (рис. 4г) и проводилась оптимизация дипептидного фрагмента Pro1–Phe2 (рис. 2д). В результате ступенчатого наращивания структуры рассматриваемого дипептидного фрагмента ингибитора и анализа его разрешенных конформационных состояний было найдено 4 группы пространственных форм с внутренней энергией в интервале от  $-30$  до  $-70$  ккал/моль, представленных 51 структурой.

Первая группа конформаций представлена вариантами, у которых остаток Phe2 не способен образовывать стабилизирующие контакты с остатками субстратсвязывающего участка, так как ориентирован в сторону растворителя. Профиль его потенциальной поверхности в поле фермента напоминает таковой у свободного остатка Ala.

Энергия этой группы конформаций была самой высокой:  $-20 \dots -22$  ккал/моль.

Следующая группа пространственных вариантов с энергией стабилизации  $-27 \dots -31$  ккал/моль характеризуется возможностью для остатка Phe2 образовывать немногочисленные невалентные контакты остатками Ile15, Phe278, Glu279 субстратсвязывающего участка.

Большое семейство рассчитанных конформаций с энергией от  $-36$  до  $-40$  ккал/моль включает структуры, в которых остаток Phe2, находясь в локусе связывания следующего в цепи ингибитора остатка His3, способен образовывать хорошие стабилизирующие контакты с остатками субстратсвязывающего участка фермента: фрагментами Gly220–Ile225 и Gly78–Asp79. Однако последующие этапы поиска предпочтительных конформа-

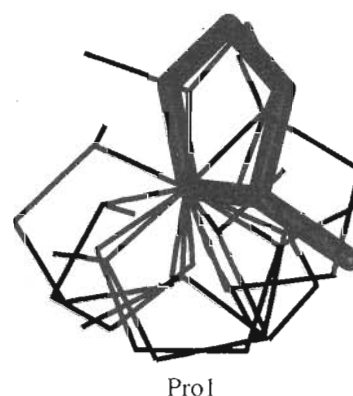
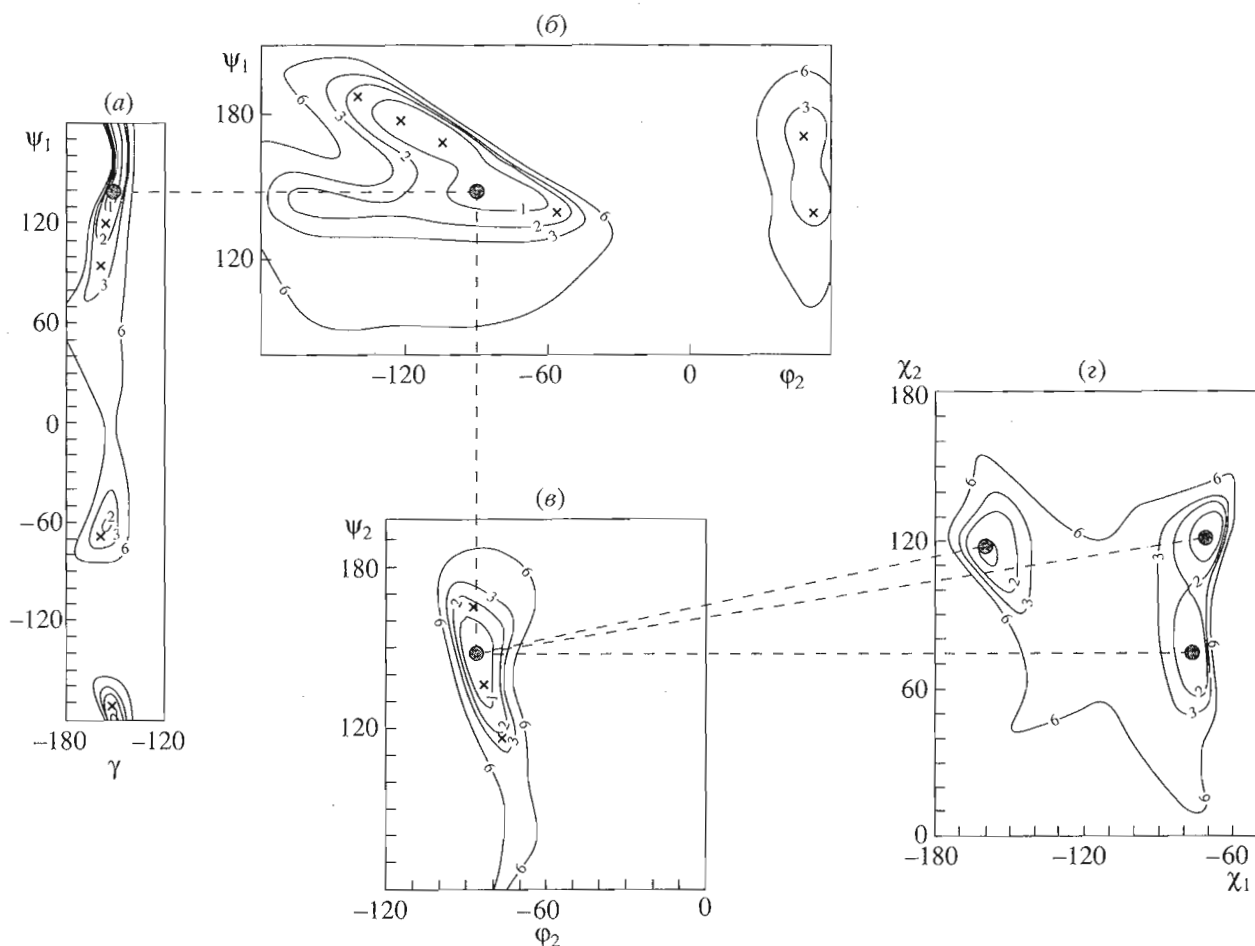


Рис. 3. Возможные энергетически предпочтительные ориентации пирролидинового цикла остатка Pro1 ингибитора в потенциальном поле субстратсвязывающего участка ризопуспепсина. Выделенная конформация, самая предпочтительная в полученном энергетическом распределении, совпадает с экспериментально наблюдаемой [6] структурой аналогичного остатка в ингибиторе.



