

УДК 539.19

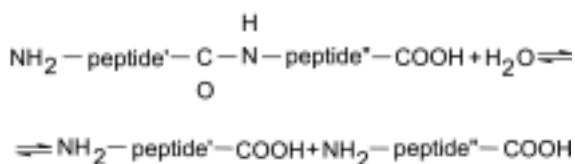
## МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ АЦИЛИРОВАНИЯ СУБСТРАТА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ

Я.И. Доброгорская, А.В. Немухин

*(кафедра физической химии, yana\_g@icc.chem.msu.ru)*

Квантово-химическими методами проведено моделирование стадии ацилирования реакции гидролиза пептидной связи, катализируемой сериновыми протеазами. Построение энергетической поверхности реакции для модельной системы и поиск стационарных точек (локальных минимумов и переходных состояний) проводились методом Хартри–Фока (ХФ) с применением псевдопотенциалов Стивенса–Баша–Краусса (СБК). Величины полученных энергетических барьеров пересчитаны с помощью теории функционала плотности в варианте В3LYP/6-31+G\*. Полученные результаты удовлетворительно коррелируют с экспериментальными данными и уточняют детали механизма реакции ферментативного катализа.

Сериновые протеазы относятся к подклассу ферментов, катализирующих гидролиз пептидной связи C–N (схема). Процесс гидролиза пептидной связи субстрата включает несколько взаимосвязанных стадий, успешную реализацию которых обеспечивает активная зона фермента. Эта зона состоит из каталитического центра, в котором происходит химическая трансформация, и субстрат-связывающего центра, обеспечивающего правильное положение субстрата. В сериновых протеазах катализ пептидной связи осуществляется боковой цепью серина, содержащей ОН-группу. Сама гидроксильная группа не является сильным нуклеофилом, поэтому для протекания реакции необходим перенос протона с гидроксильной группы на основание, роль которого в сериновых протеазах выполняет гистидин (His). Было показано, что аспарагиновая кислота (Asp), находящаяся в непосредственной близости от остатка гистидина, также принимает активное участие в процессе катализа [1].



Субстрат-связывающий центр сериновых протеаз состоит из оксианионовой “дыры”, связывающей кислород субстрата, неспецифической пептид-связывающей площадки, отвечающей совместно с оксианионовой дырой за правильное расположение разрываемой пептидной связи для атаки нуклеофильным кислородом серина, а также специфического субстрат-связывающего кармана. Формой этого кармана, зависящей от природы фермента, определяется заме-

ститель, рядом с которым будет происходить разрыв белковой цепи. На основании предыдущих теоретических работ [2] нами была выбрана модель активного центра фермента, состоящая из остатков Ser, His и Asp. Оксианионовую “дыру” моделировали остатком аспарагина (Asn). В качестве субстрата использовали N-метилацетамид.

### Методы расчета

Расчеты проводили ограниченным методом Хартри–Фока (ОХФ) с использованием псевдопотенциалов и базисов в параметризации Стивенса–Баша–Краусса (СБК) [3]. Поиск стационарных точек на поверхности потенциальной энергии осуществляли с помощью квантово-химического пакета РС GAMESS [4]. В полученных стационарных точках рассчитывали энергию методом ОХФ/6-31+G\* и с помощью теории функционала плотности методом В3LYP/6-31+G\*. В последнем случае расчет проводили по программе GAMESS (US) [5]. Построение профиля реакции осуществляли следующим образом. Выбирали координату реакции, при движении вдоль которой оптимизировали все остальные геометрические параметры. В локализованной области стационарной точки для выбранного значения координаты реакции уточняли структуру при полной оптимизации геометрических параметров. Для найденных минимумов или переходных состояний рассчитывали частоту гармонических колебаний. От найденного переходного состояния проводили спуск в области минимумов по методу внутренней координаты реакции [6]. Для всех стационарных точек был выполнен анализ распределения электронной плотности методом натуральных связевых орбиталей [7].

