

УДК 577.15

БИОХИМИЯ

Ю. И. ХУРГИН, К. Я. БУРШТЕЙН

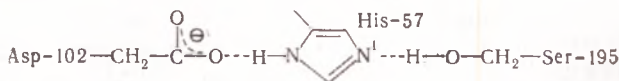
**МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА В РЕАКЦИЯХ АЦИЛИРОВАНИЯ  
 $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА**

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 17 IV 1974)

Изучение взаимодействия  $\alpha$ -химотрипсина с субстратами — производными аминокислот ( $\text{RCOX}$ ,  $\text{R}=\text{YCO}'\text{NHCHR}'$ ,  $\text{X}=\text{OR}''\text{NHR}''$ ) показало существование в активном центре участков  $\rho_1$  и  $\rho_2$ , отвечающих за связывание  $\text{YCO}'\text{NH}$ -группы и боковой группы  $\text{R}'$ , и каталитического центра  $\rho_3$  (1). Ферментативная реакция проходит не менее чем в три стадии: образование комплекса фермента (ЕОН) с субстратом, ацилирование  $\gamma$ -ОН-группы остатка Ser-195 в центре  $\rho_3$  и гидролиз ацилфермента (2):



Если  $\text{X}=\text{NHR}''$ , то ацилирование фермента (3) является реакцией алкоголиза амидов с участием нейтральной оксигруппы. Обычно эта реакция не проходит, но она проходит легко, если нуклеофильным реагентом является алкоголят-ион (4). Для объяснения высокой реакционной способности оксигруппы Ser-195 предложены различные механизмы (5), допускающие перенос протона  $\text{H}^1$  к атому  $\text{N}^1$  имидазольной группы (Im) остатка His-57 в центре  $\rho_3$  (рис. 1). В модельной системе спирт — имидазол перенос протона практически не наблюдается (6). Такой перенос протона должен облегчаться в системе групп  $\rho_3$ , связанных водородными связями (7):



Было высказано предположение о синхронных сдвигах двух протонов в такой системе с возможностью образования алкоголят-иона (7). Также предполагали, что протонирование отщепляемой группы  $\text{X}$  происходит через промежуточное протонирование атома  $\text{N}^1$  остатка His-57. Подобные сдвиги протонов были обнаружены в модельных комплексах имидазола в апротонной среде (6). Однако наличие или отсутствие синхронных сдвигов протонов в активном центре химотрипсина пока не доказано.

В настоящей работе сдвиги протонов в фрагменте, содержащем группы центра  $\rho_3$ , были изучены теоретически, методами квантовой химии. Геометрия фрагмента задавалась координатами атомов по данным рентгеноструктурного анализа (8). На положение протонов  $\text{H}^1$  и  $\text{H}^2$  (рис. 1) могут оказать влияние взаимодействия  $\beta$ - $\text{COO}^-$ -группы Asp-102 с  $\gamma$ -ОН-группой Ser-214 и пептидной NH-группой His-57; для их учета включены соответствующие молекулы (рис. 1). Для расчета использован полуэмпирический квантовохимический метод CNDO/BW (9), пригодный для расчета положений протонов в системах с водородными связями (10).

Анализ пространственной структуры  $\alpha$ -химотрипсина и данные расчета позволяют оценить возможность сдвигов протонов  $\text{H}^1$  и  $\text{H}^2$  на стадии ацилирования.

1. Водородные связи в центре  $\rho_3$  неэквивалентны, их длина существенно различается (рис. 1), связь В1 доступна для растворителя, В2 — экранирована. Неравноценность водородных связей характерна и для активных центров других протеиназ, например субтилизина (<sup>11</sup>). Длина связи  $\text{H}^1\text{—O}^1$  составляет 1 Å; для переноса  $\text{H}^1$  на атом  $\text{N}^1$  требуется преодоление большого барьера (рис. 2). В связи В2 протон  $\text{H}^2$  делокализован между атомами  $\text{O}^2$  и  $\text{N}^2$ . На положение  $\text{H}^2$  сильное влияние могут оказать дополнительные взаимодействия (<sup>10</sup>).

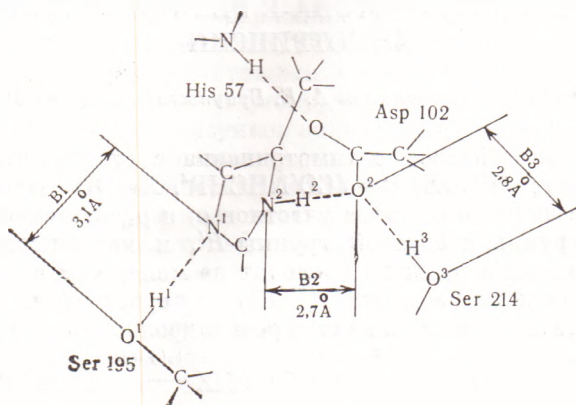


Рис. 1. Структура фрагмента молекулы  $\alpha$ -химотрипсина, содержащего каталитический центр  $\rho_3$ , по (<sup>8</sup>) (проекция на плоскость  $X-Y$ ).