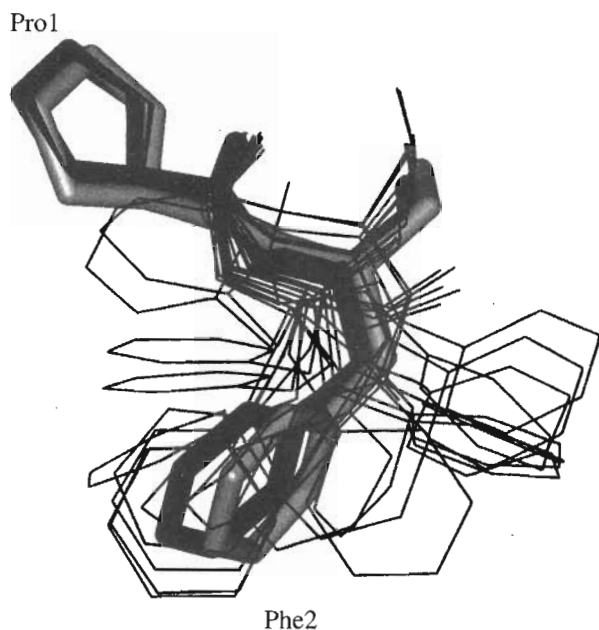
**Рис. 4.** Конформационные карты для определения возможных конформационных состояний фрагмента Pro1–Phe2 отражают зависимость внутренней энергии фрагментов, показанных на рис. 2, как функцию значений пар двугранных углов вращения вокруг указанных связей. Крестиками на картах обозначены все начальные приближения, выбиравшиеся для последующих этапов пофрагментного наращивания цепи Pro1–Phe2 исследуемого лиганда. Кругами обозначены конформационные точки, использованные в качестве начальных приближений для построения конформационных карт, показанных на рисунке и характеризующие модельную геометрию, наиболее близкую к экспериментальной структуре. Пунктиром обозначена связь в ряду начальных приближений, наиболее близких к экспериментальной структуре. Цифрами на эквипотенциалах обозначены значения относительной энергии (ккал/моль).

ций выявили бесперспективность ориентации основной цепи ингибиторного фрагмента Phe2–His3 в отношении возможности дальнейшего беспрепятственного наращивания основной цепи лиганда для всех представителей этой группы пространственных форм.

Последнюю группу конформаций представляют структурные варианты с ориентацией вектора, образованного координатами атомов  $C^\alpha(\text{Pro1})-C^\alpha(\text{Phe2})$ , приблизительно соответствующей экспериментальной структуре (рис. 5). Эти конформации характеризуются наиболее низкой энергией стабилизации среди всех рассчитанных нами пространственных вариантов дипептида. Для различных представителей пространственных форм этой группы конформаций с несколько отличающимися значениями углов  $\Psi_1$  (Pro1),  $\Phi_2$  (Phe2) и разрешенными положениями боковой

цепи остатка Phe2, значения внутренней энергии межостаточных взаимодействий находились в интервале от  $-38.0$  до  $-70.0$  ккал/моль. Лучшая конформация имеет энергию  $-70.0$  ккал/моль. В этой конформации фрагмента Pro1–Phe2 основная цепь совпадает с экспериментальной, а боковая цепь остатка Phe2 находится в кармане связывания остатка в  $P_1$ -положении (Phe4 у ингибитора [6]). Ей практически не уступает (разница в  $0.8$  ккал/моль) конформация, полностью совпадающая с экспериментальной структурой (рис. 5).

Анализ полученных структурных вариантов позволил выявить дифференциацию по энергии для конформаций, близких к экспериментально наблюдаемой, уже на этапе поиска оптимальных конформаций дипептидного фрагмента Pro1–Phe2 ингибитора. Для самых энергетически предпочтительных пространственных форм геометрия ос-



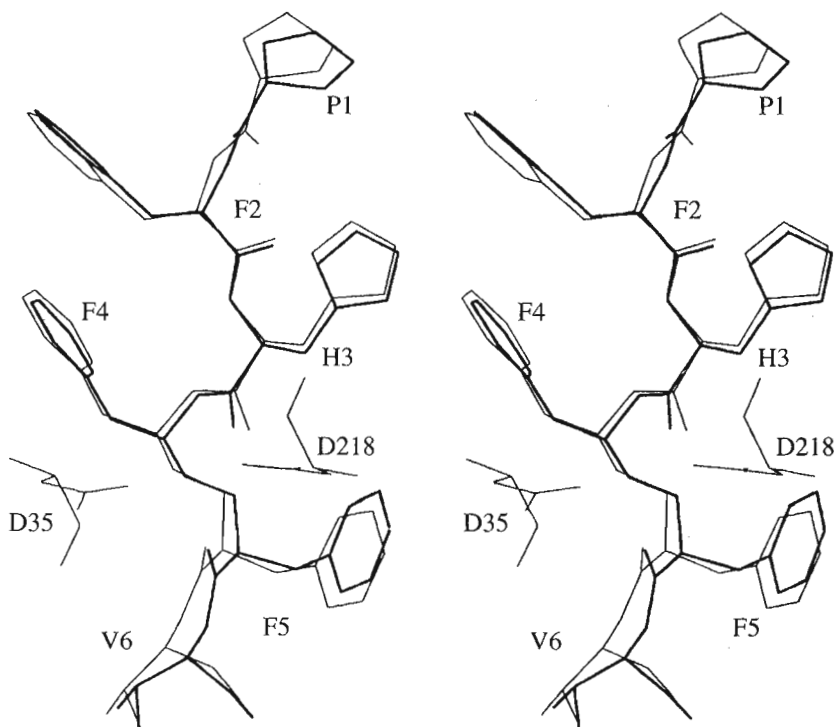
**Рис. 5.** Подмножество разрешенных конформаций дипептида Pro1-Phe2 в субстратсвязывающем участке ризопуспелсина, найденных с помощью теоретического моделирования. Показаны конформации, соответствующие самому низкоэнергетическому состоянию остатка Pro1. Черным цветом показан фрагмент экспериментально наблюдаемой [6] структуры; серым – пространственный вариант модели с одним из самых низких значений энергии фрагмента Pro1-Phe2. Видно хорошее совпадение геометрии этого фрагмента в рассчитанной и экспериментальной структурах.

татка Pro1 и фрагмента основной цепи Pro1-Phe2 соответствовала экспериментальной. Отличия касались только состояния боковой цепи остатка Phe2, для которой, в соответствии с профилем потенциальной поверхности фермента, реализовывались локальные минимумы с различием по углам  $\chi_1$  и  $\chi_2$  (рис. 4z). Все потенциально разрешенные конформационные состояния дипептида с типом связывания, отличным от экспериментального, уступали по внутренней энергии лучшим найденным конформациям на величину от 20.0 до 50.0 ккал/моль.

Последующий анализ всех возможных структурных вариантов, проводившийся по описанной выше схеме для следующих остатков His3-Val6 молекулы ингибитора, позволил выявить их потенциальные конформационные возможности в поле белка и определить глобальную по энергии внутри- и межостаточных взаимодействий пространственную форму, геометрия которой практически полностью совпала с экспериментальной.

Окончательный результат моделирования комплекса ризопуспелсина с субстратоподобным пептидным ингибитором представлен на рис. 6. Конформационные параметры самой низкоэнергетической конформации комплекса хорошо соответствуют кристаллографической структуре.

Среднеквадратичное отклонение положения атомов экспериментального и теоретического вариантов молекул лигандов составило соответ-



**Рис. 6.** Стереопара: совмещение экспериментальной (тонкая линия) и рассчитанной (жирная линия) структур молекулы ингибитора в активном центре ризопуспелсина.

