

О. Н. Макшакова, Е. А. Ермакова, Д. В. Чачков

## ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОЛЕКУЛ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ НА КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

*Ключевые слова:* кислотный гидролиз, пептидная связь, карбоновые кислоты, теория функционала плотности.

*На основании расчетов на уровне теории функционала плотности исследовано влияние пропионовой кислоты на кислотный гидролиз дипептида аланина при двух механизмах: согласованного некатализируемого и согласованного катализируемого. Показано, что в обоих случаях активационный барьер реакции понижается по сравнению с водными системами.*

*Keywords:* acid hydrolysis, peptide bond, carboxylic acids, density functional theory.

*On the basis of the calculations at the density functional theory it has been studied the influence of propionic acid on the acid promoted hydrolysis of alanine dipeptide at two mechanisms: concerted catalyzed and concerted non-catalyzed. It was revealed that in both cases the reaction activation barrier decreases comparing with aqueous systems.*

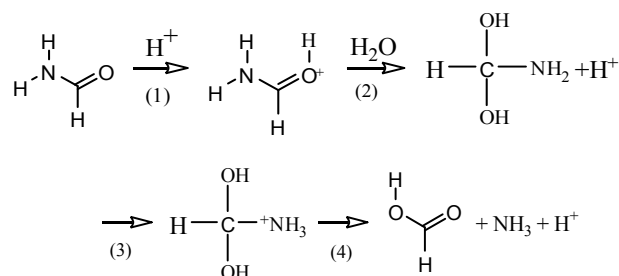
### Введение

Гидролиз пептидной связи – один из ключевых процессов 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 неэнзиматического гидролиза необходимо для оценки эффективности ферментативного катализа [1], а также представляет самостоятельный интерес, в том числе, для биофармацевтики [2-4].

В водном растворе молекулы воды находятся как в диссоциированной, так и нейтральной форме. Реакция гидролиза с участием дополнительного протона воды получила название кислотного гидролиза, что и является предметом данного исследования. Механизм кислотного гидролиза амидов интенсивно исследовался экспериментально [5-8] и теоретически [9-14]. Была предложена следующая схема реакции на основе экспериментальных исследований [5, 8]. На первом этапе происходит протонирование карбонильного атома кислорода, этот процесс равновесный и не требует больших энергетических затрат (см. схема). На втором этапе происходит нуклеофильная атака молекулы воды на карбонильный атом углерода с согласованной передачей одного из протонов на другую молекулу воды. В результате второго этапа образуется тетраэдрический интермедиат и ион гидроксония  $\text{H}_3\text{O}^+$ . На третьем этапе происходит протонирование атома азота либо из водного окружения, либо в результате присоединения протона, освободившегося на втором этапе. На четвертом этапе происходит разрыв C-N связи и депротонирование одной из гидроксильных групп. Нуклеофильная атака на карбоксильный атом углерода является скоростью-лимитирующей стадией реакции [8].

Результаты квантово-химических расчетов на модельных соединениях предполагают вероятность существования четырех механизмов кислотного гидролиза [15]: согласованный некатализируемый и катализируемый, поэтапный некатализируемый и катализируемый. В согласованном механизме нуклеофильная атака на атом углерода происходит при одновремен-

ном переносе протона на атом азота. В поэтапном – на первом этапе имеет место нуклеофильная атака, на втором – протонирование аминогруппы. Некатализируемый механизм подразумевает наличие одной реакционной молекулы воды, тогда как в катализируемом механизме вторая молекула воды помогает переносу протона с реакционной молекулы воды на атом азота пептидной группы. Расчеты неэмпирической молекулярной динамики Кара-Паринелло для N-метилформамида [14] и квантово-химические расчеты для формамида [12] свидетельствуют в пользу реализации согласованного катализируемого механизма, предсказанные активационные барьеры реакции находятся в хорошем количественном согласии с экспериментом [12, 14].



Минимальной модельной системой для процесса неферментативного гидролиза может служить система «нейтральный пептид – протон – одна молекула воды» [1, 9-15]. Протонирование карбонила пептидной группы энергетически более выгодно, чем протонирование аминогруппы [9, 10]. Анализ результатов исследований на формамиде [9, 10, 12-15] и N-метилацетамиде [4, 11, 14] с учетом различных моделей сольватации (от 2 до 56 молекул воды) показывает, что включение в теоретическую модель более, чем двух молекул воды, не влияет на механизм реакции, что для процесса гидролиза критичны только две молекулы воды [1].