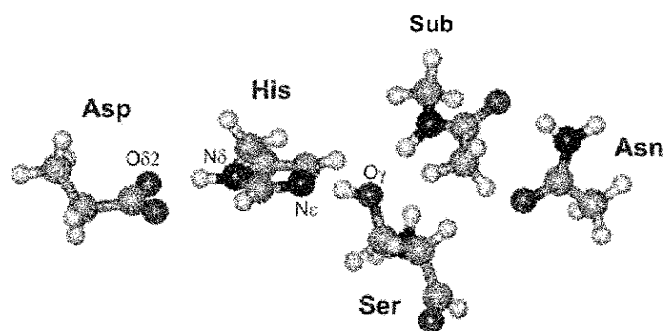


Рис. 1. Равновесная геометрическая конфигурация активного центра фермента (Asp, His, Ser, Asn) в присутствии субстрата (Sub). Расстояние  $O\gamma(\text{Ser}) - C(\text{Sub})$  составляет 3,72 Å

### Результаты и обсуждение

Реакцию гидролиза пептидной связи, катализируемую протеазами, изучают достаточно давно как экспериментально, так и теоретически. Результаты настоящей работы мы сопоставляли с данными исследования Штрайбла, Флориана и Варшела [8], где были выполнены энергетические расчеты модельной реакции гидролиза формамида метанолом в присутствии основания (молекулы воды, аммиака или гистидина). Нами была выбрана более реалистичная модель активного центра, в определенной степени учитывающая влияние расположения окружающих молекулярных групп на энергетический профиль реакции.

По результатам, полученным в рамках данной модели, реакцию ацилирования можно разделить

на несколько последовательных шагов. Первым шагом является подход субстрата к активному центру и его координация субстрат-связывающим центром для эффективного протекания нуклеофильной атаки. Одновременно с этим протон, находящийся на кислороде гидроксильной группы серина, уходит на основание – имидазольное кольцо гистидина.

Для определения начальной структуры реакционного центра геометрические параметры системы были взяты из белковой базы данных (код 1IC6 [9]) и к полученному фрагменту фермента был добавлен модельный субстрат. Геометрическая конфигурация данного комплекса была полностью оптимизирована (рис. 1).

При моделировании первого шага реакции ацилирования в качестве координаты реакции было выбрано расстояние между гидроксильным кислородом серинового остатка и карбонильным атомом углерода субстрата, составляющее в точке минимума 3,72 Å. Анализ натуральных зарядов на всех фрагментах исследуемой системы показал, что в основном состоянии отрицательный заряд сосредоточен на остатке аспарагиновой кислоты.

Расстояние между  $N\delta$  Asn и карбонильным атомом кислорода субстрата составляет 2,87 Å. Как показывает анализ парциальных зарядов на фрагментах (табл. 1), на остатке аспарагина появляется небольшой отрицательный заряд, что свидетельствует об образовании водородной связи. Это взаимодействие в ферменте необходимо для правильной ориентации субстрата.

Таблица 1

Парциальные заряды (атомные единицы) на фрагментах модельной системы, полученные методом OXF/6-31+G\*//OXF/СБК в различных геометрических конфигурациях

Конфигурация	Sub-Ser	His	Asp	Asn
ГМ	-0,05	-0,01	-0,92	-0,02
ПС1	-0,85	0,03	-0,11	-0,04
ЛМ1	-0,90	0,05	-0,10	-0,05
ЛМ2	-0,91	0,07	-0,11	-0,05
ПС3	-0,20	0,15	-0,91	-0,04
ЛМ3	-0,05	0,01	-0,92	-0,04

\* Sub-Ser – объединенная система субстрат-серин, His – гистидин, Asp – аспарагиновая кислота, Asn – аспарагин, ПС – переходные состояния, ГМ – глобальный минимум, ЛМ – локальные минимумы.

Таблица 2

Относительные энергии (ккал/моль) стационарных точек, найденных на поверхности потенциальной энергии, рассчитанные различными методами (обозначения см. в примечании к табл. 1

Конфигурация	Метод расчета		
	ОХФ/СБК	ОХФ/6-31+G* //ОХФ/СБК	V3LYP/6-31+G* //ОХФ/СБК
ГМ	0	0	0
ПС1	26,4	33,0	26,2
ЛМ1	25,7	31,8	28,2
ПС2	28,4	–	–
ЛМ2	24,9	30,7	29,4
ПС3	28,0	36,3	28,4
ЛМ3	25,7	27,8	24,8

Расстояние  $O\gamma(\text{Ser})-N\epsilon(\text{His})$  составляет 2,68 Å, что заметно отличается от исходных кристаллографических данных для протеиназы К, полученных в работе [9] (2,99 Å). Поскольку экспериментально исследовали природный фермент без субстрата, такое отличие можно объяснить присутствием в нашей системе модельного субстрата, взаимодействующего с остатком серина. Расстояние  $O\gamma_2(\text{Asp})-N\delta(\text{His})$  близко к экспериментальному значению и равно 2,65 Å (2,68 Å [9]), что делает возможным образование водородной связи между указанными атомами. Исследования модельной системы методом  $^{15}\text{N}$  ЯМР [10] подтверждают факт образования сильных водородных связей между остатками Asp, His и Ser. Активационный барьер образования тетраэдрического интермедиата, рассчитанный методом ОХФ/СБК, равен 26,4 ккал/моль, что находится в хорошем соответствии с данными, полученными в работе [8] (26 ккал/моль в случае гистидина как основания). Различие в энергии для переходного состояния и самого тетраэдрического интермедиата оставляет 0,69 ккал/моль при данном уровне расчета (табл. 2).