*Фермент-субстратный  
комплекс ризопуспепсина*

**Таблица 1.** Теоретически рассчитанные (верхние значения в ячейках таблицы) и экспериментальные (нижние значения) конформационные параметры (град) и энергетические вклады (ккал/моль) отдельных остатков молекулы ингибитора Pro1-Phe2-His3-Phe4- $\psi$ [CH<sub>2</sub>-NH]-Phe5-Val6 с восстановленной пептидной связью. Жирным шрифтом выделены углы, формирующие восстановленную псевдопептидную связь

Остаток	$\phi$	$\psi$	$\omega$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\Delta U$ , ккал/ моль
Pro1		120 163	177 179				-25.7
Phe2	-82 -114	168 158	-175 180	-59 -66	-60 -41		-16.7
His3	-145 -140	40 65	-173 180	-51 -49	63 64		-39.9
Phe4[ $\psi$ ]	-88 -99	<b>60</b> <b>59</b>	<b>121</b> <b>129</b>	-49 -48	-30 -33		-37.1
Phe5	<b>-76</b> <b>-84</b>	157 165	171 176	70 67	105 97		-53.6
Val6	-74 -113	111 152		61 65	180	180	-8.4

ственно 0.58 и 0.54 Å при совмещении по атомам основных цепей остатков субстратсвязывающего участка и атомам ингибитора. Теоретически рассчитанный комплекс в своей наиболее предпочтительной по энергии пространственной форме сохраняет присущую экспериментальной структуре сеть межмолекулярных контактов, включая водородные связи. Геометрические параметры ингибитора и энергетические вклады его остатков в общую энергию невалентных взаимодействий представлены в табл. 1. Из ее рассмотрения следует, что наибольший вклад в стабилизацию комплекса вносят остатки Phe4[ $\psi$ ] и Phe5, то есть фрагмент  $P_1-P_1'$ , определяющий чувствительность ризопуспепсина к ингибитору. Основную роль в суммарном потенциале взаимодействия для этого дипептида играет энергия электростатических взаимодействий, благодаря целочисленному положительному заряду группы N<sup>+</sup>H<sub>2</sub> аналога расщепляемой связи. Протоны ее иминного атома азота способны образовывать водородные связи с карбоксильными группами каталитических остатков аспарагиновой кислоты Asp35 и Asp218. При этом рассматриваемый фрагмент молекулы субстрата вытесняет находящуюся в активном центре аспаргилиных протеиназ молекулу связанной воды W507, предположительно способную играть роль нуклеофила, атакующего расщепляемую пептидную группу субстрата [6, 9, 10].

Априорный расчет фермент-ингибиторного комплекса ризопуспепсина предоставил возможность провести сопоставление независимо полученных данных теории и эксперимента. Результат такого сопоставления, демонстрирующий хорошее соответствие рассчитанной и кристаллографической структур ингибиторного комплекса, позволил перейти к аналогичному, но независимо определению геометрии невалентного фермент-субстратного комплекса ризопуспепсина. Это исследование ставило своей целью получить ответы на следующие вопросы:

1. Каковы возможные состояния гидролизуемой пептидной связи в невалентном комплексе Михаэлиса и каковы факторы структурной стабилизации, необходимые для отбора и поддержания предпочтительных конформаций субстрата в активном центре фермента?

2. Каковы структурные основы субстратной специфичности ризопуспепсина?

3. В какой мере справедливо предположение о необходимости структурного несоответствия молекулы субстрата и субстратсвязывающего участка фермента, приводящего к стерическому искажению гидролизуемой связи, обычно постулируемому феноменологическими концепциями ферментативного катализа?

В соответствии с имеющимися в литературе предположениями о возможных состояниях расщепляемой связи субстрата в активном центре [8] и [6] определение низкоэнергетических конформационных состояний субстрата в субстратсвязывающем участке ризопуспепсина проводилось в двух начальных приближениях: в отсутствие в активном центре молекулы связанной воды W507 (комплекс 1) и с учетом взаимодействия с ней (комплекс 2).

Для определения структуры невалентного фермент-субстратного комплекса ризопуспепсина применялся подход, аналогичный тому, который был использован для расчета геометрии его фермент-ингибиторного комплекса. Гексапептидный субстрат Pro1-Phe2-His3-Lys4-Phe5-Val6 отличается от рассмотренного ингибитора лишь одной заменой в четвертом положении: вместо остатка Phe4- $\psi$ [CH<sub>2</sub>] он содержит стандартный остаток Lys, в расщеплении пептидной связи которого с Phe5 фермент проявляет повышенную активность [19].

Наиболее энергетически предпочтительные конформации всей молекулы лиганда минимизировались в потенциальном поле активного центра с помощью программы Newton комплекса Tinker как и в случае расчета ингибиторного комплекса [17].



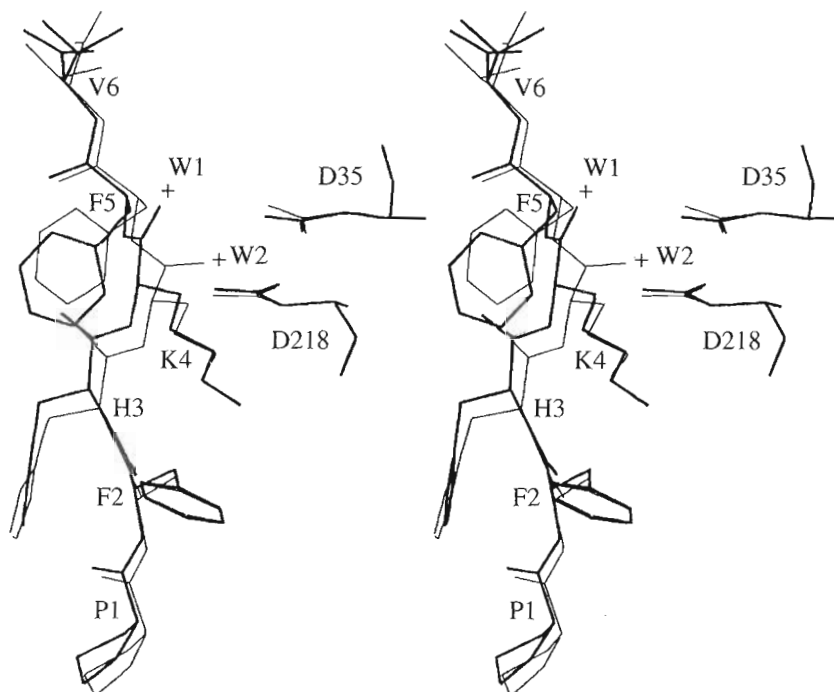


Рис. 7. Стереопара: совмещение наиболее низкоэнергетических конформаций молекулы субстрата ризоупспесина, полученных в двух начальных приближениях: при отсутствии молекулы связанной воды W507 (комплекс 1, тонкая линия) и при ее присутствии в активном центре (комплекс 2, жирная линия).

