



УДК 577.338

© 1990 г.

С. Л. Александров, В. К. Антонов

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
IV *. ГИДРОЛИЗ АМИДОВ АСПАРТИЛЬНЫМИ ПРОТЕИНАЗАМИ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Москва

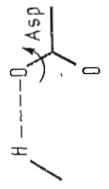
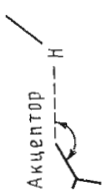
Методом CNDO/2 проанализирована модельная система гидролиза амидов молекулой воды в присутствии двух молекул уксусной кислоты (моделирующих остаток Asp-33 и Asp-213), первая из которых была ионизирована. Установлено, что поляризация C=O-связи N-метилацетамида, моделирующего субстрат, а тем более протонирование карбонильного O-атома практически невозможны при всех разрешенных положениях протона $H^{\delta 1}$ остатка Asp-213. Показано, что эффективность нуклеофильной атаки молекулой воды, протекающей по общему основному механизму, обеспечивается повышенным отрицательным зарядом на атакующем O-атоме молекулы воды, один из протонов которой соединен H-связью с одним из O-атомов ацетат-иона. Установлено также, что перенос протона на амидный азот уходящей группы субстрата осуществляется молекулой уксусной кислоты (Asp-213), которая при определенной ориентации субстрата является донором протона после синхронного поворота карбоксильных групп реакционных кислот примерно на 180° вокруг $C^{\beta}-C^{\gamma}$ -связи. Сделано предположение, что эффективность и специфичность гидролиза амидов зависят от ориентации как молекулы воды относительно O-атома остатка Asp-33 (длина H-связи определяет избыток отрицательного заряда на O-атоме молекулы воды), так и субстрата (особенно пептидной связи) относительно плоскости сопряженных O-атомов двух молекул уксусной кислоты.

Появление публикаций по тонкой пространственной структуре как нативных ферментов [2, 3], так и их комплексов с природным ингибитором пепстатином и его производными [4, 5] позволяет, с нашей точки зрения, начать детальные исследования, касающиеся особенностей электронного состояния реакционных групп в реальных фермент-субстратных комплексах, а также роли невалентных взаимодействий на различных стадиях гидролитического процесса, определяющих эффективность и специфичность гидролиза амидов аспартильными протеиназами.

Четыре представителя этого класса протеиназ, интенсивно изучающиеся сегодня методом рентгеноструктурного анализа: пепсин свиньи [6, 7], пенициллопепсин [2, 4, 8], а также протеиназы из *Rhizopus chinensis* [3, 5] и *Endothia parasitica* [9, 10] — очень схожи в отношении аминокислотной последовательности [3] и пространственной структуры [3, 9]. Все они имеют в своих активных центрах по два остатка аспарагиновой кислоты (Asp-33 и Asp-213; нумерация остатков здесь и в дальнейшем по пенициллопепсину) с аномальными значениями pK_a их соединенных друг с другом H-связью карбоксильных групп, равными в случае пепсина, например [11], 1,5 и 4,7 соответственно. Кроме этого, проведенные в нашей лаборатории исследования по включению тяжелого кислорода из $H_2^{18}O$ в субстрат [12] однозначно доказали, что аспартильные протеиназы функционируют по общему основному типу катализа, т. е. нуклеофильной группировкой является молекула воды, и позволили выдвинуть гипотезу о механизме действия аспартильных протеиназ [13], которая в целом не противоречила результатам рентгеноструктурного анализа, полученным позднее [4, 5].

* Сообщение III см. [1].

Параметры водородных связей

| Состояние | Донор Н-связи | Акцептор Н-связи | Длина, Å | Кратность |  |  |
|-----------|------------------|------------------|----------|-----------|---|---|
| I | H ₂ O | Asp-33 | 1,309 | 0,178 | 50,4 | 129,9 |
| | OW | » | 1,567 | 0,084 | | |
| II | H ₂ O | H ₂ O | 1,359 | 0,165 | 37,0 | 173,0 |
| | H ₂ O | Asp-33 | 1,781 | — | — | 138,3 |
| III | H ₂ O | H ₂ O | 1,471 | — | -70,0 | 158,4 |
| | H ₂ O | N-Метиллацетамид | 1,470 | 0,091 | — | 139,7 |
| IV | H ₂ O | Asp-213 | 1,425 | 0,035 | — | 75,0 |
| | H ₂ O | » | 1,375 | 0,097 | — | 82,1 |
| V | H ₂ O | N-Метиллацетамид | 1,309 | 0,165 | 42,1 | 139,1 |
| | N-Метиллацетамид | Asp-213 | 1,297 | 0,217 | — | 91,4 |
| | | | | 0,191 | -31,8 | 141,3 |

Конформация по отношению к акцепторным карбоксильным [18], град

Акцептор
Валентный угол акцептор — Н, град

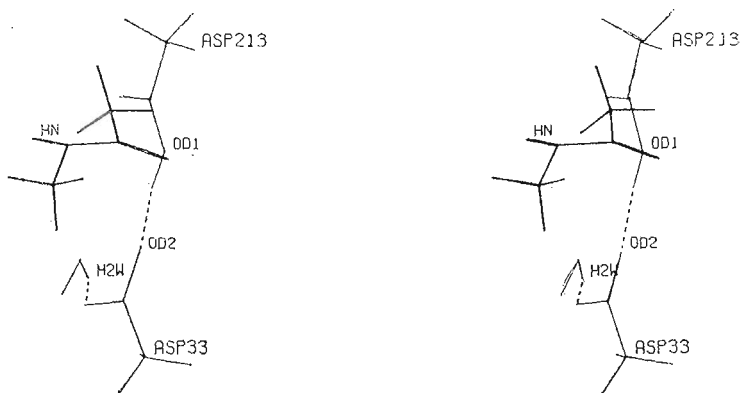


Рис. 1. Структура основного состояния модельной системы (состояние 1)

