



УДК 577.152.34.042:577.322.4

МОДЕЛИРОВАНИЕ СУБСТРАТНОГО И ИНГИБИТОРНОГО КОМПЛЕКСОВ ГИСТИДИН-АСПАРТАТНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ

© 2008 г. М. Е. Попов**, М. А. Стеньгач**, Н. С. Андреева**

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Поступила в редакцию 23.08.2007 г. Принята к печати 08.12.2007 г.

Путем гомологичного моделирования и последующего уравнивания методом молекулярной динамики построена трехмерная структура гистидин-аспаратной протеиназы (НАР), пепсиноподобного фермента из возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*. Наличие в каталитическом центре остатка His вместо обычного для пепсиноподобных ферментов остатка Asp и замена других консервативных остатков в структуре активного центра создают условия для возможного функционирования фермента по ковалентному механизму, характерному для сериновых протеиназ. Обсуждаются детали строения комплексов НАР с нековалентным ингибитором аспаратных протеиназ пепстатином, ковалентным ингибитором сериновых протеиназ фенолметилсульфонилфторидом, а также с пентапептидным субстратом.

Ключевые слова: гистидин-аспаратная протеиназа, пепсиноподобные ферменты, каталитический механизм, гомологичное моделирование, молекулярная динамика.

ВВЕДЕНИЕ

Фермент, получивший название гистидин-аспаратной протеиназы (Histo-aspartic proteinase – НАР), был обнаружен при исследовании генома малярийного паразита *Plasmodium falciparum* [1]. По аминокислотной последовательности НАР близка к аспаратным протеиназам плазмодия – плазмепсинам I, II, III и IV. Как и плазмепсины, НАР осуществляет протеолитическую деградацию гемоглобина в пищевой вакуоли плазмодия [2] и является потенциальной мишенью для антималярийной терапии [3, 4]. Кристаллографическая структура НАР до настоящего времени остается неизвестной из-за трудностей с кристаллизацией рекомбинантного белка [1, 2, 5].

Аминокислотная последовательность НАР на ~60% идентична последовательностям плазмепсинов I и II типа [1], трехмерная структура которых в комплексе с рядом ингибиторов установлена методами рентгеноструктурного анализа [6–9]. НАР отличается от плазмепсинов и других пепсиноподобных ферментов заменой ключевых остатков, принимающих непосредственное участие в каталитическом акте. Остаток Asp34, который формирует в пепсиноподобных ферментах каталитическую диаду Asp34–Asp214 (здесь и далее – нумерация по плазмепсину II [6]), в ней заменен на остаток гистидина. Остаток Gly36, отвечающий

за поддержание продуктивной конформации боковой цепи Asp в пепсиноподобных ферментах [10, 11], в НАР заменен на остаток Ala. Консервативный Tyr77 в прикрывающей активный центр петле-козырьке (флепе) заменен на Ser, Val78 на кончике флепа – на Lys. НАР, выделенная из плазмодия, проявляет максимальную протеолитическую активность при pH 5.5–6.0 и ингибируется не только характерным ингибитором аспаратных протеиназ – пепстатином, но и характерным ковалентным ингибитором сериновых протеиназ – фенолметилсульфонилфторидом (PMSF) [2]. Учитывая высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей НАР и плазмепсина II, мы предприняли попытку моделирования трехмерной структуры НАР, а также его возможных комплексов с ингибиторами и субстратами до получения рентгеноструктурных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выравнивание структур НАР и плазмепсина II не допускает разночтений, чему способствует 60% идентичность первичных структур. Об отсутствии вставок и делеций свидетельствует совпадение значительных участков последовательности по всей ее длине (рис. 1).

Анализ модельной структуры после 2 нс молекулярной динамики и последующей минимизации показал, что значения двугранных углов основной цепи у 83.5% остатков лежат в наиболее пред-

Автор для связи (тел.: (495) 336-28-11; эл. почта popov@enzyme.siocb.ras.ru).