Помимо молекулы лиганда в процедуру оптимизации включались боковые цепи каталитических остатков Asp35 и Asp218 и фрагмент Ser74–Ser81, представляющий собой часть  $\beta$ -петли, прикрывающей каталитическую область от контакта с растворителем (так называемый флеп (flap)). Координаты остальных остатков субстратсвязывающего участка считались фиксированными.

Для каждой структурной модели (с молекулой связанной воды W507 и без нее) конформационный анализ позволил выявить в активном центре несколько близких по энергии пространственных форм со сходным расположением основной цепи и несколько отличающимися состояниями боковых цепей остатков Lys4 и C-концевого остатка Val6.

Все энергетически предпочтительные варианты субстрата принимают в активном центре фермента вытянутую конформацию со значениями двугранных углов  $\phi$ ,  $\psi$  основной цепи, характерными для  $\beta$ -структуры. Центральный фрагмент Lys4–Phe5 ( $P_1$ – $P'_1$ ) и каталитические остатки Asp35 и Asp218 активного центра экранированы от растворителя флепом.

Две самые предпочтительные по энергии конформации – комплекс 1 и комплекс 2 (рис. 7) – с учетом энергетических вкладов всех остатков, включенных в процесс минимизации энергии, имеют весьма сходную энергию внутри- и межостаточных взаимодействий. Для первого и второго

вариантов она составила соответственно  $-202.0$  и  $-209.0$  ккал/моль.

Структурные и энергетические характеристики соответствующих конформаций приведены в табл. 2.

Мы предполагали, что рассмотрение двух структурных моделей позволит на основании объективных критериев (невозможность реализации какой-либо из моделей, существенное различие по внутренней энергии комплекса) выявить единственно возможный вариант комплекса. Однако этого не произошло. Анализ конформационных свойств субстрата в активном центре ризоупспесина (при учете и игнорировании взаимодействий с W507) выявил возможность реализации двух принципиально отличающихся друг от друга ориентаций расщепляемой пептидной связи относительно каталитических групп фермента. Различие между ними обусловлено конформационным состоянием центрального дипептида Lys4–Phe5 (табл. 2) и затрагивает три его двугранных угла  $\psi_4$ ,  $\omega_{4-5}$  и  $\phi_5$ . Описанная ситуация, однако, как это следует из рис. 8 и табл. 2, практически не сказывается на состоянии боковых цепей Lys4 и Phe5. В случае комплекса 1 расщепляемая пептидная группа субстрата располагается относительно каталитических остатков Asp35 и Asp218 таким образом, что ее карбонильный кислород занимает положение связанной молекулы воды W507 (рис. 8, тонкий контур), во втором случае, связь C=O гидро-

**Таблица 2.** Теоретически рассчитанные конформационные и энергетические параметры молекулы субстрата Pro1-Phe2-His3-Lys4-Phe5-Val6 в невалентных комплексах с ризопусепсином для двух приближений: с учетом взаимодействия со связанной молекулой воды W507 (комплекс 2, верхние значения в ячейках таблицы) и в отсутствие W507 в активном центре ризопусепсина (комплекс 1, нижние значения). Жирным шрифтом выделены углы дипептидного фрагмента Lys4-Phe5, определяющие различие в положении гидролизуемой пептидной связи

Остаток	$\varphi$	$\psi$	$\omega$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi_4$	$\chi_5$	$\Delta U$ , ккал/моль
Pro1		173	-174						-44.3
		172	-178						-44.2
Phe2	-131	162	-170	-69	-58				-18.3
	-139	166	-174	-67	-60				-19.4
His3	-150	43	-164	-55	82				-34.5
	-146	36	-170	-50	69				-35.9
Lys4	-73	<b>20</b>	<b>-177</b>	-73	160	172	174	180	-114.5
	-71	<b>96</b>	<b>162</b>	-62	154	173	172	180	-109.4
Phe5	<b>-88</b>	149	180	48	91				-19.5
	<b>-154</b>	155	-177	60	98				-16.9
Val6	-124	154	67	180	180				-5.7
	-157	82	53	180	180				-2.8

лизуемой пептидной группы ориентирована в направлении “внешнего” атома  $O^\delta$  остатка Asp35 (рис. 8, жирный контур). Оба полученных нами структурных варианта хорошо согласуются с ги-

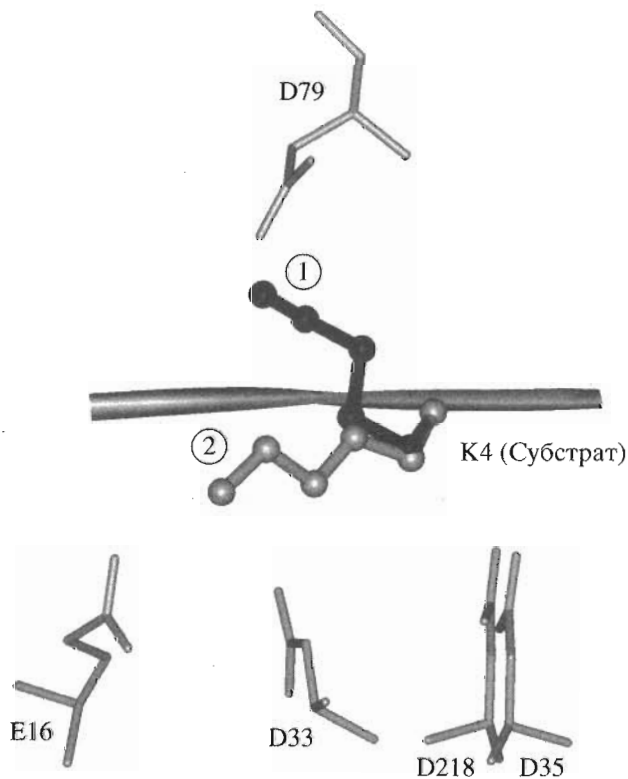
потетическими моделями основных состояний субстратных комплексов, обсуждаемых в рамках ряда ранее предложенных концепций механизма действия аспартильных протеиназ [6, 10, 20]. Одновременно с обнаружением ряда общих черт, полученные нами результаты позволили выявить ряд принципиальных отличий, касающихся как возможных деталей протекания каталитического акта, так и его движущих сил.

*Предположение об отсутствии связанной молекулы W507. Комплекс 1*

Наиболее близкой по строению к ингибиторному комплексу является структура фермент-субстратного комплекса, найденная в предположении отсутствия в активном центре связанной молекулы воды W507. В центре связывания ризопусепсина молекула субстрата принимает вытянутую конформацию, сходную с таковой у ингибитора (рис. 8), в целом сохраняя присущую последнему сеть водородных связей, за исключением водородной связи между карбонильной группой  $C=O$  остатка Phe5 и  $NH$ -группой Gly78 флепа, расстояние для образования которой в комплексе 1 отклоняется от оптимального (3.1 Å).