В настоящей работе нами был проверен этот наиболее вероятный механизм гидролиза амидной связи в отношении перекрывания орбиталей на модельной системе. Этот механизм включал в себя нуклеофильную атаку молекулой воды O-284 [4] карбонильного С'-атома субстрата с синхронным акцептированием одного из протонов реакционной молекулы воды ионизированной Asp-33, выступающей в роли общего основного катализатора, и протонирование амидного N-атома субстрата Н^{δ1}-протоном остатка Asp-213.

В расчетах модельной системы нами был применен, как и в предыдущих сообщениях [1, 14, 15], полуэмпирический метод CNDO/2 [16] (программа «GEOMO» [17]). Рассчитывали полную энергию системы, порядки связей и заряды на атомах.

Модельная система активного центра аспартильных протеиназ содержала ацетат-ион и молекулу уксусной кислоты (имитирующие остатки Asp-33 и Asp-213 соответственно), карбоксильные группы которых располагались в одной плоскости для обеспечения сопряжения их O-атомов, согласно результатам рентгеноструктурного анализа (см. рис. 1 в [4]), а подвижный Н^{δ1}-протон уксусной кислоты образовывал линейную водородную связь оптимальной длины (1,8 Å) с O^{δ2}-атомом ацетат-иона. Расположение С'-атомов этих кислот было фиксировано относительно карбонильного С'-атома N-метилацетамида, который моделировал субстрат. Реакционная молекула воды до нуклеофильной атаки располагалась таким образом, что расстояние между ее O-атомом (OW) и карбонильным С'-атомом N-метилацетамида составляло 3 Å, а направление нуклеофильной атаки было, как и в сообщении [15], перпендикулярно плоскости амидной группы (вдоль p_z -орбитали OW-атома). При этом один из протонов, выбранный в модели подвижным (H2W), образовывал Н-связь с O^{δ1}-атомом ацетат-иона. Направление этой водородной связи было близким к *син*-конформации по отношению к O^{δ2}-атому ацетат-иона (табл. 1).

Так как точная локализация субстрата в активном центре аспартильных протеиназ до сих пор не выяснена, мы, основываясь на результатах рентгеноструктурного анализа комплекса аналога пепстатина (Iva-Val-Val-Sta-OEt) с пенициллопепсином (рис. 2b в публикации 31), расположили амидную С'-N-связь N-метилацетамида перпендикулярно плоскости сопряженных O-атомов карбоксильных групп двух реакционных кислот. При этом амидный азот N-метилацетамида для обеспечения его максимальной близости к карбоксильной группе уксусной кислоты (возможному донору протона на амидный азот) был расположен в этой плоскости, тогда как карбонильная группа была направлена в сторону карбоксильных групп реакционных кислот (только в этой ситуации не исключалась возможность поляризации С=О-связи Н^{δ1}-протоном, согласно Джеймсу

и сотр. [8]). Оптимизированная структура этого основного состояния (состояние I) показана на рис. 1.

В расчетах мы уделяли основное внимание изменению электронной плотности в N-метилацетамиде, а также локализации подвижных протонов (H2W и H^{δ1}). В связи с этим оптимизацию геометрии проводили в отношении следующих параметров:

N-метилацетамид

длины связей: C'—O, C'—N, C'—OW (вода),

валентные углы: C^α—C'—O, C^α—C'—N, C^α—C'—OW (вода),
C'—N—HN, C'—N—C^α,

двугранные углы: H1^α—C^α—C'—O, H1^α—C^α—C'—N, C^α—C'—N—HN,
C^α—C'—N—C^α;

вода

длина связи: OW—H1W,

валентный угол: C' (N-метилацетамид)—OW—H1W,

двугранный угол: C^α—C' (N-метилацетамид)—OW—H1W;

уксусная кислота

длины связей: C^γ—O^{δ1}, C^γ—O^{δ2},

валентные углы: C' (N-метилацетамид)—C^γ—O^{δ1}, C' (N-метилацетамид)—C^γ—O^{δ2},

двугранные углы: C^α—C' (N-метилацетамид)—C^γ—O^{δ1}, C^α—C' (N-метилацетамид)—C^γ—O^{δ2}.

Локализацию подвижных протонов (H2W и H^{δ1}) находили оптимизацией всех параметров, определяющих их ориентацию к соответствующим компонентам модельной системы. Исходные геометрические параметры взяты из работы Шераги [19].