Рис. 2. Совмещение основных цепей модельной структуры НАР (черный контур) с кристаллографической структурой плазменсина II [5], код PDB 1SME – серый контур). Наибольшие отклонения структур заметны на концах внешних подвижных петель. Боковые цепи остатков Ser37, His34 и Asp214, образующие каталитическую триаду сериновых протеиназ, отмечены жирными линиями.

Замена остатка аспарагиновой кислоты на гистидин в активном центре фермента и ряд других замен указывают на возможность иного, по сравнению с аспартатными протеиназами, каталитического механизма. Однако до настоящего времени не получено каких-либо сведений о специфичности НАР, на основании которых можно было бы судить о его каталитической активности.

В то время как пик активности нативного НАР из пищевой вакуоли малярийного паразита приходится на pH 5.5–6.0, рекомбинантный фермент проявляет максимальную активность при pH 5.2 [5]. Нативный фермент отличается от рекомбинантной НАР также тем, что он на 100% ингибируется PMSF [2, 5]. Эти отличия в свойствах нативного и рекомбинантного НАР могут быть отнесены на счет частичного присутствия в рекомбинантной молекуле денатурированной формы НАР, как это наблюдается в случае плазменсина I и II [14].

Учитывая факт ингибирования НАР пепстатином, Аквист и сотр. [15] предложили для НАР типичную для всех аспартатных протеиназ схему общего каталитического центра. В этом случае возникает вопрос, возможно ли расщепление субстрата в каталитическом центре, содержащем остатки Asp и His вместо двух остатков аспарагиновой кислоты. Каталитический центр аспартатных протеиназ

представляет собой хорошо сбалансированную систему с двумя активными карбоксилами, расположенными почти в одной плоскости на близком расстоянии друг от друга [9]. На начальной стадии каталитического акта одна группа (Asp34) является протонированной, другая (Asp214) – ионизированной. В ходе реакции карбоксильные группы синхронно изменяют свое состояние – одна отдает протон, другая его присоединяет. Такой обмен протонами, происходящий в течение реакции дважды, не требует преодоления значительных энергетических барьеров; он и составляет суть общего каталитического центра.

При замене карбоксильной группы остатка Asp на имеющее совсем другие свойства кольцо His подобная ситуация оказывается невозможной: pK_a боковой группы свободного остатка His составляет 6.3; pK_a боковой группы свободного Asp – 4. При сближении двух групп, способных принимать и отдавать протон, pK_a одной из них будет повышаться, другой – понижаться [16]. Это происходит и при сближении боковых цепей остатков Asp в активном центре аспартатных протеиназ – такой же эффект возникает в дикарбоновых кислотах. Однако в случае двух идентичных боковых групп Asp устойчивое состояние, при котором один остаток протонирован, а другой – ионизирован,

может переключаться на противоположное не-большими изменениями в их микроокружении [13]. Если сближенные группы химически неэквивалентны, имеющаяся разница в их константах диссоциации будет только увеличиваться, что сделает невозможным переход протона с более основной группы на более кислотную.

Противоречит концепции общесосновного катализа и факт ингибирования гистидин-аспартатной протеиназы PMSF, классическим ингибитором сериновых ферментов. В то же время ингибирование пепстатином легко объяснимо. На рис. 4а показана расчетная модель активного центра НАР в комплексе с пепстатином. За 2 нс среднеквадратичное отклонение тяжелых атомов основной цепи пепстатина от исходной модели составило 1.39 Å. Сильнее всего отклонялись концевые остатки ингибитора. Это свидетельствует о том, что в нашей модели НАР сохраняются карманы связывания, унаследованные от плазмепсина. Из контактирующих с пепстатином петель наибольшему смещению подвержен кончик флепа, совершавший возвратно-поступательные движения с амплитудой 7.7 Å. Своими ингибирующими свойствами пепстатин обязан необычной аминокислоте статины (Sta, (3*S*,4*S*)-4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановая кислота). Гидроксил статины, имитирующий протонированный кислород субстрата в тетраэдрическом невалентном комплексе, располагается между остатками His34 и Asp214, образуя устойчивую водородную связь с депротонированным N^{ε2} имидазольного кольца His34. Пепстатин не блокирует подход к Ser37, который, по нашим предположениям, может выполнять роль нуклеофила при реализации ковалентного механизма катализа. Однако при связывании пепстатина остатки 129–135 устойчиво смещаются от начальной структуры со среднеквадратичным отклонением тяжелых атомов основной цепи в 3.4 Å. В результате смещения сужается щель между петлями 129–135 и флепом, что приводит к невозможности связывания субстрата в положении, необходимом для ковалентного катализа.