Боковая цепь субстратного остатка Lys4 может принимать в своем локусе связывания две различные конформации с близкой энергией (рис. 8). В одной из них аммониевый азот боковой цепи Lys4 сближен с боковой цепью остатка Asp79 флепа, а в другой – ориентирован в сторону карбонильных групп Glu16 и Asp33, с которыми способен образовывать солевой мостик (табл. 3).

Расщепляемая связь между остатками Lys4-Phe5 находится в непосредственной близости от двух карбонильных групп каталитически



**Рис. 8.** Два возможных конформационных состояния боковой цепи субстратного остатка Lys4 (показаны цифрами в кружках) и их контакты с ближайшим молекулярным окружением в активном центре ризопусепсина. Основная цепь субстрата показана схематично в виде серой ленты.

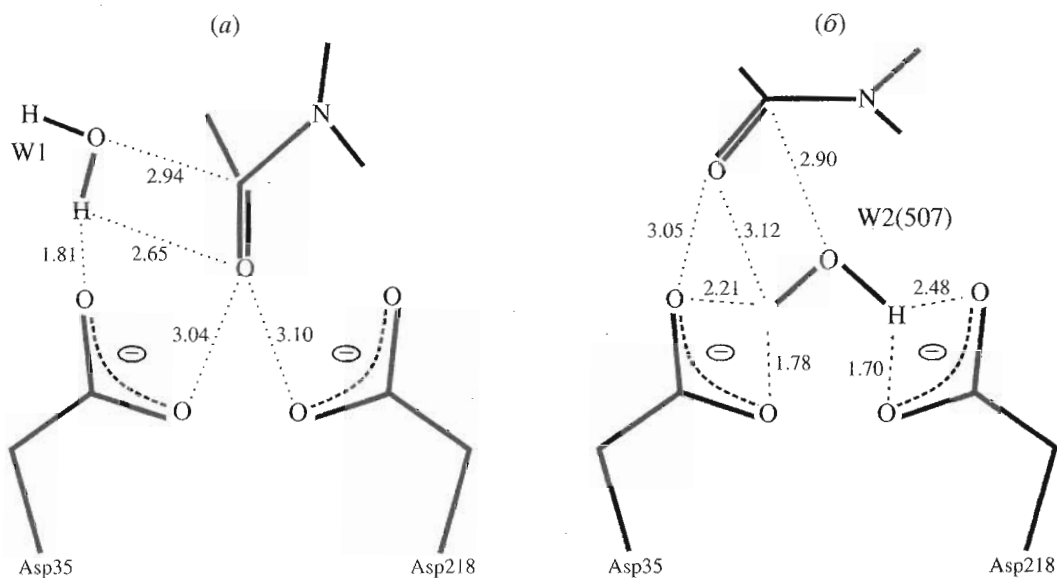


Рис. 9. Схема взаимного расположения гидролизующей пептидной группы субстрата, каталитических остатков Asp35, Asp218 и нуклеофильных молекул воды в априорно рассчитанных невалентных комплексах ризопусепсина – комплексе 1 (а) и комплексе 2 (б).

активных аспарагиновых кислот Asp35 и Asp218. Если судить по смещению карбонильного атома углерода Lys4, рассматриваемый дипептид по сравнению с ингибитором несколько приподнят (на  $\sim 0.8$  Å) над остатками Asp25 и Asp218. Однако, несмотря на указанное структурное различие этот фрагмент субстрата, определяющий первичную специфичность протеиназы, сохраняет в своих предпочтительных конформациях все стабилизирующие контакты с компонентами активного центра.

Характерной особенностью рассматриваемой структуры является то, что в отсутствие в активном центре молекулы воды W507, ее положение занимает атом кислорода гидролизующей пептидной связи. В комплексе с ферментом указанный кислород субстрата находится приблизительно в плоскости образуемой четырьмя атомами кислорода боковых цепей Asp35 и Asp218, располагаясь примерно на одинаковом расстоянии (3.0 и 3.1 Å) от “внутренних” атомов  $O^{\delta}$  этих остатков (рис. 9а).

Найденное значение двугранного угла  $\omega$  расщепляемой связи ( $163^\circ$ , табл. 2) отличается от типичных значений для пептидных групп в белках (около  $180^\circ$ ), что может свидетельствовать о некоторой склонности ее к пирамидализации. Однако эффект потенциальной энергетической дестабилизации группы при таком отклонении достаточно мал и не превышает 2.7 ккал/моль, то есть значения, меньшего, чем величина торсионного барьера вращения для одинарной связи в молекуле этана. Таким образом, данную ситуацию нельзя считать инициатором создания напряженности в молекуле субстрата, как это постулируется ря-

дом феноменологических концепций ферментативного катализа (см., например, обзор [3]).

Структура рассматриваемого невалентного фермент-субстратного комплекса в общих чертах согласуется с моделью, предложенной М. Джеймсом и соавт. [8]. Существенное отличие, однако, состоит в том, что в концепции Джеймса, предполагаемым нуклеофилом служит связанная молекула воды W858 (нумерация ризопусепсина), тогда как наше исследование показывает, что кислород молекулы воды W858 в невалентном комплексе с субстратом в этом случае должен находиться слишком близко ( $\sim 0.7$  Å) от атома  $C^{\beta}$  остатка Lys4, что свидетельствует о вытеснении W858 субстратом при взаимодействии с боковой цепью Lys4. Следует также отметить, что эта молекула воды отсутствует и в ингибиторном комплексе ризопусепсина.

Уход из активного центра обеих молекул W507 и W858 создает необходимость выбора атакующего реагента. Поиск возможного положения нуклеофила осуществлялся путем сканирования потенциальной поверхности невалентного комплекса в области до 3.5 Å от атакующего атома

Таблица 3. Расстояния (Å) между атомом  $N^{\epsilon}$  боковой цепи Lys4 субстрата и атомами некоторых остатков ризопусепсина в рассчитанных фермент-субстратных комплексах

	$O^{\delta}$ Asp33	$O^{\epsilon}$ Glu16	$O^{\delta}$ Asn119
Комплекс 1	2.86	3.19	3.23
Комплекс 2	2.84	3.11	3.19

карбоксильного углерода. При этом зондирующий атом (кислорода) описывал сферу с переменным радиусом и центром, совпадающим с координатами атома атакующего углерода пептидной группы. На завершающем этапе к нему по известным стереохимическим правилам добавлялись протоны и вся молекула воды и ее ближайшее окружение оптимизировались в найденном начальном приближении. Оно оказалось единственно возможным. Взаимное расположение расщепляемой связи, молекулы нуклеофила и каталитических остатков Asp35, Asp218 и некоторые межатомные расстояния приведены на рис. 9а. В положении, показанном на рисунке, атом кислорода воды находится на расстоянии около 2.7 Å от атакующего атома углерода приблизительно перпендикулярно плоскости пептидной группы. В этом положении молекула воды также может образовывать водородную связь с карбоксилем Asp35, выступающим, согласно [8], в роли общего основания. Реакционная способность предполагаемого атакующего агента может также быть увеличена благодаря близости боковой цепи остатка Туг77, создающей неполярное окружение и прикрывающей его от непосредственного контакта с растворителем.