В работе [8] на поверхности потенциальной энергии была найдена точка, в которой происходит перенос протона от метанола на основание, и которая расположена выше стартовой configura-

ции на 9 ккал/моль. Однако в настоящей работе данная область не была локализована, а перенос протона и образование ковалентной связи между остатком серина и субстратом происходят одновременно в области переходного состояния.

По нашим оценкам при образовании тетраэдрического интермедиата (рис. 2) в изучаемой модели происходит так называемый двойной перенос протона, т.е. при образовании ковалентной связи между гидроксильным кислородом серина и карбонильным углеродом субстрата происходит одновременный перенос протона с гидроксильной группы на имидазольное кольцо гистидина – основание, а

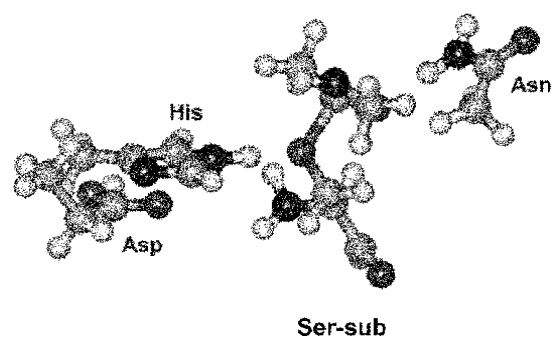


Рис. 2. Структура первого переходного состояния ПС1. Серин и субстрат образуют ковалентно-связанный комплекс Ser-sub, так называемый тетраэдрический интермедиат

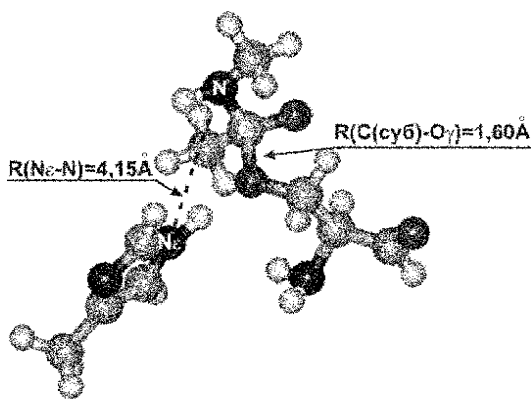


Рис. 3. Структура тетраэдрического интермедиата (указано положение гистидина)

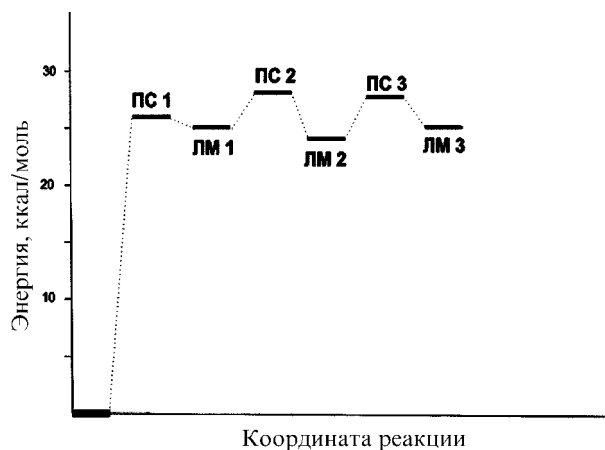


Рис. 4. Энергетическая диаграмма для стадии ацилирования реакции гидролиза N-метилацетамида (ПС – переходные состояния, ЛМ – локальные минимумы)

также перенос протона с N $\delta$ -атома гистидина на O $\delta$ 2-атом аспарагиновой кислоты. Анализ парциальных зарядов на фрагментах системы (табл. 1) показывает, что отрицательный заряд на Asn увеличивается, а длина связи между N $\gamma$ -Asn и карбонильным атомом кислорода уменьшается с 2,87 до 2,72 Å. Из этого следует, что взаимодействие между указанным фрагментом и карбонильным кислородом субстрата усиливается и происходит отток электронной плотности, стабилизирующий тетраэдрический интермедиат. Очевидно, роль аспарагина состоит также и в том, чтобы, оттягивая электронную плотность, увеличить стабильность тетраэдрического интермедиата. Расстояние между кислоро-

дом серинового остатка и карбонильным углеродом равно 1,60 Å, что соответствует прочной ковалентной связи. Длина связи C–N в субстрате увеличивается с 1,35 до 1,46 Å. При образовании тетраэдрического интермедиата степень гибридизации углеродного атома изменяется от sp<sup>2</sup> до sp<sup>3</sup>.