2. Перенос протона  $\text{H}^1$  в связи В1 практически неосуществим (рис. 2). Высота барьера для этого переноса заметно снижается в присутствии субстрата, если расстояние С-карбонильного атома  $\text{RCOX}$  от атома  $\text{O}^1$  остатка Ser-195 достаточно для образования аддукта (Т) с тетраэдрическим атомом углерода (рис. 2 и 3) (<sup>12</sup>). Однако барьер все еще весьма велик из-за большой длины связи В1 ( $\sim 40$  ккал/моль). Таким образом, протонирование

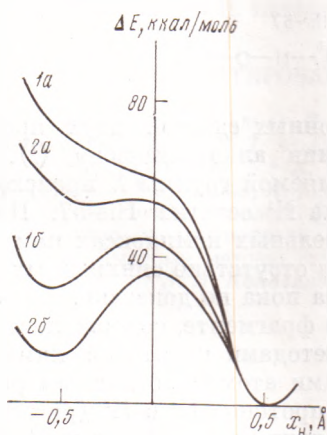


Рис. 2. Влияние положения протона  $\text{H}^1$  ( $X_{\text{H}}$ ) на полную энергию центра  $\rho_3$  (рис. 1) при различном положении протона  $\text{H}^2$  (1 — у атома  $\text{N}^2$  и 2 — у атома  $\text{O}^2$ ) в отсутствие (а) и в присутствии (б) молекулы  $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$ , моделирующей субстрат; ее атом С располагался на расстоянии 1,5 Å от атома  $\text{O}^1$ . Ось  $X_{\text{H}}$  направлена от  $\text{N}^1$  к  $\text{O}^1$ . Положение  $X_{\text{H}}=\text{O}$  находится посередине между атомами  $\text{O}^1$  и  $\text{N}^1$ .

$\text{Im}$ -группы, принятое в предложенных ранее механизмах ацилирования (<sup>5</sup>), практически неосуществимо. В проведенном ранее расчете фрагмента  $\rho_3$  методом CNDO/2 (<sup>13</sup>) для двух положений  $\text{H}^1$  (у атомов  $\text{O}^1$  и  $\text{N}^1$ ) не учтено наличие барьера между двумя этими положениями (см. рис. 2). Но и в этом случае требуется затрата энергии не менее 40 ккал/моль. Поэтому вывод (<sup>13</sup>), подтверждающий возможность синхронного переноса протонов в

связях В1 и В2, является ошибочным, и следует искать другой механизм участия групп центра  $\rho_3$  в катализе на стадии ацилирования фермента.

3. Модельные реакции ацильного переноса в водной среде лимитируются стадией образования аддукта (Т); его превращение в конечные продукты реакции происходит легко по механизму кислотно-основного катализа за счет обмена протонами с компонентами среды (<sup>12</sup>). Связывание субстрата в активном центре фермента (<sup>14</sup>) должно существенно облегчать образование аддукта (Т). В комплексе фермент — субстрат (<sup>15</sup>) имеется

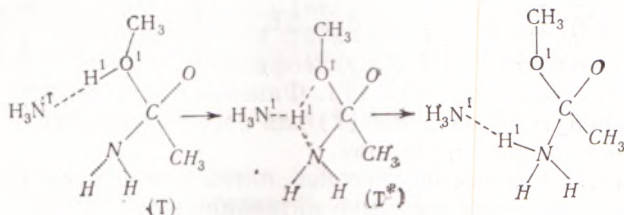
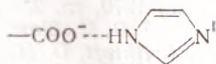


Рис. 3. Схема переноса протона в аддукте (Т) в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина

предельное насыщение водородными связями, и поэтому обмен протонами между аддуктом (Т) и средой невозможен; для протекания реакции ацилирования необходим внутримолекулярный перенос протона  $H^1$  к отщепляемой группе X. Этот процесс, вероятно, происходит после образования аддукта (Т) без промежуточных стадий в поле хорошего акцептора протона — атома  $N^1$  в системе



Расчет модельной системы (рис. 3) показал, что высота барьера для переноса протона  $H^1$  к группе X составляет 15–20 ккал/моль, в отсутствие молекулы катализатора ( $NH_3$ ) 45 ккал/моль. В центре  $\rho_3$  фермента атом  $N^1$  имеет большее сродство к протону, чем атом N молекулы  $NH_3$ ; поэтому в ферментативной реакции высота барьера не должна превышать 15 ккал/моль. Для субстратов сложноэфирного типа ( $X=OR''$ ) барьер внутримолекулярного переноса протона значительно ниже; скорость реакции ацилирования лимитируется стадией образования аддукта (Т), и каталитический эффект в этом случае определяется сближением и ориентацией групп активного центра и молекулы субстрата (<sup>14</sup>), а ферментативный гидролиз амидов лимитируется, по-видимому, рассмотренным выше внутримолекулярным переносом протона.