Целью данной работы было исследовать влияние пропионовой кислоты на высоту активационного барьера и на геометрию переходного состояния кислотного гидролиза пептидной связи для модельного соединения – дипептида аланина, метода-

ми квантовой химии. Здесь мы исследуем только согласованный механизм гидролиза при образовании молекулярных комплексов карбоновой кислоты с молекулой воды. Насколько нам известно, такое исследование ранее не проводилось.

Известно, что химические соединения, растворенные в клетке, влияют на реакционную способность воды, а также могут специфически взаимодействовать с реагентами, переходными состояниями, интермедиями и продуктами реакции [16]. Пропионовая кислота (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH) структурно близка к молочной и пировиноградной кислотам, которые являются метаболитами гликолиза, теоретическое исследование влияния этих трех карбоновых кислот на реакцию нейтрального гидролиза показало, существенное понижение энергии активации, но не выявило существенных различий их действия между собой. Таким образом, изучаемые в работе взаимодействия могут моделировать некоторые взаимодействия в клетке. Кроме того, понимание механизмов взаимодействия карбоксильной кислоты с пептидом и реакционной молекулой воды может быть полезным для лучшего понимания действия аспартатных протеаз [1, 17]. Метод теории функционала плотности (ТФП), широко применяемый для расчетов энергий активации и геометрии молекулярных комплексов в ходе различных химических реакций [18-20], был использован в данном исследовании.

### Квантово-химические расчеты

Исходная структура дипептида аланина (далее пептид), была модифицирована путем замены гидроксильного фрагмента С-концевой карбоксильной группы и одного из атомов водорода N-концевой аминогруппы метильными группами с целью ослабить влияние концевых участков на исследуемую реакцию. Пептид был протонирован по атому кислорода [10, 11]. Расчеты проводили в рамках теории функционала плотности, с гибридным функционалом B3LYP/6-31G(d) [21,22]. Для расчетов структурных параметров и энергии реагентов и переходных состояний использовали алгоритмы, реализованные в программном пакете Gaussian09 [23].

Структуры переходных состояний и реагентов получены с полной оптимизацией. Спуск по координате реакции к продуктам и реагентам, а также наличие одной мнимой частоты подтверждал соответствие найденных переходных состояний исследуемой реакции. Энергию активации рассчитывали по формуле:

$$E = E_{TS} - E_{pept} - E_W \quad (1)$$

где  $E_{TS}$ ,  $E_{pept}$  и  $E_W$  – энергии переходного состояния, дипептида и молекулы воды.

Влияние молекул пропионовой кислоты на активационный барьер мы исследовали путем добавления одной молекулы кислоты в недиссоциированной форме к системе «пептид – молекула воды» и проводя повторный поиск структур, отвечающих переходному состоянию.

Величину активационного барьера в тройных системах рассчитывали по формуле:

$$E = E_{TS} - E_{pept} - E_W - E_{PA} \quad (2)$$

где  $E_{PA}$  – энергия карбоновой кислоты, остальные обозначения даны как для (1). Для всех значений энергии мы вводим поправку на энергию нулевых колебаний. Энергия нулевых колебаний переходных состояний вычислялась без учета мнимой частоты.

Все расчеты проведены для кластерной модели без учета поляризационных эффектов среды. Ранее проведенный нами анализ влияния различных континуальных моделей растворителя на реакцию нейтрального гидролиза показал незначительное влияние континуальной среды на величины активационного барьера по сравнению с величинами, полученными для кластерной модели. Свободная энергия Гиббса и ее энтропийный член были рассчитаны по аналогичным формулам относительно отдельных реагентов.

### Результаты и обсуждение

Эксперименты показывают, что скорость кислотного гидролиза пептидной связи гораздо выше, чем скорость нейтрального гидролиза [6]. Результаты наших расчетов согласуются с этим заключением: энергия активации кислотного гидролиза протонированного пептида при согласованном некатализируемом механизме равна 34 ккал/моль (табл. 1), тогда как для нейтральной реакции для аналогичного механизма реакции расчеты в том же базисе предсказывают барьер в 40 ккал/моль. Полученные значения активационного барьера для кислотного и нейтрального гидролиза хорошо согласуются с другими расчетными данными [9, 10, 12].