В расчетной структуре ковалентного комплекса НАР с PMSF (рис. 4б) фенильное кольцо PMSF располагается под флепом и контактирует с остатками Trp41, Leu75, Ser77 и Ile82, образующими гидрофобный карман связывания. Вход в этот карман у пепсиноподобных ферментов закрыт объемной группой Phe77, которая у НАР заменена на более короткий Ser77.

Ранее нами было высказано предположение, что НАР может функционировать по сериновому механизму [12]. Рассмотрим подробнее аминокислотные замены в молекуле НАР по сравнению с плазмепсином (таблица).

Как видно из таблицы, наиболее существенные различия наблюдаются в области флепа.

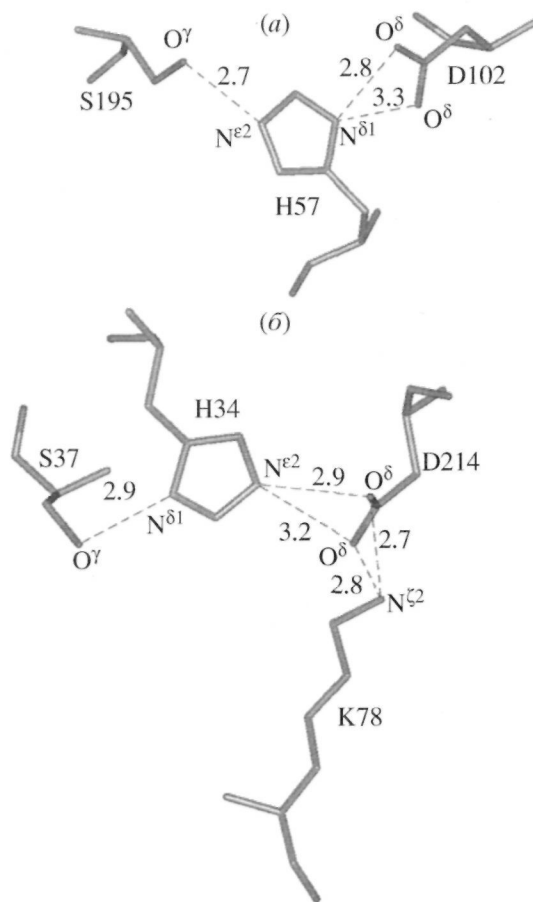


Рис. 3. Взаимное расположение остатков в каталитической триаде химотрипсиноподобных сериновых протеиназ и предполагаемой каталитической триаде НАР. (а) Активный центр трипсина ([17], код PDB 2FTL). Атом N^{δ1} остатка His57 образует водородную связь с карбоксильной группой Asp102, атом N^{ε2} – с каталитически активным Ser195; (б) активный центр модели НАР. Остатки Ser37, His34 и Asp214 образуют каталитическую триаду, при этом имидазольное кольцо His34 ориентировано иным образом, чем в трипсине: водородную связь с Asp214 образует N^{ε2}, а N^{δ1} обращен в сторону Ser37.