Состояние I (основное состояние модельной системы) содержит две водородные связи (рис. 1 и табл. 1): между H^{δ1}-протоном молекулы уксусной кислоты (Asp-213) и O^{δ2}-атомом ацетат-иона (Asp-33) и между H2W-протоном молекулы воды и O^{δ1}-атомом ацетат-иона. В этих H-связях подвижные протоны находятся приблизительно в *син*-конформации по отношению к акцептирующему их карбоксилат-иону. Длина H-связи между карбоксилат-ионом и водой сильно укорочена (1,31 Å). Следствием этого является аномально высокое значение (−0,432) отрицательного заряда на OW-атоме, что создавало благоприятные условия для нуклеофильной атаки. В табл. 2 приведены значения зарядов на O-атоме изолированной молекулы воды, гидроксил-иона и других O-нуклеофилах [14]. Однако в состоянии I не наблюдается заметного взаимодействия между H^{δ1}-протоном уксусной кислоты и карбонильным O-атомом N-метилацетамида (расстояние между этими атомами равно 2,99 Å), т. е. H^{δ1}-протон, локализованный на O^{δ1}-атоме уксусной кислоты (Asp-213), не может действовать как электрофил и активировать амидную связь (рис. 1).

В основном состоянии (состоянии I) расстояние между карбонильным C'-атомом N-метилацетамида и OW-атомом воды равно 3 Å. При таком большом расстоянии между этими атомами пирамидализация C'-атома практически отсутствует ($\Delta_C = 0,03 \text{ \AA}$), что хорошо согласуется с результатами, полученными нами ранее [15]. Пирамидализация амидного азота достигает значения 0,22 Å вследствие близости карбоксильной группы уксусной кислоты (Asp-213). Такая высокая степень искажения планарной структуры амидного азота в основном состоянии повышает, как было показано в работе [14], значение его pK_a примерно до 3. Важная особенность состояния I — локализация неподеленной пары электронов тригонального N-атома (рис. 1) в направлении карбоксильной группы уксусной кислоты. Из этого мы сделали важный вывод, что протонирование амидного азота, если оно, согласно анализируемому механизму [13], осуществляется H^{δ1}-протоном уксусной кислоты (Asp-213), не требует его инверсии (которая необходима в механизме протонирования, предложенном Джеймсом и сотр. [4]).

Заряды на О-атомах некоторых нуклеофилов [1, 14, 15]

| Нуклеофил | Заряд на О-атоме |
|--|------------------|
| H ₂ O | -0,26 |
| OH ⁻ | -0,76 |
| CH ₃ OH | -0,24 |
| CH ₃ O ⁻ | -0,61 |
| H ₂ O - формиат-ион | -0,37 |
| ($R_{\text{H}_2\text{W} \dots \text{O}^{\delta_1}}$) = = 1,74 Å | |
| H ₂ O - Asp-33 | -0,432 * |
| ($R_{\text{H}_2\text{W} \dots \text{O}^{\delta_1}}$) = = 1,31 Å | |

* Данные настоящей работы.

а амидного N-атома — до $\Delta_N = 0,315$ Å).

Дальнейшее взаимодействие OW-атома с C'-атомом протекало без активационного барьера с понижением энергии системы примерно на 118 ккал/моль (рис. 2) вплоть до образования тетраэдрического промежуточного соединения (состояние II), аналогичного тому, что наблюдалось нами при моделировании нуклеофильной атаки О-атомом молекулы воды на карбонильный C'-атом N-метилацетамида с участием формиат-иона как общего основного катализатора [15]. В этом состоянии наблюдалась типичная для тетраэдрического промежуточного соединения пирамидализация как карбонильного C'-атома, так и амидного азота N-метилацетамида, которая достигала значений 0,436 Å (Δ_C) и 0,450 Å (Δ_N) соответственно (табл. 3). Длина возникшей ковалентной связи между OW-атомом реакционной молекулы воды и карбонильным C'-атомом составляла 1,422 Å, а длина амидной C'—N-связи N-метилацетамида увеличилась до 1,443 Å. Кратность связи C'—OW была равна 0,79, а порядок амидной C'—N-связи понизился в соответствии с ее длиной до 0,913. Что касается C'=O-связи, то ее параметры (длина и кратность) составляли в состоянии II 1,350 Å и 1,124 соответственно (рис. 2 и табл. 3).

Все это свидетельствовало о полной резонансной дестабилизации амидной группы N-метилацетамида и об образовании истинного тетраэдрического промежуточного соединения, структура которого представлена на рис. 3. Образованию состояния II в значительной мере способствовало эффективное акцептирование H₂W-протона O^{δ1}-атомом ацетат-иона (Asp-33) (см. рис. 1), выступающего в роли общего основного катализатора [20], протекающее синхронно с нуклеофильной атакой. Причина такого эффективного протонирования ацетат-иона (с образованием стабильной *син*-конформации кислоты [18]) заключалась в том, что в основном состоянии (состоянии I) O^{δ1}-атом ацетат-иона образовывал с H₂W-протоном воды H-связь, направление которой было также близко к *син*-конформации по отношению к карбоксилат-иону Asp-33 (рис. 1 и табл. 1). Однако в тетраэдрическом промежуточном соединении (состоянии II) взаимодействие между H₂W-протоном воды и ее OW-атомом не исчезало совсем: вместо ковалентной связи между этими атомами в основном состоянии (состоянии I) образовалась устойчивая, практически линейная H-связь, длина которой была сильно укорочена и равна 1,359 Å (табл. 1 и рис. 3). Необходимо лишь отметить уменьшение отрицательного заряда на OW-атоме до значения, равного -0,324. Параметры H-связи между H^{δ1}-протоном уксусной кислоты (Asp-213) и O^{δ2}-атомом Asp-33 в этом состоянии практически не изменились, что отражало сохранение сопряжения между карбоксильными группами реакционных кислот в тетраэдрическом промежуточном соединении (состоянии II) (табл. 1 и рис. 3).