**Таблица 1 - Межатомные расстояния в переходном состоянии (Å), Малликеновские заряды на атомах, значения энергии активации (ккал/моль), энтропийного вклада (ккал/моль) и свободной энергии активации (ккал/моль) для некатализируемого и катализируемого механизмов реакции кислотного гидролиза**

	pept	Некатализируемый механизм			Катализируемый механизм	
		TS	w_C1	PA_C1	w_C2	PA_C2
C-N <sub>pept</sub>	1,31	1,48	1,5	1,5	1,48	1,41
O <sub>pept...H</sub>	1,06	1,03	1,02	1,01	1,01	1,01
O-H <sub>W</sub> (...N <sub>pept</sub> )		1,19	1,20	1,20	1,58	1,08
O <sub>W...C<sub>pept</sub></sub>		1,62	1,53	1,54	1,49	1,7
H <sub>W...N<sub>pept</sub></sub>		1,38	1,38	1,37	1,66	1,88
H <sub>W...O<sub>s</sub></sub>			1,61	1,66	1,03	1,41
O <sub>W</sub>		-0,67	-0,7	-0,7	-0,69	-0,71
H <sub>W</sub>		0,48	0,47	0,47	0,47	0,49
C <sub>pept</sub>		0,66	0,68	0,68	0,71	0,65
N <sub>pept</sub>		-0,74	-0,75	-0,75	-0,75	-0,8
O <sub>pept</sub>		-0,58	-0,62	-0,6	-0,64	-0,58
ΔE		34	16	13,5	8,2	6,5
ΔG		45,2	36,1	38,1	29,3	28,6
-TΔS		13	22,5	23,7	24,1	23,7

Понижение активационного барьера при гидролизе протонированного пептида обусловливается тем, что протон взаимодействует с карбонильным атомом кислорода, способствуя переходу карбонильного углерода в тетраэдрическое состояние. В переходном состоянии TS (рис. 1) расстояние между карбонильным кислородом и протоном уменьшается на 0,04 Å, по сравнению с основным состоянием протонированного пептида, и достигает 1,03 Å (Табл. 1), приближаясь к длине ковалентной O-H связи (~0,97 Å), а C=O связь растягивается на 0,04 Å. При этом расстояние между атакующим атомом кислорода молекулы воды и карбонильным углеродом уменьшается по сравнению с TS для нейтрального гидролиза на 0,23 Å и составляет 1,62 Å (что на 0,2 Å длиннее ковалентной C-O связи). Разрываемая C-N связь в TS удлиняется по сравнению с протонированным пептидом в основном состоянии и теряет свою планарность – угол OCNH уменьшается с 180° до 147°.

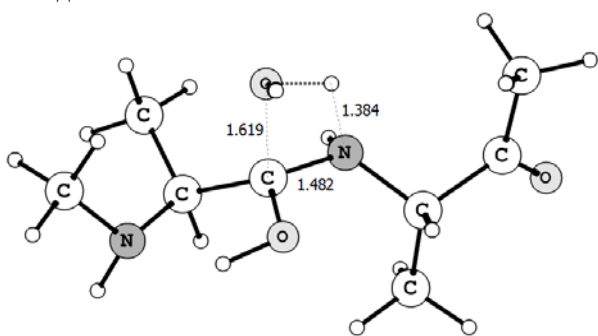


Рис. 1 - Структура переходного состояния TS

Взаимодействие второй молекулы воды с атомом водорода реакционной молекулы воды в TS приводит к образованию TS\_w\_C1 (рис. 2). Энергия активации TS\_w\_C1 равна 16 ккал/моль. Поскольку мы рассчитывали энергию активации относительно отдельных реагентов, то разница между значениями для TS\_w\_C1 и TS будет отражать как взаимодействия между реакционной молекулой воды и пептидом, так и взаимодействия между двумя молекулами воды. Дополнительная молекула воды действует как донор неподеленной электронной пары и увеличивает электронную плотность на атоме кислорода реакционной молекулы воды, что приводит к усилению взаимодействий между атакующим атомом кислорода и атомом углерода и сокращению связи O<sub>w</sub>...C<sub>pept</sub> по сравнению с TS до 1,53 Å. Длина пептидной C-N связи увеличивается до 1,5 Å. Следует отметить, что при этом также растягивается C=O связь, а расстояние между протоном и карбонильным кислородом сокращается до 1,02.