Флеп является подвижным элементом структуры всех аспартатных протеиназ. Его перемещения сводятся не только к смене позиций поднятый-опущенный, но и к смещению плоскости флепа за счет изменения торсионных углов остатков у “корней” петли. Движение флепа сопровождается также небольшим смещением петли с остатками 129–135. Наш анализ показал, что при определенной ориентации этих элементов на поверхности молекулы под флепом появляется щель, ориентированная практически параллельно флепу. Ее размеры и расположение относительно оксианионной впадины удовлетворяют условиям посадки пептидного субстрата длиной как минимум 5 а.о. (рис. 4в).

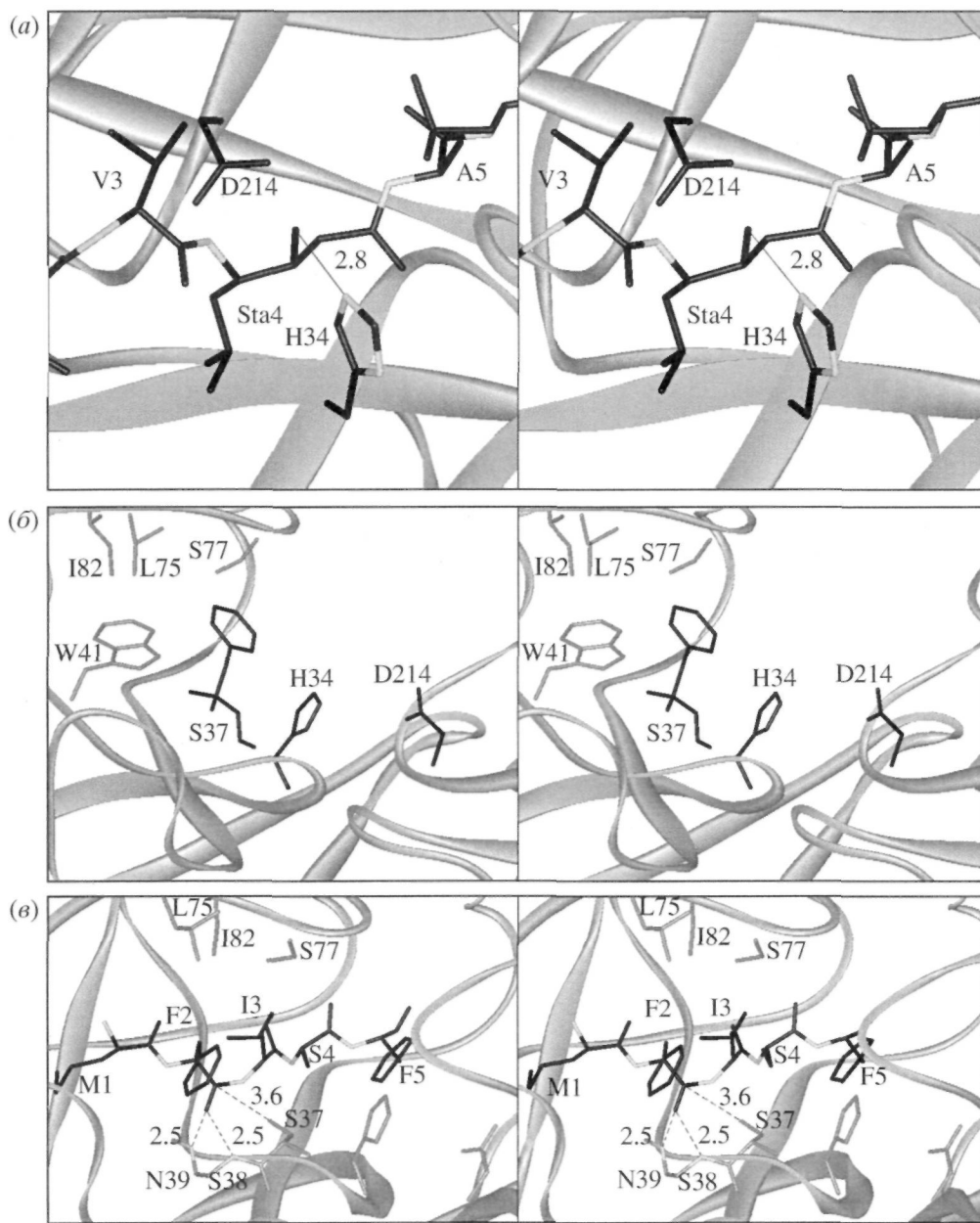


Рис. 4. Стереизображения моделей комплексов НАР с ингибиторами и пентапептидным субстратом. Ход основной цепи схематически показан серой лентой. Боковые цепи ключевых остатков отмечены однобуквенными обозначениями. Водородные связи показаны пунктирными линиями, расстояния обозначены в ангстремах. (а) Модель комплекса НАР с ингибитором аспартатных протеиназ пепстатином. НАР сохраняет профиль субстратсвязывающего участка плазмепсина, в котором без напряжений располагается пепстатин. Гидроксил пепстатина, вытесняющий в аспартатных протеиназах каталитическую молекулу воды, образует водородную связь с $N^{\epsilon 2}$ His34; (б) модель ковалентного соединения ингибитора сериновых протеиназ PMSF с Ser37. Фенильное кольцо PMSF располагается в кармане, образованном остатками Trp41, Leu75, Ser77 и Ile82; (в) пентапептидный субстрат Met1-Phe2-Leu3-Ser4-Phe5 в новом связывающем участке НАР, позволяющем реализовать ковалентный механизм катализа. Кислород расщепляемой пептидной группы располагается в оксианионной впадине, образованной основной цепью остатков Ser38 и Asn39. Карман S1', образованный боковыми цепями Leu75, Ser77 и Ile82, предрасположен к связыванию объемных гидрофобных остатков.