Сближение нуклеофильного OW-атома молекулы воды с C'-атомом N-метилацетамида до расстояния, равного 2 Å, с понижением энергии модельной системы примерно на 26 ккал/моль, качественно не меняет параметры системы (по структуре и локализации H-связей это состояние близко к состоянию I), в том числе и расстояние между H^{δ1}-протоном уксусной кислоты (Asp-213) и карбонильным О-атомом N-метилацетамида (которое даже несколько увеличивается до 3,06 Å), определяющее степень электрофильной активации амидной группы. Однако нельзя не отметить явного искажения планарной структуры амидной связи в целом (пирамидализация карбонильного C'-атома возрастает до значения $\Delta_C = 0,174$ Å,

Степень же взаимодействия Н^{δ1}-протона Asp-213 с карбонильным кислородом N-метилацетамида, несмотря на то что отрицательный заряд на этом атоме увеличился до значения -0,643, практически не изменилась, так как расстояние между этими атомами возросло до 3,2 Å по сравнению с состоянием I (рис. 3).

Еще раз отметим, что из наших расчетов следует, что нуклеофильная атака на карбонильный С'-атом протекает именно синхронно с протонированием ацетат-иона (Asp-33). Постадийное протекание этих двух процессов, как утверждается в работе [21], мало вероятно, так как нами были проанализированы состояния модельной системы при различных степенях взаимодействия ОВ-атома воды и С'-атома N-метилацетамида (при фиксированных расстояниях между этими атомами, равными 2 и 1,5 Å): в первом случае Н-связь наблюдалась между Н2W-протоном и О^{δ1}-атомом ацетат-иона (Asp-33)

аналогично ее локализации в основном состоянии I (рис. 1), во втором — между Н2W-протоном и ОВ-атомом воды, как это было в тетраэдрическом промежуточном соединении (состоянии II; рис. 3), т. е. при расстоянии между С'- и ОВ-атомами, равном 1,5 Å, протонирование ацетат-иона (Asp-33) уже произошло, тогда как нуклеофильная атака еще не была завершена. Это, на наш взгляд, довольно существенная особенность общего основного катализа. В случае ковалентного катализа, как было нами показано на примере сериновых протеиназ [1], имел место постадийный механизм.

Протонирование амидного азота субстрата (см., например, [22]) — одна из важнейших стадий гидролиза амидной связи. Образование некоего относительно стабильного протонированного тетраэдрического соединения (например, состояния V), распад которого завершает процесс гидролиза, во многом определяет его специфичность.

Для аспартильных протеиназ механизм протонирования амидного азота субстрата пока еще не вполне ясен. Однако в структуре активного центра этих ферментов, согласно рентгеноструктурным данным [2], имеется лишь одна группировка, способная при определенных условиях отдавать протон, — остаток аспарагиновой кислоты Asp-213 (на основании этого и был предложен механизм гидролиза [13], анализируемый в настоящей работе).

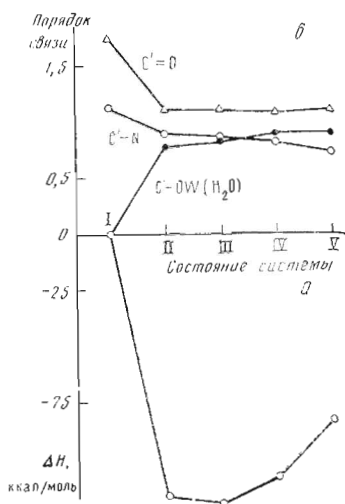


Рис. 2. Изменение потенциальной энергии системы (а) и порядков связей (б) в N-метилацетамиде

Таблица 3

Параметры амидной группы N-метилацетамида

| Состояние | Длина связей, Å | | | ΔС, Å | ΔN, Å | рК _а амидного азота | Двугранные углы при амидном азоте (С ^α —С'—N—X), град. при X | | |
|-----------|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------|---|------------------|-----------------|
| | C'=O | C'—N | C'—OW | | | | HN | C ^α ' | H ^{δ1} |
| | | | | | | | | | |
| I | 1,272 | 1,381 | 3,0 | 0,030 | 0,224 | 3,4 | 17,6 | 160,5 | — |
| II | 1,350 | 1,443 | 1,422 | 0,436 | 0,450 | 6,5 | 19,5 | 132,9 | — |
| III | 1,349 | 1,447 | 1,417 | 0,456 | 0,375 | 9,6 | 17,7 | 139,3 | (-122,0) * |
| IV | 1,354 | 1,452 | 1,393 | 0,477 | 0,399 | 7,7 | 12,2 | 131,2 | (-121,8) |
| V | 1,352 | 1,464 | 1,389 | 0,479 | 0,405 | — | 9,3 | 130,8 | -116,8 |

* Значения, указанные в скобках, приведены для направления Н-связи (см. табл. 1).