Взаимодействие молекулы воды с молекулой пропионовой кислоты в нейтральной форме приводит к образованию TS\_PA\_C1 (рис. 3). Анализ влияния ионизированных форм кислоты выходит за рамки данного исследования. В комплексе TS\_PA\_C1 образуется водородная связь между карбонильным кислородом пропионовой кислоты и атомом водорода молекулы воды. Образование комплекса сопровождается увеличением отрицательного заряда на атоме кислорода воды и увеличением положительного заряда на атоме водорода воды, связь O-H воды растягивается, и расстояние между атомом водорода воды и пептидным

атомом азота уменьшается, что приводит к уменьшению энергии активации до 13,5 ккал/моль.

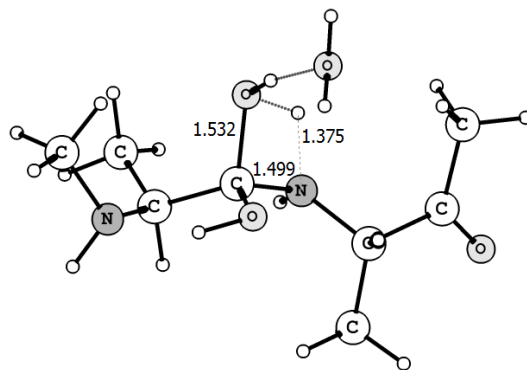


Рис. 2 - Структура переходного состояния TS\_w\_C1

Взаимодействие дополнительной молекулы воды с атомом водорода растянутой OH связи реакционной молекулы воды, приводит к образованию комплекса TS\_w\_C2 (рисунок не представлен). Переходное состояние TS\_w\_C2 соответствует катализируемому механизму гидролиза, поскольку дополнительная молекула воды способствует переносу протона с реакционной молекулы воды на атом азота пептида. Энергия активации TS\_w\_C2 значительно ниже, чем TS\_w\_C1 и составляет 8,2 ккал/моль. Это значение хорошо согласуется с результатами, полученными другими авторами [9, 12]. В TS\_w\_C2 гидроксильная O-H связь реакционной молекулы воды растягивается до 1,58 Å и протон переходит на дополнительную молекулу воды. При этом оставшийся гидроксид-ион эффективно взаимодействует с карбонильным атомом углерода, расстояние O<sub>w</sub>...C<sub>pept</sub> равно 1,49 Å. Карбонильная C=O связь пептида удлиняется, а протон приближается к карбонильному атому кислорода на 1,01 Å. Дополнительная молекула воды, приняв протон от реакционной молекулы воды, отдает один из своих протонов на атом азота.

Взаимодействие дополнительной молекулы пропионовой кислоты с атомом водорода, растянутой OH связи молекулы воды, приводит к образованию комплекса TS\_PA\_C2 (рис. 4). Энергия активации TS\_PA\_C2 уменьшается по сравнению с TS\_w\_C2 и составляет 6,54 ккал/моль. В переходном состоянии TS\_PA\_C2 кислота не протонируется, а лишь частично оттягивает на себя протон с реакционной молекулы воды. Согласно анализу изменения геометрии в ходе спуска вдоль внутренней координаты реакции, протон молекулы воды переходит на карбонильный атом молекулы кислоты, одновременно с этим протон гидроксильной группы молекулы кислоты протонирует пептидный атом азота.

Таким образом, анализ результатов расчета показывает, что катализируемый согласованный механизм реакции энергетически более выгоден, по сравнению с некатализируемым, как и для нейтрального гидролиза. Участие молекулы пропионовой кислоты понижает активационный барьер в обоих случаях по сравнению с действием дополнительной молекулы воды.