Поскольку сведения о первичной специфичности НАР отсутствуют, при выборе субстрата мы учитывали, что фермент расщепляет глобин, но не проявляет активности в отношении гемогло-

бина [2]. Для моделирования был выбран пентапептид Met1-Phe2-Leu3-Ser4-Phe5, соответствующий остаткам 32–36 α -цепи гемоглобина. Этот фрагмент находится на участке, соединяющем

Различия в аминокислотных последовательностях плазмепсина II и НАР, потенциально значимые для катализа

Плазмепсин II	НАР	Результат замены
Asp34	His34	Препятствует общесловному катализу
Gly36	Ala36	Неблагоприятна для формирования водородной связи между NH остатка субстрата в положении P2' и CO остатка 36, которая характерна для пепсиноподобных ферментов
Область флепа		
Glu74	Lys74	Замена отрицательного заряда на положительный
Met75	Leu75	Leu короче Met, что дополнительно освобождает пространство под флепом
Tyr77	Ser77	Инактивирует пепсиноподобный фермент, освобождает пространство под флепом
Val78	Lys78	Дополнительный положительный заряд
Tyr192	Met192	Исключает формирование водородной связи между CO остатка субстрата в положении P2' и OH Tyr192, которая обнаруживается во многих пепсиноподобных ферментах
Gly216	Ala216	Неблагоприятна для формирования водородной связи между NH остатка субстрата в положении P1 и CO остатка 216, которая образуется во всех пепсиноподобных ферментах

две α -спирали. В тетрамере гемоглобина он осуществляет контакты с β -цепью и скрыт внутри белковой глобулы. При диссоциации гемоглобина на субъединицы фрагмент 32–36 экспонируется в раствор и становится доступен протеолитическому ферменту.

Ориентация расщепляемой пептидной группы, описанная в разделе “Метод моделирования”, задает расположение карманов связывания боковых цепей субстрата. Карман S1, вмещающий объемную боковую группу Phe2, образован остатками Ser38, Leu132 и Leu131. Карбонильный кислород расщепляемой пептидной группы фиксирован водородными связями с HN основной цепи Ser38 (1.6 Å) и Asn39 (1.6 Å). Группа NH основной цепи Phe4 образует водородную связь с O^{δ1} Asn39 (1.9 Å).