Следует отметить, что в предварительно проведенном нами исследовании [21] структура рассматриваемого комплекса представлялась несколько более предрасположенной к развинутому каталитическому процессу, чем альтернативный вариант. Такой вывод был связан как с энергетическими характеристиками комплекса, так и с более предпочтительным, с точки зрения протонирования Asp218, положением карбонильного кислорода [21]. Однако выполненное позже уточнение с использованием расширенного набора потенциальных функций, позволившее нам отойти от приближения жесткой валентной схемы, привело к пересмотру вывода относительно его предпочтительности. Кроме того, независимо проведенные исследования по моделированию невалентных фермент-субстратных комплексов ретровирусной протеиназы HIV-1 показали принципиальную невозможность образования комплекса, аналогичного комплексу 1, для фрагмента природного субстрата p17-p24 протеиназы HIV-1, содержащего остаток пролина в положении  $P'_1$ . Результаты этого исследования будут опубликованы в отдельной статье.

#### *Предположение о наличии связанной молекулы W507. Комплекс 2*

Альтернативное положение молекулы субстрата в поле активного центра ризоуспепсина было найдено путем независимого исследования его конформационных возможностей с учетом связанной молекулы воды W507, располагающейся в

нативном ферменте в плоскости карбонильных групп остатков Asp35 и Asp218.

Взаимодействие субстрата с W507 ограничивает конформационную свободу его остатка Lys4 по двугранному углу  $\psi$ , который в этом случае может принимать лишь значения вблизи 20° (табл. 2). Такая ситуация, как следует из табл. 2 и рис. 7, существенно изменяет возможное положение расщепляемой пептидной связи субстрата Lys4-Phe5 относительно каталитически активных остатков активного центра, практически не сказываясь, однако, на конформационном состоянии их боковых цепей. Так, расстояние между атомами C<sup>β</sup> составляет для Lys4 и Phe5 около 0.5 Å при более существенном различии в положениях атомов карбонильного углерода (1.42 Å) и кислорода (2.82 Å) расщепляемой связи. Остальные остатки субстрата также не изменяют своего состояния, и в целом расположение молекулы лиганда в активном центре для обоих случаев весьма схоже. Учет присутствия W507 оказывает влияние и на положение остатков фрагмента Ser76-Gly78 фермента, части конформационно лабильной β-петли – флепа, прикрывающего каталитическую область ризоуспепсина от контактов с растворителем. В процессе минимизации энергии в данном случае указанный фрагмент претерпевает видимое смещение в сторону от активного центра и занимает позицию, близкую к таковой в нативном ферменте. Найденное смещение приводит к перераспределению ряда направленных межмолекулярных контактов между субстратом и флепом. Так, имеющаяся у ингибитора водородная связь между основной цепью Phe5 и Gly78 исчезает с одновременным образованием связи между NH-группой остатка Gly78 и карбонилем Lys4 субстрата, а боковая цепь Asp79 несколько удаляется от основной цепи His3, одновременно образуя связь с его имидазолом.

Роль флепа в каталитическом процессе довольно подробно обсуждалась в работах [9, 22–24]. Наши результаты, свидетельствующие о близости конформационного состояния этого фрагмента в невалентном комплексе Михаэлиса к его состоянию в нативном ферменте, позволяют предположить, что если продуктивным является данный структурный вариант субстрата, то сама возможность смещения флепа от нативной конформации к наблюдаемой в ингибиторных комплексах более важна для стабилизации именно промежуточного тетраэдрического интермедиата, а не комплекса Михаэлиса.

Как и у ранее рассматриваемого варианта комплекса 1, боковая цепь субстратного остатка Lys4 может принимать две альтернативные конформации. В одной из них она эффективно взаимодействует с карбонильными группами боковых цепей остатков Asp33, Glu16 и Asn119, а в альтер-

нативной – с остатком Asp79 флепа. Первое положение, однако, является в данном случае, в отличие от комплекса 1, энергетически несколько более предпочтительным. Роль остатка Asp79 в определении лизиновой специфичности ризоупсепсина ранее рассматривалась рядом авторов [25, 26]. Наши данные позволяют уточнить характер этой роли и определить ее в основном как ориентирующую, тогда как остаткам Glu16, Asp33 и Asn119 можно приписать структурную, стабилизирующую роль. В этом случае Asp79, находящийся на доступной растворителю поверхности белка, может служить своеобразным “липким местом” для центрального дипептида молекулы субстрата при его первичном контакте с протеиназой, а два других остатка, недоступных растворителю, стабилизируют окончательную структуру комплекса. Таким образом, можно полагать, что за поддержание Lys-специфичности ризоупсепсина отвечает согласованный структурный комплекс, включающий у этого фермента 4 аминокислоты: Asp79, Asp33, Glu16 и Asn119.

Основные отличия в структурах рассчитанных комплексов касаются, как уже отмечалось, строения центрального дипептида Lys4-Phe5. Гидролизуемая пептидная группа этих остатков располагается в непосредственной близости от двух карбониллов каталитически активных остатков аспарагиновых кислот Asp35 и Asp218 и координированной с ними посредством водородных связей связанной молекулы воды W507.

Атом кислорода молекулы W507, находящийся между каталитическими остатками Asp35 и Asp218, располагается на расстоянии 2.9 Å от атакующего карбонильного атома углерода таким образом, что вектор нуклеофильной атаки ориентирован приблизительно ортогонально плоскости пептидной группы. Точное положение атомов водорода молекулы W507 в невалентном комплексе непосредственно до начала реакции методами молекулярной механики установить не удастся, так как теоретический конформационный анализ свидетельствует о наличии множества практически изоэнергетических локальных минимумов. На рис. 9б приведен один из низкоэнергетических вариантов, характеризующийся симметричным расположением протонов.

Кислород карбонильной группы субстрата сближен с боковой цепью каталитического остатка Asp35 и находится от его “внешнего” атома O<sup>δ2</sup> на расстоянии 3.05 Å (рис. 9б). Это расстояние не является оптимальным для образования прочной водородной связи между субстратом и указанным остатком ризоупсепсина, однако оно может уменьшаться по мере продвижения системы по координате реакции.

Весьма существенной, на наш взгляд, особенностью рассматриваемого фермент-субстратного

комплекса является тот факт, что его самый низкоэнергетический пространственный вариант характеризуется близким к идеальному ( $-177^\circ$ ) значением двугранного угла вращения вокруг расщепляемой связи субстрата. Таким образом, расчет свидетельствует об отсутствии каких-либо структурных предпосылок для стерического искажения гидролизующей пептидной группы субстрата при его взаимодействии с остатками активного центра ризоупсепсина и опровергает постулированное в работе [6] утверждение о необходимости такой деформации для эффективного протекания каталитического процесса.