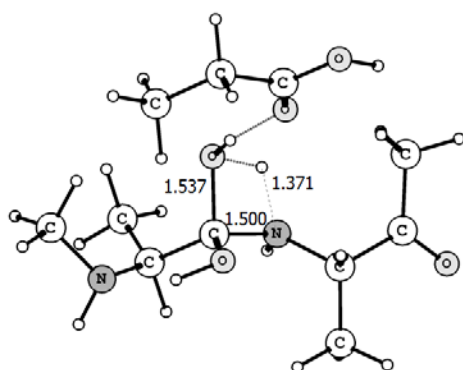


Рис. 3 - Структура переходного состояния TS\_PA\_C1

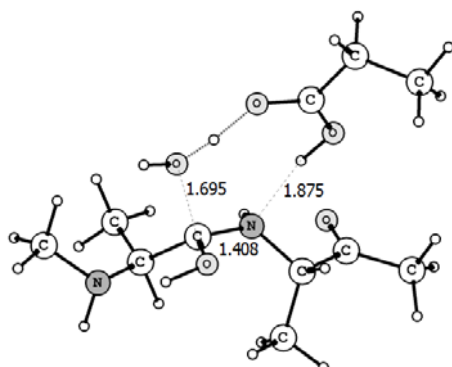


Рис. 4 - Структура переходного состояния TS\_PA\_C2

В кислой среде локализация протона около карбонильной группы пептида облегчает образование тетраэдрической конфигурации электронных орбиталей атома углерода благодаря возможности протона принимать электронную плотность карбонильного кислорода. Понижение активационного барьера за счет взаимодействий молекулы воды с молекулой кислоты достигается благодаря тому, что последняя, отдавая электронную плотность или принимая протон, способствует усилению связи  $O_W \dots C_{\text{peпт}}$  и переходу карбонильного углерода пептидной связи в тетраэдрическое состояние. При образовании тетраэдрического интермедиата, частично двойной характер пептидной связи теряется, взаимодействие между C и N атомами пептидной связи ослабляется, что облегчает ее разрыв.

#### Благодарности

Расчеты выполнены с использованием ресурсов Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 12-04-31360).

#### Литература

1. G. Estiu, K.M. Jr. Merz, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 6507-6519 (2007).
2. S.L. Cohen, C. Price, J. Vlasak, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6976-6977 (2007).
3. A.J. Cordoba, B.J. Shyong, D. Breen, R.J. Harris, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **818**, 115-121 (2005).
4. B. Pan, M.S. Ricci, B.L. Trout, *J. Phys. Chem. B*, **115**, 5958-5970 (2011).
5. R.S. Brown, A.J. Bennet, H. Slebocka-Tilk, *Acc. Chem. Res.*, **25**, 481-488 (1992).
6. R.M. Smith, D.E. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8910-8913 (1998).
7. H. Slebocka-Tilk, F. Sauriol, M. Monette, R.S. Brown, *Can. J. Chem.*, **80**, 1343-1350 (2002).
8. J. F. Marlier, E. Campbell, C. Lai, M. Weber, L.A. Reinhardt, W.W. Cleland, *J. Org. Chem.*, **71**, 3829-3836 (2006).
9. J.P. Krug, P.L.A. Popelier, R.F.W. Bader, *J. Phys. Chem.*, **96**, 7604-7616 (1992).
10. B. Wang, Z. Cao, *J. Phys. Chem. A*, **114**, 12918-12927 (2010).
11. B. Pan, M.S. Ricci, B.L. Trout, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 4389-4399 (2010).
12. S. Antonczak, M.F. Ruiz-López, J.L. Rivail, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3912-3921 (1994).
13. S. Antonczak, M.F. Ruiz-López, J.L. Rivail, *J. Mol. Model.*, **3**, 434-442 (1997).
14. D. Zahn, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4020-4023 (2004).
15. L. Gorb, A. Asensio, I. Tunon, M.F. Ruiz-López, *Chem. Eur. J.*, **11**, 6743-6753 (2005).
16. P. Ball, *ChemPhysChem*, **18**, 2677-2685 (2008).
17. R.P. Bora, A. Barman, X. Zhu, M. Ozbil, R. Prabhakar, *J. Phys. Chem. B.*, **114**, 10860-10875 (2010).
18. Г.М. Храпковский, Д.В. Чачков, *Вестник Казанского технологического университета*, **20**, 7-10 (2012).
19. Г.М. Храпковский, Д.В. Чачков, *Вестник Казанского технологического университета*, **24**, 20-23 (2012)
20. Д.В. Чачков, А.Г. Шапов, Г.М. Храпковский, *Вестник Казанского технологического университета*, **18**, 79-82 (2012)
21. C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B*, **37**, 785-789 (1988).
22. A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, **98**, 5648-5652 (1993).
23. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N.J. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision A.02 *Gaussian Inc.*, Wallingford, C.T., 2009