Кислород боковой цепи остатка Ser37, выполняющий при ковалентном катализе функции нуклеофила, находится от карбонильного углерода расщепляемой пептидной группы на расстоянии 3.6 Å. Это на 0.9 Å больше, чем в кристаллографических комплексах сериновых протеиназ с белковыми ингибиторами, в частности, трипсина с бычьим панкреатическим трипсиновым ингибитором ([17], код PDB 2FTL), где расположение пептидной связи около каталитического Ser такое же, как в фермент-субстратном комплексе.

Карман S1', содержащий боковую цепь Leu3, образован остатками Trp41, Leu75, Ser77 и Ile82. Он соответствует карману связывания S1/S3 пепсиноподобных ферментов, однако в НАР боковая цепь остатка субстрата входит в этот карман с другой стороны. Такое проникновение “с черного хода” становится возможно только благодаря замене объемного остатка Phe77, консервативного во всех пепсиноподобных ферментах, на более

короткий Ser77. Этот карман связывания занимает также фенильное кольцо PMSF в модели ковалентного комплекса с НАР (рис. 4б).

Моделированная структура фермент-субстратного комплекса свидетельствует о пространственных предпосылках к реализации модели ковалентного катализа. Характер связывания субстрата указывает на специфичность к объемным гидрофобным остаткам в положении P1'.

Для верификации построенных моделей необходимы кристаллографические структуры НАР в нативном состоянии и в комплексе с ингибиторами. Свидетельство в пользу ковалентного или общесловного катализа может быть также получено из экспериментов с изотопным обменом в H₂O¹⁸ [18]. В настоящее время растет число пострентгеноструктурных модельных исследований, которые интерпретируют и дополняют уже имеющиеся экспериментальные данные. На этом фоне нашу работу можно рассматривать как пример предрентгеноструктурного исследования, которое позволяет судить о функциональных свойствах фермента на основе трехмерной структуры, экспериментальные данные для которой пока отсутствуют.

МЕТОД МОДЕЛИРОВАНИЯ

Благодаря близкому сходству последовательностей и отсутствию вставок и делеций, выравнивание первичных структур НАР и плазмепсина II проводилось вручную (рис. 1).

При моделировании НАР в качестве исходной структуры мы использовали кристаллографические координаты плазмепсина II в комплексе с пепстатином А [5, PDB-код 1SME, молекула А].

На первом этапе с помощью гомологичного моделирования в программе Deep View [19] была построена предварительная пространственная модель НАР, которая затем подверглась проверке и уточнению с помощью методов молекулярной динамики. Стабильность структуры в процессе молекулярной динамики на наносекундных интервалах свидетельствует об отсутствии внутренних напряжений и является показателем качества модели [20, 21]

Для молекулярной динамики и последующего анализа применен программный комплекс CHARMM [22] с версией силового поля CHARMM22 [23]. Использовалась полноатомная модель с явным растворителем и периодическими граничными условиями. Электростатическое поле рассчитывалось по методу PME [24]. Периодическая ячейка включала одну молекулу НАР, ~7000 молекул воды с противоионами для нейтрализации суммарного заряда системы. Подвижность связей с атомами водорода заторможена по алгоритму SHAKE [25], что позволило использовать шаг молекулярной динамики в 0.001 пс. Построенная в Deep View первоначальная модель подверглась энергетической минимизации (1000 шагов по методу сопряженного градиента), а затем уравнивалась в течение 2 нс при постоянном давлении 1 атм и постоянной температуре 298 К. О достижении состояния равновесия судили по стабилизации внутренней энергии системы и координат атомов. По завершении процедуры итоговая модель была построена путем усреднения координат в течение последних 50 пс молекулярной динамики и минимизации энергии по методу Ньютона-Рафсона (ABNR). Проверка двугранных углов модели на соответствие низкоэнергетическим областям на карте Рамачандрана осуществлялась с помощью программы PROCHECK [26].