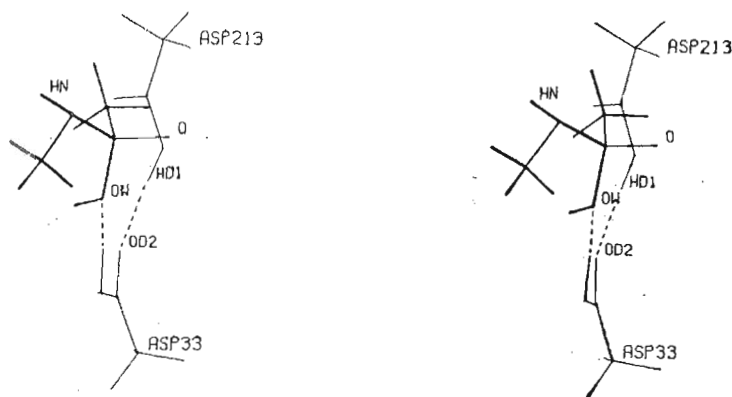


Рис. 3. Структура неактивного (см. текст) тетраэдрического промежуточного соединения (состояние II)

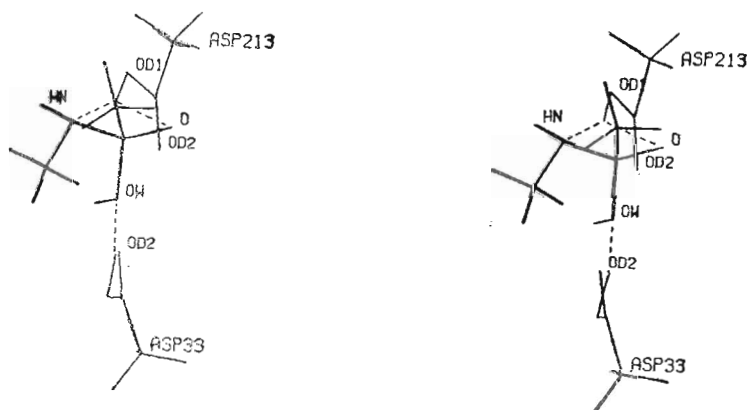


Рис. 4. Структура тетраэдрического промежуточного соединения (состояние III), в котором HD1-протон остатка Asp-213 образует две Н-связи: с карбонильным кислородом и амидным азотом N-метилацетамида

Однако, как можно заметить из рис. 3, эффективное протонирование амидного азота N-метилацетамида $H^{\delta 1}$ -протоном остатка Asp-213 в таком тетраэдрическом промежуточном соединении, как состояние II (хотя значение pK_a амидного азота в этом состоянии, согласно [14], равно 7), стерически невозможно вследствие значительной удаленности этого протона (на 3,456 Å) от амидного азота. Поворот карбоксильной группы остатка Asp-213 вокруг $C^{\beta}-C^{\gamma}$ -связи примерно на 180° мог бы трансформировать неактивное тетраэдрическое промежуточное соединение (состояние II) в реакционноспособное (состояние III) в отношении взаимодействия $H^{\delta 1}$ -протона и амидного азота N-метилацетамида. Для молекулы уксусной кислоты поворот карбоксильной группы вполне реален, так как энергетический барьер вращения вокруг этой связи не превышает 1 ккал/моль [19], и несколько увеличить его может только микроокружение этой карбоксильной группы.

Нами было оптимизировано состояние III, аналогичное состоянию II, в котором карбоксильная группа только Asp-213 была повернута примерно на 180° вокруг $C^{\beta}-C^{\gamma}$ -связи (рис. 4). Переход системы в состояние III сопровождался довольно значительным перераспределением Н-связей. Что касается подвижного H2W-протона, то он, как и в состоянии II, был соединен с OW-атомом Н-связью, длина которой равнялась 1,471 Å (табл. 1). Более подробного анализа, однако, заслуживает локализация $H^{\delta 1}$ -протона. Будучи в этом активном тетраэдрическом промежуточном соединении ковалентно связанным с $O^{\delta 1}$ -атомом Asp-213 (длина этой связи составляла 1,072 Å), этот протон выступал донором для двух водородных связей (табл. 1 и рис. 4): с карбонильным кислородом (длина 1,710 Å) и амидным азотом N-метилацетамида, причем Н-связь с N-атомом

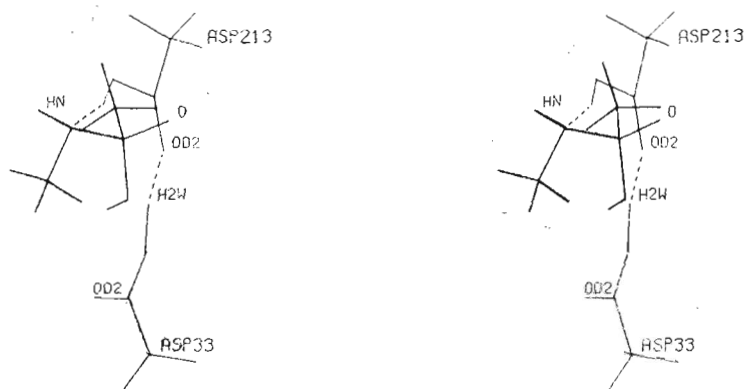


Рис. 5. Структура тетраэдрического промежуточного соединения (состояние IV) с повышенным сродством HD1-протона остатка Asp-213 к амидному азоту N-метилацетамида (см. текст)

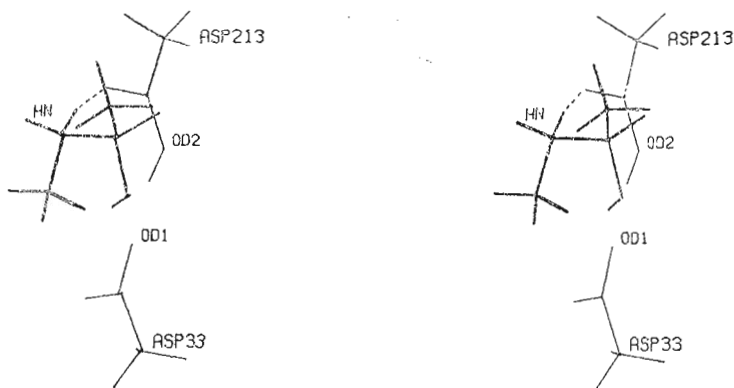


Рис. 6. Структура протонированного по амидному азоту тетраэдрического промежуточного соединения (состояние V)

