

Введение Гидролиз пептидной связи – ключевой процесс метаболизма живых организмов. Детальное понимание механизмов регуляции биохимических реакций необходимо для расширения наших представлений о природе многокомпонентных взаимодействий, как базиса для функционирования биологических систем, а также является основой для разработки более эффективных биотехнологических приложений. Изучение неферментативного гидролиза является основанием для оценки эффективности ферментативного катализа [1], а также представляет самостоятельный интерес, в том числе, для биофармацевтики [2,3]. При гидролитическом расщеплении пептидная связь диссоциирует в присутствии молекулы воды, при этом один из фрагментов родительской молекулы получает атом водорода диссоциированной молекулы воды, а другой – гидроксильную группу. Механизмы неферментативного гидролиза в настоящее время широко исследуются экспериментально [4,5] и теоретически [6-8]. Тем не менее, некоторые аспекты остаются неисследованными, в том числе вопросы о механизмах регуляции скоростей гидролиза низкомолекулярными органическими соединениями. В данной работе мы исследуем влияние гидроксилсодержащих соединений на структуру переходного состояния и соответствующей энергии активации при неферментативном нейтральном гидролизе на примере дипептида аланина. Здесь мы рассматриваем один из возможных механизмов, при котором нуклеофильная атака воды на атом углерода идет одновременно с переносом протона атомом азота. Поскольку нуклеофильная атака углерода является скоростью-лимитирующей стадией при двухстадийном механизме гидролиза [6], ожидается, что в последнем будут реализовываться те же принципы регуляции скорости, что и для рассматриваемого в данной работе случая. Выбранные молекулы спиртов – метанола, этанола и 1-пропанола, карбоновых кислот в недиссоциированной форме – пропионовой, молочной и пировиноградной кислот, являются моделями низкомолекулярных метаболитов гликолиза, присутствующих в живой клетке, а молекулы воды представляют естественное окружение пептидов в природе. Метод теории функционала плотности (ТФП) широко применяется для расчетов энергий активации и геометрии молекулярных комплексов в ходе различных химических реакций [6-11]. В данной работе методом ТФП получены профили реакции нейтрального гидролиза в системах «дипептид аланина – молекула воды», «дипептид аланина – молекула воды – гидроксилсодержащее соединение». Влияние гидроксилсодержащих соединений на структуру переходного состояния и энергию активации обсуждается в рамках теории донорно-акцепторных взаимодействий. Квантово-химические расчеты Исходная структура дипептида аланина была слабо модифицирована путем замещения гидроксильной группы С-концевого карбонила и одного из атомов водорода N-концевого амина метильными группами, чтобы минимизировать влияние концевых групп на

исследуемую реакцию. Квантово-химические расчеты проводились с использованием программы Gaussian 09 [12]. Полная оптимизация геометрических параметров всех молекулярных структур, проводилась с использованием трехпараметрического обменно-корреляционного функционала B3LYP [13,14] и базисного набора 6-31G(d). Соответствие найденных структур переходному состоянию и одномерным максимумам на поверхности потенциальной энергии, подтверждали на основе анализа колебательных частот и наличия среди них одной мнимой частоты, соответствующей координате реакции. Спуски по внутренней координате реакции проводили для подтверждения того, что найденное переходное состояние соответствует исследуемой реакции. Соответствие геометрии реагентов локальным минимумам устанавливали на основании отсутствия мнимых частот. Значения энергии полученных переходных состояний и реагентов уточнялись на уровне B3LYP/6-31+G(2df,p) с учетом поляризационных эффектов среды с помощью континуальной модели растворителя CPCM [15] на основании single point расчетов. Значения свободных энергий Гиббса в газовой фазе ($T=298,15$ К, $p=1$ атм) рассчитаны с учетом энергии нулевых колебаний, а также соответствующих термических поправок к электронной энергии. Энергию активации рассчитывали по формулам: $DE = E_{TS} - E_{rept} - EW$ (1) и $DE = E_{TS} - E_{rept} - EW - ES$ (2) для двух и трех компонентной системы, соответственно, где E_{TS} , E_{rept} , EW и ES – энергия, соответственно, переходного состояния, дипептида, молекулы воды и гидроксилсодержащего соединения. Свободная энергия Гиббса и ее энтропийный член были рассчитаны по аналогичным формулам относительно отдельных реагентов. Значения энергии активации даны с поправкой на энергию нулевых колебаний. Результаты и обсуждение