Полученная модель свободной НАР явилась исходной структурой для построения модели комплекса НАР с пепстатином А, содержащим нестандартные остатки изовалериановой кислоты (Iva) и статины (Sta) – Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta. В поле CHARMM22 были добавлены отсутствующие в нем описания топологии и параметров изовалерила (Iva) и статины (Sta), составленные из параметров валентных связей, а также валентных и двугранных углов в аналогичных атомных группировках, имеющих в поле CHARMM22 соединений. Координаты пепстатина для исходной модели взяты из кристаллографической структуры комплекса плазмепсина II с пепстатином А ([5], код PDB 1SME). Она была совмещена с координатами свободной НАР по тяжелым атомам основной цепи, после чего структура плазмепсина была удалена. Полученная начальная модель комплекса НАР с пепстатином подверглась процедурам минимизации энергии и молекулярной динамики аналогично модели свободной НАР.

Для построения модели ковалентного комплекса НАР с PMSF в поле CHARMM22 были введены топология и параметры ковалентного соединения серина с PMSF ([27], код PDB 1PQA). После замены Ser37 на Ser-PMSF модель была подвергнута процедурам минимизации энергии и молекулярной динамики аналогично модели свободного НАР.

Начальная структура для молекулярно-динамического расчета комплекса НАР с субстратом Met1-Phe2-Leu3-Ser4-Phe5 получена путем последовательного наращивания пептидной цепи субстрата. Расщепляемая пептидная группа Leu3-Ser4 ориентировалась так, чтобы ее атом кислорода оказался на равных расстояниях 1.8 Å от атома водорода при азоте основной цепи остатков Ser38 и Asn39, а связь O=C была направлена к O^γ Ser37. Такое расположение расщепляемой пептидной группы однозначно задает ориентацию основной цепи субстрата в щели, образованной петлями 127–135 и 73–84 (флепом). При фиксации расщепляемой пептидной группы цепь последовательно достраивалась по одному остатку, положение боковых групп Leu3, Ser4, Phe5, Phe2 и Met1 определялось путем изменения двугранных углов χ_1 и χ_2 , с тем чтобы избежать наталкиваний на основную цепь НАР. Полученная модель субстратного комплекса НАР подверглась процедурам минимизации энергии и молекулярной динамики продолжительностью 1 нс аналогично модели свободной НАР.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 05-04-49422-а и НШ 7049-2006-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berry C., Humphreys M.J., Matharu P., Granger R., Horrocks P., Moon R.P., Certa U., Ridley R.G., Bur D., Kay J. // FEBS Lett. 1999. V. 447. P. 149–154.
2. Banarjee R., Liu J., Beatty W., Pelosof L., Klemba M., Goldberg D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 990–995.
3. Rosenthal P.Y. // Emerging Infect. Dis. 1998. V. 4. P. 49–57.
4. Coombs G.H., Goldberg D.E., Klemba M., Berry C., Kay J., Mottram J.C. // Trends Parasitol. 2001. V. 17. P. 532–537.
5. Xiao H., Sinkovits A.F., Bryksa B.C., Ogawa M., Yada R.Y. // Protein Expression and Purification. 2006. V. 49. P. 88–94.
6. Silva A.M., Lee A.Y., Gulnik S.V., Majer P., Collins J., Bhat T.N., Collins P.J., Cachau R.E., Luker K.E., Gluzman L.Y., Francis S.E., Oksman A., Goldberg D.E., Erickson J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 10034–10039.
7. Asojo O.A., Afonina E.Yu., Gulnik S.V., Yu B., Erickson J.W., Randa R., Medjahed D., Silva A.M. // Acta Cryst. 2002. V. 58. P. 2001–2008.
8. Asojo O.A., Gulnik S.V., Afonina E.Yu., Ellman J.A., Haque T.S., Silva A.M. // J. Mol. Biol. 2003. V. 327. P. 173–181.