была аномально короткой (длина 1,425 Å при кратности примерно 0,1), что объясняло несколько заниженный порядок $H^{\delta 1}-O^{\delta 1}$ -связи (0,738) Asp-213. Другими словами, для состояния III характерно то, что в нем $H^{\delta 1}$ -протон Asp-213 связан одновременно с тремя функционально важными гетероатомами модельной системы: $O^{\delta 1}$ -атомом Asp-213, карбонильным кислородом, а главное — с амидным азотом N-метилацетамида. Так как инверсии амидного азота в состоянии III не наблюдалось (табл. 3), не было никаких препятствий для более глубокого взаимодействия $H^{\delta 1}$ -протона Asp-213 и амидного азота (рис. 4). Энергетически это состояние примерно на 2,5 ккал/моль благоприятнее, чем состояние II, по-видимому, за счет образования H-связей с N-метилацетамидом, однако положение $H^{\delta 1}$ -протона в этом состоянии еще не позволяет акцептировать его амидным азотом беспрепятственно, так как имеется другой акцептор (O-атом) с довольно высоким значением отрицательного заряда (-0,631).

Конкуренция между карбонильным кислородом и амидным азотом N-метилацетамида за образование водородной связи с $H^{\delta 1}$ -протоном Asp-213 практически исчезает в состоянии IV, в котором обе карбоксильные группы повернуты на 180° вокруг $C^{\beta}-C^{\gamma}$ -связи (рис. 5). $H^{\delta 1}$ -Протон, оставаясь соединенным с $O^{\delta 1}$ -атомом слабой ковалентной связью (кратность ее составляла 0,605 при длине 1,103 Å), заметно увеличил в состоянии IV свое сродство к амидному азоту, с которым образовывал аномально короткую H-связь длиной 1,309 Å, что отражало повышение кратности этой H-связи до 0,217. Длина же H-связи этого протона с карбонильным кислородом N-метилацетамида возросла до 1,8 Å, а перекрывание орбиталей этих атомов практически отсутствовало. Кроме того, в этом состоя-

нии была разорвана Н-связь между H2W-протоном и OW-атомом и восстановлена отсутствовавшая в состоянии III водородная связь между карбоксильными группами реакционных молекул кислот, однако донором протона Н-связи в состоянии IV была Asp-33, что существенно отличало эту Н-связь от аналогичной в состояниях I и II. Длина ее составляла 1,375 Å, что примерно на 0,4 Å меньше аналогичной Н-связи в неактивном тетраэдрическом промежуточном соединении (состоянии II). Такое заметное укорочение этой Н-связи (табл. 1), по-видимому, значительно повышало сродство H2W-протона к O^{δ2}-атому Asp-213 (как видно из кратности этой Н-связи, достигавшей значения 0,165), которое необходимо в дальнейшем для регенерации ионизированной формы Asp-33. Однако такое распределение Н-связей требовало затраты энергии примерно 10 ккал/моль (рис. 2).

В связи с этим более вероятно, на наш взгляд, то, что трансформация неактивного тетраэдрического промежуточного соединения (состояния II) в состояние IV обеспечивается синхронным поворотом карбоксильных групп реакционных кислот с сохранением Н-связи между ними, при этом активационный барьер (в модельной системе) снижается примерно до 6 ккал/моль. В реальных фермент-субстратных комплексах этого энергетического барьера, возможно, и не будет вследствие большей подвижности боковых групп остатков Asp-33 и Asp-213 в целом в отличие от анализируемой модельной системы, в которой C^γ-атомы карбоксильных групп (как было отмечено выше) были фиксированы относительно C'-атома N-метилацетамида (допускалось вращение только вокруг C^β-C^γ-связи).

Карбоксильная группа Asp-213 (потенциальный донор протона на амидный азот N-метилацетамида) в состоянии IV находится в стабильной *син*-конформации [18]. Поэтому, как нами было показано, образование относительно стабильного протонированного тетраэдрического промежуточного соединения (состояния V) возможно только одновременно с протонированием O^{δ2}-атома Asp-213 H2W-протоном и последующим разрывом Н-связи между карбоксильными группами реакционных кислот. Оптимизированная структура, протонированная по амидному азоту (состояние V), показана на рис. 6. Это состояние характеризовалось только одной сильно укороченной Н-связью длиной 1,297 Å (табл. 1). Направление ее близко к *син*-конформации по отношению к карбоксильной группе Asp-213. Поэтому обязательным условием существования состояния V является протонирование O^{δ2}-атома Asp-213. Другими словами, в состоянии V уже на стадии протонирования N-атома реакционные кислоты должны быть регенерированы, однако отсутствие между ними Н-связи (как в состоянии I) повышало энергию модельной системы в состоянии V примерно на 25 ккал/моль (рис. 2). Но этот активационный барьер вследствие полуэмпиричности метода CNDO/2 [16] оказался несколько завышенным. Расчеты *ab initio* переноса протона для простейших систем [23] (например, при переносе протона от CH₃COOH к CH₃NH₂) показывают, что значение этого барьера не должно превышать 5—7 ккал/моль (даже для карбоксильной группы, находящейся в стабильной *син*-конформации [18]). Порядок амидной C'-N-связи N-метилацетамида в состоянии V понижался до значения 0,768 (рис. 2), характерного для протонированных по азоту амидов (см. табл. 1 в [14]), что исключало в дальнейшем все препятствия для распада этого состояния на продукты гидролиза.