Вторым шагом реакции ацилирования является перенос протона с гистидина, являющегося на данной стадии кислотой, на атом азота пептидной связи, за которым следует ее разрыв и уход C-конца пептида из реакционной среды. Как видно из строения тетраэдрического интермедиата (рис. 3), расстояние между азотом пептидной связи и водородом N $\epsilon$ -гистидина слишком велико для переноса протона и составляет 4,15 Å. Поэтому для того, чтобы произошел перенос протона, тетраэдрический интермедиат должен развернуться таким образом, чтобы расстояние между этими атомами не превышало 3 Å. Как показано на рис. 4, барьер вращения составляет порядка 3 ккал/моль. Расстояние между атомами азота имидазольного кольца и субстрата после описанной перестройки составляет 3,31 Å.

Барьер активации переноса протона с гистидина на субстрат-ферментный комплекс оценивается примерно в 3 ккал/моль. Получившаяся нейтральная структура протонированного тетраэдрического интермедиата оказывается, тем не менее, довольно устойчивой. В работе [8] было показано, что для распада данного комплекса необходимо преодолеть энергетический барьер высотой 3 ккал/моль. В нашем случае барьер разрыва связи составляет 6 ккал/моль. При присоединении протона к азоту разрываемой связи образуется устойчивая пространственная структура His–N<sup>+</sup>–Asn, удерживающая уходящую группу NH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub> в реакционном центре. При использовании другого базиса (6-31G) данный эффект не наблюдается.

В данной работе квантово-химическими методами была полностью исследована стадия ацилирования и рассчитаны энергетические барьеры реакции гидролиза N-метилацетамида модельным активным центром сериновой протеазы. При сравнении полученных результатов с экспериментальными данными и данными предшествующих теоретических расчетов показано, что модель удовлетворительно описывает процессы, происходящие в реальных системах, и позволяет уточнить детали механизма реакции.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 01-03-32071, и грант программы MAC-2002 (02-03-06337) и Американского фонда гражданских исследований и развития (проект RC1-2350-MO-02).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bachovchin W.W., Roberts J.D.* // J. Am. Chem. Soc. 1978. **100**. P. 8041.
2. *Nemukhin A.V., Topol I.A., Burt S.K.* // Int. J. Quant. Chem. 2002. **88**. P. 34.
3. *Stevens W.J., Basch H., Krauss M.* // J. Chem. Phys. 1984. **81**. P. 6026.
4. *Грановский А.А.* URL <http://lcc.chem.msu.ru/gran/gamess/index.html>.
5. *Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. et al.* // J. Comput. Chem. 1993. **14**. P. 1347.
6. *Ishida K., Morokuma K., Komornicki A.* // J. Chem. Phys. 1977. **66**. P. 2153.
7. *Reed A. E., Curtiss L. A., Weinhold F.* // Chem. Rev. 1988. **88**. P. 899.
8. *Strajbl M., Florian J., Warshel A.* // J. Am. Chem. Soc. 2000. **122**. P. 5354.
9. *Betzel C., Gourinath S., Kumar P. et al.* // Biochemistry. 2001. **40**. P. 3080.
10. *Bachovchin W.W.* // Biochemistry. 1986. **25**. P. 775.

Поступила в редакцию 10.12.02

## SIMULATION OF THE SUBSTRATE ACYLATION IN THE ACTIVE CENTER OF SERINE PROTEASES

Ya.I. Dobrogorskaya, A.V. Nemukhin

(Division of Physical Chemistry, [yana\\_g@lcc.chem.msu.ru](mailto: yana_g@lcc.chem.msu.ru))

***Ab initio* quantum chemistry calculations of the acylation stage of hydrolysis of peptide bonds catalyzed by serine proteases have been carried out. Construction of the potential energy surface for the model system and location of the stationary points (minima and transition states) has been performed by using the Hartree-Fock method with the Stevens-Bash-Krauss (SBK) effective core potentials and the corresponding basis sets. The obtained energy differences have been recalculated at the RHF/6-31+G\*\*/RHF/SBK and B3LYP-6-31+G\*\*/RHF/SBK levels. It is shown that theoretical data correlate well with the experimental results and elucidate details of the reaction mechanism.**