9. *Andreeva N.S.* // Adv. Exp. Med. Biol. 1991. V. 306. P. 559–572.
10. *Каушаров И.В., Попов М.Е., Попов Е.М.* // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 597–602.
11. *Piana S., Carloni P.* // Proteins: Struct. Funct. Genet. 2000. V. 39. P. 26–36.
12. *Andreeva N., Bogdanovich P., Kashparov I., Popov M., Stengach M.* // Proteins: Struct. Funct. Bioinform. 2004. V. 55. P. 705–710.
13. *Andreeva N.S., Rumsh L.D.* // Protein Sci. 2001. V. 10. P. 2439–2450.
14. *Luker K.E., Francis S.E., Gluzman I.Y., Goldberg D.E.* // Mol. Biochem. Parasitol. 1996. V. 79. P. 71–78.
15. *Bjelic S., Aqvist J.* // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 14521–14528.
16. *Bashford D., Karplus M.* // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 10219–10225.
17. *Hanson W.M., Domek G.J., Horvath M.P., Goldenberg D.P.* // J. Mol. Biol. 2007. V. 366. P. 230–243.
18. *Антонов В.К., Гинопдман Л.М., Румш Л.Д., Капитанников Ю.В., Барцевская Т.Н., Явашев Л.П., Гурова А.Г., Волковал Л.И.* // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. С. 436–445.
19. *Guex N., Diemand A., Peitsch M.C.* // TIBS. 1999. V. 24. P. 364–367.
20. *Fan H., Mark A.E.* // Protein Sci. 2004. V. 13. P. 211–220.
21. *Chen J., Brooks C.L. III.* // Proteins: Struct. Funct. Bioinform. 2007. V. 67. P. 922–930.
22. *Brooks B.R., Brucoleri R.E., Olafson B.D., States D., Swaminathan S., Karplus M.* // J. Comp. Chem. 1983. V. 4. P. 187–217.
23. *MacKerell Jr. A.D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack Jr. R.L., Evanseck J.D., Field M.J., Fischer S., et al.* // J. Phys. Chem. B. 1998. V. 102. P. 3586–3616.
24. *Darden T., York D., Pedersen L.* // J. Chem. Phys. 1993. V. 98. P. 10089–10092.
25. *Ryckaert J.P., Ciccotti G., Berendsen H.J.C.* // J. Comp. Phys. 1977. V. 23. P. 327–341.
26. *Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M.* // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. P. 283–291.
27. *Schmidt A., Jelsch C., Ostergaard P., Rypniewski W., Lamzin V.S.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 43357–43362.

Modeling of Substrate and Inhibitory Complexes of Histidine–Aspartic Protease

M. E. Popov^{a,1}, M. A. Sten'gach^b, and N. S. Andreeva^{b,†}

Phone: +7 (495) 336-2811, e-mail: popov@enzyme.siobc.ras.ru

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^b Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

A three-dimensional structure of histo–aspartic protease (HAP), a pepsin-like enzyme from the causative agent of malaria *Plasmodium falciparum*, is suggested on the basis of homologous modeling followed by equilibration by the method of molecular dynamics. The presence of a His residue in the catalytic site instead of an Asp residue, which is characteristic of pepsin-like enzymes, and replacement of some other conserved residues in the active site make it possible for the enzyme to function by the covalent mechanism inherent in serine proteases. The detailed structures of HAP complexes with pepstatin, a noncovalent inhibitor of aspartic proteases, and phenylmethylsulfonyl fluoride, a covalent inhibitor of serine proteases, as well as with a pentapeptide substrate are discussed.

Key words: catalytic mechanism, histo–aspartic protease, homologous modeling, molecular dynamics, pepsin-like enzymes