Структура переходного состояния TS для молекулярной системы «дипептид аланина – молекула воды» приведена на рисунке 1. В TS молекула воды и пептидная группа образуют кольцевую структуру CNHO, в которой атом кислорода молекулы воды и атом углерода пептидной группы сближены на расстоянии $r_{Crept...OW}$ 1,852 Å (здесь и далее нижние индексы w – вода, rept – дипептид), а атом водорода молекулы воды и пептидный атом азота находятся на расстоянии $r_{Nrept...HW}$ 1,2 Å. Гидроксильная связь молекулы воды OW-HW растянута до 1,324 Å по сравнению с длиной OW-HW связи молекулы воды в основном состоянии (0,97 Å), а пептидная связь удлиняется на 0,238 Å (относительно длины C-N связи дипептида в основном состоянии – 1,363 Å). Рис. 1 - Структура переходного состояния TS в системе «дипептид аланина – молекула воды»

Добавление второй молекулы воды к TS приводит к образованию наиболее энергетически выгодного комплекса, геометрия которого представлена на рисунке 2. В TS+w дополнительная молекула воды образует одну водородную связь с реакционной молекулой воды и одну водородную связь с карбонильным атомом кислорода дипептида. Расстояние между атомом кислорода дополнительной молекулы

воды и атомом водорода реакционной молекулы воды $r_{HS...OW}$ составляет 1,809 Å (индекс s – гидроксилсодержащее соединение) (Табл. 1). Образование водородной связи приводит к изменению геометрии кольца CNHO по сравнению с TS: расстояние между атомом кислорода реакционной воды и атомом углерода $C_{rept...OW}$ дипептида уменьшается, расстояние между атомом водорода реакционной воды и пептидным атомом азота $N_{rept...HW}$ увеличивается, при этом рвущаяся ковалентная связь OW–HW укорачивается. Дополнительная молекула воды выступает в роли донора неподеленной пары электронов по отношению к реакционной молекуле воды и способствует ее нуклеофильной атаке на пептидный атом углерода. Рис. 2 - Структура переходного состояния TS+w в системе «дипептид аланина – молекула воды – молекула воды»

Таблица 1 - Межатомные расстояния в переходном состоянии для разных систем (Å)

Система	C-N	OW...C	HW...N	HW...OS	HS...OW	TS
TS	1.601	1.852	1.2			
TS+w	1.606	1.686	1.273	1.809	1.809	
TS+MeOH	1.598	1.694	1.271	1.818	1.778	
TS+EtOH	1.597	1.686	1.273	1.756	1.827	
TS+PrOH	1.599	1.685	1.273	1.752	1.819	
TS+PrA	1.6	1.637	1.296	1.769	1.608	
TS+PA	1.591	1.646	1.297	1.771	1.568	
TS+LA	1.593	1.632	1.301	1.798	1.552	

w - вода, MeOH - метанол, EtOH -этанол, ProH-1-пропанол, PrA - пропионовая кислота, PA - пировиноградная кислота, LA - молочная кислота

Взаимодействие молекул спиртов или карбоновых кислот с реакционной молекулой и дипептидом в такого типа комплексах, где они выступают по отношению к реакционной молекуле воды как доноры неподеленной пары электронов, приводят к еще большему уменьшению расстояния $C_{rept...OW}$, увеличению расстояния $N_{rept...HW}$ и укорочению рвущейся связи OW–HW по сравнению с TS. Эти изменения коррелируют с изменением рК гидроксилсодержащих соединений, а также с изменением энергии активации реакции (рис. 3). Энергия активации TS в системе "дипептид - молекула воды", рассчитанная на уровне B3LYP/3-61G(d), составляет 40 ккал/моль, что хорошо согласуется со значениями, полученными ранее для гидролиза формамида [6,7]. Увеличение базисного набора до B3LYP/3-61+G(2df,p) и учет континуума среды приводит к увеличению значения энергии активации до 48,5 ккал/моль. Вклад в увеличение энергии активации вносят как расширение базисного набора, так и включение поляризационно-континуальной модели растворителя. Ранее увеличение энергии активации гидролиза формамида при учете поляризационно-континуальных моделей воды сообщалось в работе [7]. Надо отметить, что учет среды растворителя с помощью CPCM при расчете отдельных компонентов ведет к понижению энергии как переходного состояния, так и реагентов, но при этом энергия переходного состояния, по-видимому, переоценивается по сравнению с реагентами. Свободная энергия активации Гиббса TS составляет 51 и 60.3 ккал/моль, соответственно для базиса 6-31G(d) и 6-31+G(2df,p), эти значения согласуются с литературными данными, полученными на разных уровнях теории 44 - 57 ккал/моль [6,7].