Постатийная схема гидролиза амидов аспартильными протеиназами, подтвержденная нашими расчетами, приведена на рис. 7.

Важно отметить, что протонирование амидного азота N-метилацетамида через промежуточный акцептор — общее свойство как ковалентного, так и общего основного механизмов катализа. В случае аспартильных протеиназ в роли такого промежуточного акцептора протона выступает карбонильный кислород N-метилацетамида (это видно при трансформации состояния III в состояние IV). В реальных фермент-субстратных комплексах роль карбонильного кислорода субстрата хорошо иллюстрируется данными по рентгеноструктурному анализу комплексов пенициллопепсина с пепстатином (см. рис. 2b в [4]). Структуру этих комплексов до

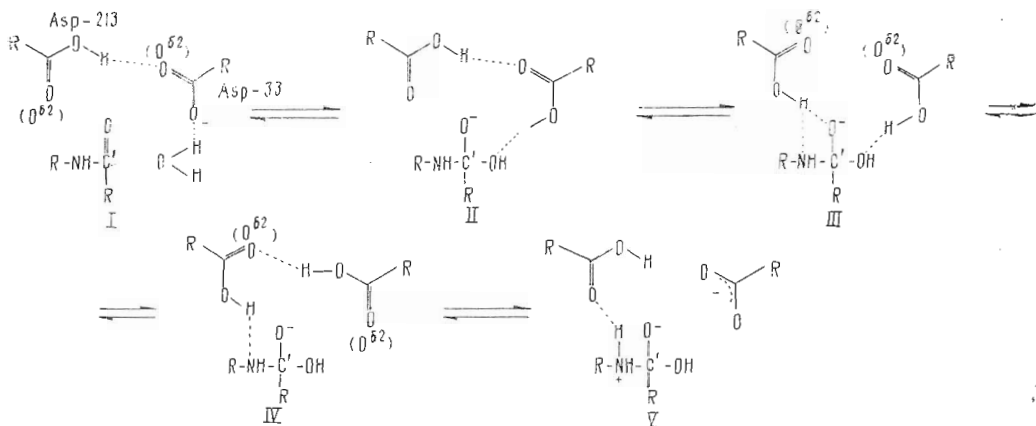


Рис. 7. Схема механизма катализа аспартильными протеиназами ($R=CH_3$)

некоторой степени можно сравнить с состоянием III анализируемой модельной системы: отсутствие поблизости конкурирующего за протон амидного азота в остатке Sta-4 препятствует дальнейшей трансформации тетраэдрического промежуточного соединения в состоянии IV (образуется устойчивая Н-связь между гидроксильным протоном Sta-4 и $O^{\delta 2}$ -атомом Asp-213), что делает эти комплексы ингибиторными. Серпиновые протеиназы, работающие по ковалентному механизму, используют в качестве такого промежуточного акцептора $N^{\delta 2}$ -атом остатка His-57 (см. рис. 3 в [1] и рис. 8 в [20]).

Одна из важнейших особенностей общего основного механизма катализа аспартильными протеиназами, отличающая их от серпиновых и тиоловых протеиназ, работающих по ковалентному механизму [13], — это отсутствие (на всех стадиях гидролиза) промежуточных соединений, в которых субстрат и его производные валентно связаны с реакционными группами активного центра (например, Asp-33 и Asp-213). Особенно заметно это свойство катализа аспартильными протеиназами сказывается при формировании продуктивного фермент-субстратного комплекса с частичной резонансно дестабилизированной (пирамидализованной) амидной группой субстрата. В подобных комплексах, как нами было показано в предыдущих сообщениях [15, 20], невалентные вторичные взаимодействия различных группировок субстрата и фермента заставляют сблизиться атакующий атом нуклеофила и карбонильный C' -атом субстрата до расстояний, значительно меньших суммы ван-дер-ваальсовых радиусов этих атомов. При таких аномально коротких расстояниях между карбонильным C' - и нуклеофильным атомами последний будет индуцировать определенную степень пирамидализации (Δ_c) C' -атома, которая будет определяться в основном структурой субстрата и зарядом на реакционном атоме нуклеофила.

В случае катализа серпиновыми и тиоловыми протеиназами, протекающего по ковалентному механизму [13], отрицательные заряды O^- -атома остатка Ser-195 и S^- -атома остатка Cys-25 соответственно — величины относительно постоянные и поэтому степень резонансной дестабилизации амидной группы для различных субстратов определяет только расстояние $C'-O^-$ (или $-S^-$) (см. рис. 5 в [15]).