Авторы исследования [6], исходя из экспериментальных данных о конформации ингибитора в активном центре ризоупсепсина, полагают, что при сорбции субстрата гидролизуемая пептидная связь, испытывая стерические затруднения, довольно существенно (приблизительно на  $60^\circ$ ) отклоняется от планарности. Такой вывод – прямое следствие избранного ими метода построения гипотетической модели субстрата, когда координаты атомов остатков ингибитора по обе стороны от расщепляемой связи используются в качестве непосредственных аналогов гомологичного фрагмента субстрата. При этом  $sp^3$ -гибридизованный атом углерода восстановленной связи ингибитора заменяется карбоксильным  $sp^2$ -гибридизованным атомом углерода расщепляемой связи, что с неизбежностью приводит к искажению пептидного участка между остатками, находящимися в локусах  $P_1$  и  $P_1'$ . Свой подход к выбору модели авторы [6] объясняют фактом консервации в этом случае всех стабилизирующих контактов между лигандом и ферментом, характерных для ингибиторного комплекса. Наши результаты, однако, позволяют утверждать, что сохранение всех энергетически выгодных контактов между основной и боковыми цепями остатков рассматриваемого фрагмента субстрата и их локальным молекулярным окружением возможно для обоих полученных нами низкоэнергетических структурных вариантов без какой-либо деформации расщепляемой связи.

Характерные для рассчитанного комплекса Михаэлиса невалентные взаимодействия между ферментом и субстратом реализуются на расстояниях, при которых трудно ожидать сколько-нибудь существенного перераспределения электронной плотности на взаимодействующих атомах. Однако знание структурных особенностей ферментной системы непосредственно до начала химических преобразований позволяет судить о ее предрасположенности к началу и развитию каталитической реакции, то есть проводить оценку продуктивности полученного комплекса.

Для ферментов семейства аспартильных протеиназ, включая протеиназы высших организмов

и ретровирусов, был предложен целый ряд моделей каталитических механизмов [6, 9, 10, 20, 27].

Все они предполагают участие молекулы воды, связанной с каталитическими остатками аспарагиновой кислоты (W507 в случае ризопусепсина) и располагающейся в плоскости карбоксильных групп их боковых цепей. Слабая нуклеофильность воды практически исключает, однако, эффективную атаку резонансно стабилизированной пептидной группы субстрата и продвижение системы по координате реакции, если невозможен одновременный перенос протона с молекулы воды W507 на подходящий акцептор [7]. Предположительно, роль общего основания, акцептирующего протон, может играть остаток Asp218.

Дополнительным фактором увеличения реакционной способности каталитической системы, как предполагается, служит электрофильный катализ, направленный на атом кислорода карбонильной группы и вызывающий перераспределение электронной плотности в сторону увеличения парциального положительного заряда на атоме углерода, что делает его более чувствительным к нуклеофильной атаке [7]. В предложенных концепциях роль такого электрофильного активатора отводится остатку аспарагиновой кислоты Asp35, карбоксильная группа которого считается протонированной [6, 10, 19, 28, 29].

Полученный нами вариант расположения олигопептидного субстрата в активном центре ризопусепсина не противоречит предложенным ранее моделям каталитических механизмов аспартильных протеиназ. Следует, однако, отметить, что структурные особенности рассчитанного фермент-субстратного комплекса не исключают, с нашей точки зрения, возможности реализации и иного механизма каталитического акта. Рассмотрим эту ситуацию подробнее.

Несмотря на привлекательность имеющих концепций, их самым слабым местом, по-видимому, является предположение о протонировании Asp35 на стадии образования невалентного комплекса.

Довольно низкое значение  $pK_a$  боковой цепи свободной аспарагиновой кислоты ( $\sim 3.9$ ) и способность ферментов семейства аспартильных протеиназ функционировать при значениях pH, близких к нейтральным, говорит о том, что при справедливости предположения о протонировании одного из каталитических остатков аспарагиновых кислот, должен существовать механизм, обеспечивающий асимметрию их свойств в условиях чрезвычайно симметричного молекулярного окружения активного центра. До сих пор, однако, не было предложено сколько-нибудь правдоподобного объяснения того, каким образом обеспечивается довольно большое повышение  $pK_a$  карбонила остатка Asp35 до необходимых для катализа значений.

Напротив, относительно недавно было обнаружено, что для свободной ретровирусной протеиназы HIV-1 характерно состояние ионизации боковых цепей каталитических остатков аспарагиновых кислот и что асимметрия в их физико-химических свойствах проявляется лишь в ингибиторном комплексе – аналоге именно переходного, а не основного состояния каталитической системы [30]. В данной работе авторам посредством полного химического синтеза удалось получить каталитически активную форму протеиназы HIV-1, в которой каталитические остатки Asp25 и Asp25' были специфически помечены углеродом  $^{13}\text{C}$ . Регистрация спектра ЯМР при pH 5.9 (оптимум каталитической активности протеиназы) в отсутствие ингибитора выявила единственный резонансный пик при 180 ppm, который полностью совпадал с аналогичным сигналом от боковой цепи Asp6 в коротком модельном пептиде, представляющем собой фрагмент 20–31 полипептидной цепи протеиназы HIV-1 и титрующемся при pH  $\sim 4$ . При этом наличие единственного сигнала свидетельствовало о химической эквивалентности Asp25 и Asp25', а совпадение его положения с положением сигнала от короткого пептида – об ионизированном состоянии Asp25 и Asp25' в свободном ферменте.

Наряду с этими результатами следует отметить и факт существования ряда представителей аспартильных протеиназ, имеющих оптимум каталитической активности в нейтральной ( $pH_{\text{opt}} \sim 7.0\text{--}7.5$ , ренин) [31–33] и даже щелочной ( $pH_{\text{opt}} \sim 8.5\text{--}9.0$ , один из мутантов протеиназы HIV-1) [34] области значений pH. Последний фермент способен эффективно гидролизовать ряд субстратов (мелитин, [34], инсулин\*) при щелочных значениях pH (8.5–11.0). Принимая во внимание эти факты, постулирование протонирования Asp25 (Asp35 у ризопусепсина) в невалентном комплексе Михаэлиса при высоких значениях pH предполагает, следующие возможности:

а) субстрат преимущественно связывается с протонированной формой фермента.

Это предположение, по-видимому, не выдерживает критики, так как не позволяет объяснить высокую эффективность катализа в условиях крайне низкой концентрации протонированных активных центров.

б) Повышение  $pK_a$  остатка Asp35 (Asp25 в протеиназе HIV-1) и его протонирование происходит уже после образования невалентного комплекса, непосредственно перед началом химических перестроек реагирующих атомных групп. В этом случае причиной возникновения асимметрии в свойствах остатков Asp35 и Asp218 является молекула субстрата, комплементарно связанная с

\* Работа готовится к публикации.