Таблица 2 - Термодинамические параметры реакции гидролиза, рассчитанные с

разными базисными наборами 6-31G(d) 6-31+G(2df,p) DE -TDS DG DE -TDS DG TS
40 12.5 51 48.5 13 60.3 TS+w 29.6 23.1 50.3 46.7 22.5 69.4 TS+MeOH 27.5 23.4 49.1
45.7 22.9 68.7 TS+EtOH 27.7 23.6 49.6 45.8 22.8 68.7 TS+PrOH 27.6 23.3 49.3 46.2
22.8 69.1 TS+PrA 23.2 24.2 45.9 40.9 24.6 65.4 TS+PyrA 23.1 23.9 45.5 39.9 24.7
64.4 TS+LacA 23 24.3 44.8 40 26.6 65.6 w - вода, MeOH - метанол, EtOH -этанол,
ProH - 1-пропанол, PrA - пропионовая кислота, PA - пировиноградная кислота, LA -
молочная кислота При добавлении второй молекулы воды к системе "пептид -
реакционная молекула воды" энергия активации TS+w, рассчитанная с базисом
6-31G(d) уменьшается на 10.4 ккал/моль. При расчете с базисом 6-31+G(2df,p)
добавление второй молекулы воды к системе понижает значение энергии
активации лишь на 1,8 ккал/моль. Такая существенная разница, видимо,
отражает известный факт, что большие базисные наборы позволяют получить
наиболее точное значение энергии и с увеличением базиса снижается
необходимость вводить поправку BSSE. В то же время при переходе от системы
из двух молекул к системе из трех молекул независимо от базиса увеличивается
энтропийный вклад в свободную энергию по сравнению с TS (на ~10 ккал/моль),
что обусловлено нескомпенсированным вкладом вращательной компоненты. В
базисе 6-31G(d) уменьшение энергии (следовательно энтальпии) и увеличение
энтропии компенсируют друг друга, при этом свободная энергия активации
TS+w уменьшается на 0,7 ккал/моль по сравнению с TS. Тогда как в базисе 6-
31+G(2df,p) нескомпенсированные изменения энтальпии и энтропии приводят к
тому, что свободная энергия активации TS+w увеличивается на 9 ккал/моль по
сравнению с TS. При замене второй молекулы воды на молекулу спирта или
карбоновой кислоты наблюдается понижение энергии активации и свободной
энергии активации в ряду вода > спирты > карбоновые кислоты. Наиболее
сильно активационный барьер понижают молекулы пировиноградной и
молочной кислот - на 17 ккал/моль в базисе 6-31G(d) и на 8,5 ккал/моль 6-
31+G(2df,p). Понижение свободной энергии активации в базисе 6-31G(d)
составляет 6,2 ккал/моль. Рис. 3 - Изменение расстояния между пептидной
группой и реакционной молекулой воды Npept...HW (черными квадратами),
Srept...OW (белыми квадратами) и длины OW-HW связи воды (кружочки) от
изменения энергии активации в двойной системе «дипептид аланина – молекула
воды – гидроксилсодержащее соединение» относительно двойной системы
«дипептид аланина – молекула воды» на уровне B3LYP/6-31G(d), т.е. точка (0,0)
соответствует TS; коэффициенты корреляции для трех групп значений 0,98
Таким образом, молекулы гидроксил-содержащих соединений, образуя
водородные связи с реакционной молекулой воды и пептидом в переходном
состоянии понижают активационный барьер гидролитической реакции. На
рисунке 3 представлены изменения некоторых геометрических параметров
переходных состояний с молекулами исследованных гидроксилсодержащих
соединений относительно TS в зависимости от относительного изменения

энергии активации. Линейный характер зависимостей свидетельствует о ключевой роли донорно-акцепторных взаимодействий молекул растворителя в переходном состоянии на скорость реакции.