4. Рассмотрим возможные пути увеличения реакционной способности групп центра  $\rho_3$ . Взаимодействие  $YCO'NH$ -группы субстрата с центром  $\rho_1$  — пептидной  $C=O$ -группой остатка Ser-214 (<sup>16</sup>) может привести к смещению этого участка пептидной цепи фермента, и можно высказать предположение о последующем разрыве водородной связи В3 (рис. 1) и о некотором смещении протона  $H^2$  к атому  $O^2$ . Это может вызвать дополнительную активацию групп центра  $\rho_3$  на стадиях образования аддукта (Т) и при внутримолекулярном переносе протона. Этот вывод согласуется с наблюдаемым увеличением прочности связывания субстрата с одновременным резким падением каталитической активности  $\alpha$ -химотрипсина при невозможности взаимодействия субстрата с центром  $\rho_1$  (<sup>17</sup>), а также при химической модификации групп центра  $\rho_3$  (<sup>18</sup>).

Карбонильный атом О молекулы субстрата образует водородные связи с пептидными NH-группами остатков Gly-193 и Ser-195 (16). Расчет модельной системы показал, что образование каждой из таких связей снижает барьер внутримолекулярного переноса протона в (Т) на 1,5 ккал/моль.

5. Первой стадией реакции, катализируемой  $\alpha$ -химотрипсином, является, вероятно, энергетически выгодное связывание центром  $\rho_2$  боковой группы R' субстрата; связывание не строго комплементарно и допускает, вероятно, некоторую подвижность группы R' (19). На этой стадии изменяется конформация центра  $\rho_3$  (подготовка группы NH остатка Gly-193 к связыванию группы C=O субстрата) (16). Взаимодействие YCO'NH-группы субстрата может несколько ослабить взаимодействие R' с  $\rho_2$  и увеличить сродство к протону атома N<sup>1</sup> и нуклеофильность атома O<sup>1</sup> в центре  $\rho_3$ , что облегчает образование аддукта (Т). Фиксация C=O-группы субстрата создает оптимальную ориентацию (Т) для переноса протона с участием атома N<sup>1</sup>, снижая барьер этой реакции.

Связывание в каждом из участков активного центра  $\alpha$ -химотрипсина должно вносить вклад в снижение активационного барьера реакции; наибольший вклад дает наличие экранированной  $\beta$ -COO<sup>-</sup>-группы остатка Asp-102. Наблюдаемый каталитический эффект определяется совокупным действием всех факторов.

Институт органической химии  
им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
15 IV 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> G. Hein, C. Nieman, J. Am. Chem. Soc., v. 84, № 23, 4495 (1962). <sup>2</sup> M. L. Bender, F. Kezdy, Ann. Rev. Biochem., v. 34, 49 (1964). <sup>3</sup> I. V. Berezin, N. F. Kazanskaya et al., Europ. J. Biochem. v. 38, № 3, 529 (1973). <sup>4</sup> R. L. Showen, C. R. Hopper, C. M. Bazikian, J. Am. Chem. Soc., v. 94, № 9, 3095 (1972). <sup>5</sup> Т. Брюс, С. Бенкович, Механизмы биоорганических реакций, М., 1970, гл. 2. <sup>6</sup> Ю. И. Хургин, Т. Н. Филагорова, Изв. АН СССР, сер. хим., 1973, 2315. <sup>7</sup> D. M. Blow, J. J. Birktoft, B. S. Hartley, Nature, v. 221, № 5178, 337 (1969). <sup>8</sup> J. J. Birktoft, D. M. Blow, J. Mol. Biol., v. 68, № 2, 187 (1972). <sup>9</sup> R. J. Boyd, M. A. Whitehead, J. Chem. Soc. Dalton Trans., № 1, 73 (1972). <sup>10</sup> К. Я. Буриштейн, Ю. И. Хургин, Изв. АН СССР, сер. хим., 1974, 294. <sup>11</sup> С. S. Wright, J. Mol. Biol., v. 67, № 1, 151 (1972). <sup>12</sup> К. Я. Буриштейн, Ю. И. Хургин, Изв. АН СССР, сер. хим., 1974, 579. <sup>13</sup> H. Uneyama, A. Imamura et al., J. Theoret. Biol., v. 41, № 3, 485 (1973). <sup>14</sup> И. В. Березин, К. Мартинек, Журн. Всесоюз. хим. общ., т. 16, № 4, 441 (1971). <sup>15</sup> A. R. Fersht, D. M. Blow, J. Festerz, Biochemistry, v. 12, № 11, 2035 (1973). <sup>16</sup> R. Henderson, J. Mol. Biol., v. 54, № 2, 341 (1970). <sup>17</sup> M. Carlou, C. Harper, J. Am. Chem. Soc., v. 94, № 18, 6508 (1972). <sup>18</sup> В. К. Антонов, Т. И. Ворогынцева, ДАН, т. 202, № 6, 1441 (1972). <sup>19</sup> В. А. Самокиш, Е. В. Ануфриева, М. В. Волькенштейн, Мол. биол., т. 5, № 5, 711 (1971).