активным центром. Такое предположение, однако, порождает проблему поиска подходящего донора протона в условиях практически полного экранирования каталитического центра фермента от внешней среды.

Кроме того, комплекс Михаэлиса стабилизируется невалентными взаимодействиями, реализующимися на расстояниях, при которых трудно ожидать существенного перераспределения электронной плотности (и, следовательно, изменения кислотно-основных свойств) контактирующих групп.

Полученные нами расчетные данные не противоречат предположению о том, что возникновение асимметрии электронных свойств каталитических остатков аспарагиновых кислот может происходить не в предкаталитический период, а позже – на стадии образования тетраэдрического промежуточного комплекса в результате переноса протона с нуклеофила либо на боковую цепь Asp35 (в нумерации ризопуспепсина), либо непосредственно на карбонильный кислород расщепляемой группы. В этом случае перенос протона с атакующей субстрат молекулы воды возможен как процесс, синхронизированный с нуклеофильной атакой. Мы полагаем, что это предположение поддается проверке путем привлечения вычислительных методов квантовой химии.

Более детально возможный каталитический механизм действия аспартильных протеиназ будет рассматриваться в работе, посвященной результатам теоретического исследования невалентных фермент-субстратных комплексов протеиназы HIV-1.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Каушаров И.В., Попов Е.М., Попов М.Е., Румш Л.Д.* // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 597–602.
2. *Попов Е. М.* Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992.
3. *Попов Е.М., Каушаров И.В., Попов М.Е.* // Успехи биол. химии. 1994. Т. 34. С. 40–81.
4. *Antonov V.K., Ginodman L.M., Rumsh L.D.* // Eur. J. Biochem. 1981. Т. 117. С. 195.
5. *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.
6. *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.
7. *Антонов В. К.* Химия протеолиза. М.: Наука, 1991.
8. *James M.N., Sielecki A.R.* // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3701–3713.
9. *Pearl L.H.* // FEBS Lett. 1987. V. 214. P. 8–12.
10. *James M.N., Sielecki A.R., Hayakawa K., Gelb M.H.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 3872–3886.
11. *Spatola A. F.* Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins. New York: Dekker, 1983. V. 7. P. 267–357.
12. *Swain A.L., Miller M.M., Green J., Rich D.H., Schneider J., Wlodawer A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8805–8809.
13. *Scott R.A., Scheraga H.A.* // J. Chem. Phys. 1966. V. 45. P. 2091–2101.
14. *Momany F.A., McGuire R.F., Burgess A.W., Scheraga H.A.* // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. P. 2361–2383.
15. *Липкин Г.М., Архипова С.Ф., Попов Е.М.* // Журн. структ. химии. 1970. Т. 11. С. 121–126.
16. *Попов Е.М., Дашевский В.Г., Липкин Г.М., Архипова С.Ф.* // Молекулярн. биол. 1968. Т. 2. С. 612–630.
17. *Dudek M.J., Ponder J.W.* // J. Comput. Chem. 1995. V. 16. P. 791–816.
18. *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.
19. *Hofmann T., Hodges R.S., James M.N.* // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 635–643.
20. *Jaskolski M., Tomasselli A.G., Sawyer T.K., Staples D.G., Heinrichson R.L., Schneider J., Kent S.B., Wlodawer A.* // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 1600–1609.
21. *Kashparov I.V., Popov M.E., Popov E.M.* // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. V. 436. P. 121.
22. *Park Y.N., Aikawa J., Nishiyama M., Horinouchi S., Beppu T.* // Protein Eng. 1996. V. 9. P. 869–875.
23. *Beppu T., Park Y.N., Aikawa J., Nishiyama M., Horinouchi S.* // Adv. Exp. Med. Biol. 1995. V. 362. P. 501–509.
24. *Gustchina A., Weber I.T.* // FEBS Lett. 1990. V. 269. P. 269–272.
25. *Shintani T., Nomura K., Ichishima E.* // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 18855–18861.
26. *Lowther W.T., Majer P., Dunn B.M.* // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 689–702.
27. *Wilderspin A.F., Sugrue R.J.* // J. Mol. Biol. 1994. V. 239. P. 97–103.
28. *Fruton J.S.* // Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 1976. V. 44. P. 1–36.
29. *Knowles J.R.* // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1970. V. 257. P. 135–146.
30. *Smith R., Brereton I.M., Chai R.Y., Kent S.B.* // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. P. 946–950.
31. *Sielecki A.R., Hayakawa K., Fujinaga M., Murphy M.E., Fraser M., Muir A.K., Carilli C.T., Lewicki J.A., Baxter J.D., James M.N.* // Science. 1989. V. 243. P. 1346–1351.
32. *Cooper J.B., Foundling S.I., Hemmings A., Watson F.E., Sibanda B.L., Blundell T.L., Jones D.M., Hallett A., Atrash B., Szelke M.* // Biochem. Soc. Trans. 1987. V. 15. P. 751–754.
33. *Katwa L.C., Sun Y., Campbell S.E., Tyagi S.C., Dhalala A.K., Kandala J.C., Weber K.T.* // J. Mol. Cell. Cardiol. 1998. V. 30. P. 1401–1413.
34. *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.**  
**VI. Noncovalent Enzyme–Inhibitor and Enzyme–Substrate Complexes**  
**of Rhizopuspepsin, an Aspartyl Protease**

**I. V. Kashparov<sup>#</sup>, M. E. Popov, L. D. Rumsh, and E. M. Popov<sup>†</sup>**

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

The structure of a complex of rhizopuspepsin, a fungal aspartyl protease, with Pro1-Phe2-His3-Phe4-ψ[CH<sub>2</sub>-NH]-Phe5-Val6, its substrate-like inhibitor, was calculated by theoretical conformational analysis. The search for energetically favorable conformational variants of the ligand structure was based on the fragmental approach using the dynamic library of peptide fragments, which were successively extended in the potential field of the protein. The root-mean-square deviation of atom positions in the calculated and experimental inhibitor conformations was 0.56 Å.

A similar approach was used to model a noncovalent complex of rhizopuspepsin with Pro1-Phe2-His3-Lys4-Phe5-Val6, its specific substrate. As a result, two isoenergetic structures of the complex with different arrangements of the cleavable peptide group and a nucleophilic water molecule were calculated. The possibility of the achieving each of these conformations during the catalytic act is considered. It is shown that there are no structural prerequisites for the distortion of the cleavable bond in the active site of the enzyme. On the basis of the resulting structural data, the assumption was made that Asp35 may be protonated at a late stage of formation of the tetrahedral intermediate rather than at the basic state of the complex.

*Key words: catalysis, aspartyl proteases, rhizopuspepsin, computer modeling*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: [ilko@enzyme.siobc.ras.ru](mailto:ilko@enzyme.siobc.ras.ru).