Нуклеофильной группировкой в аспартильных протеиназах является молекула воды, один из протонов которой (в анализируемой модельной системе это H2W) взаимодействует через водородную связь с $O^{\delta 1}$ -атомом ионизированной формы остатка Asp-33, которая выступает в роли общего основного катализатора. Как можно видеть из табл. 2 (в которой приведены заряды на различных нуклеофильных O-атомах), величина отрицательного заряда OW-атома сильно зависит от длины Н-связи между H2W-протоном и $O^{\delta 1}$ -атомом в основном состоянии I. В такой ситуации эффективности нуклеофильной атаки даже для субстратов, одинаково

Локализованных по отношению к реакционному OW-атому в продуктивном фермент-субстратном комплексе (состояние I), могут заметно различаться, так как в этих комплексах различная локализация молекулы воды по отношению к карбоксильной группе остатка Asp-33 может в довольно широких пределах изменять отрицательный заряд на OW-атоме и тем самым степень пирамидализации амидной группы (рис. 2 и таблица в [15] и табл. 2). Другими словами, при образовании продуктивных фермент-субстратных комплексов эффективность и специфичность гидролиза определяют не только локализация субстрата, но и положение нуклеофильной молекулы воды.

Очень важно отметить, что именно невалентная природа взаимодействия активных групп фермента, молекулы воды и субстрата повышает их мобильность, чего нельзя было полностью оградить при проведенном нами анализе довольно жесткой модельной системы. Определить степень подвижности компонентов фермент-субстратных комплексов, основываясь на результатах проанализированной нами химической модели, возможно только при наличии данных (будут опубликованы позднее) о динамике локализации компонентов комплексов методом атом-атомных потенциалов [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров С. Л., Антонов В. К. // Молекулярн. биология. 1937. Т. 21. № 1. С. 147—158.
2. James M. N. G., Sielecki A. R. // J. Mol. Biol. 1933. V. 163. P. 299—361.
3. 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.
4. James M. N. G., Sielecki A. R. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3701—3713.
5. Suguna K., Padlan E. A., Smith C. W., Carlson W. D., Davies D. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7009—7013.
6. Andreeva N. S., Guslichina A. E., Fedorov A. A., Shutzkever N. E., Volnova T. V. // Adv. Exp. Med. Biol. 1977. V. 95. P. 23—31.
7. Andreeva N. S., Zdanov A. S., Guslichina A. E., Fedorov A. A. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. P. 11353—11365.
8. Hofmann T., Hodges R. S., James M. N. G. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 635—643.
9. Subramanian E., Swan I. D. A., Liu M., Davies D. R., Jenkins J. A., Tickle I. J., Blundell T. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 556—559.
10. Jenkins J., Tickle I., Sewell T., Ungaretti L., Wollmer A., Blundell T. // Acid proteases, structure, function and biology / Ed. Taub J. N. Y.: Plenum Press, 1977. P. 43—60.
11. Антонов В. К. Химия протеолитиза. М.: Наука, 1983. С. 240.
12. Antonov V. K., Gnodman L. M., Rumsh L. D., Kapitannikov Y. V., Barshevskaya T. N., Yavashev L. P., Gurova A. G., Volkova L. I. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. P. 195—200.
13. Антонов В. К. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 6. С. 805—839.
14. Александров С. Л., Антонов В. К., Мельников П. Н. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. № 6. С. 1569—1575.
15. Александров С. Л., Антонов В. К. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. № 6. С. 1576—1582.
16. Pople J. A., Beveridge D. K. Approximate molecular orbital theory. N. Y.: McGraw-Hill, 1970.
17. Rinaldi D. GEOMO (ОСРЕ program N290). Bloomington: Indian Univ., 1974.
18. Gandour R. D. // Bioorg. Chem. 1931. V. 10. P. 169—176.
19. Scheraga H. A. // Adv. Phys. Org. Chem. 1963. V. 6. P. 103—184.
20. Антонов В. К., Александров С. Л. // Физико-химические проблемы ферментативного катализа / Ред. Торчинский Ю. М. М.: Наука, 1984. С. 232—241.
21. Choi M. U., Thornton E. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. P. 1423—1436.
22. Proton-transfer reactions / Eds. Caldin E. F., Gold Y. London: Chapman and Hall Co., 1975.
23. Scheiner S. // Acc. Chem. Res. 1985. V. 18. P. 174—180.

Поступила в редакцию
27.VI.1990

QUANTUM-CHEMICAL ANALYSIS OF THE PROTEOLYTIC ENZYMES ACTION
MECHANISM. IV. THE HYDROLYSIS OF AMIDES
BY ASPARTYL PROTEASES

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The model systems of amide hydrolysis in the presence of two acetic acid molecules (modelling the Asp-33 and Asp-213 residues) with the former molecule ionized was analysed by the CNDO/2 method. Polarization of the C=O bond in N-methylacetamide (modelling a substrate) and, moreover, protonation of the carbonyl O-atom were found to be practically impossible for all permissible positions of the Asp-213 H^{δ₁}-proton. The efficiency of the nucleophilic attack proceeding via general base mechanism was shown to be due to the increased negative charge on the reacting O-atom of a water molecule, whose one of the protons is hydrogen-bonded with one of the acetate anion's O-atoms. The proton transfer on the amide N-atom of the substrate's leaving group is also realized by acetic acid (Asp-213), which, at a certain substrate orientation, is the proton donor after synchronous rotation of both carboxyl groups of the reacting acids on 180° around C^β—C^γ bond. Efficiency and specificity of the amide hydrolysis are suggested to depend on the orientation of the water molecule with regard to the Asp-33 O-atom (the hydrogen bond length determining the excess of the negative charge on the water molecule's O-atom), and of the substrate (especially, its peptide bond) with regard to the plane of the conjugated O-atoms of two acetic acid molecules.