

УДК 517.15

## СТРУКТУРА ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОГО КОМПЛЕКСА КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА ФОСФОДИЭСТЕРАЗ С ЦИКЛИЧЕСКИМ ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТОМ

Б.Л. Григоренко, А.В. Немухин, М.Г. Хренова, Д.А. Новичкова

*(кафедра физической химии; e-mail: wasabiko13@gmail.com)*

По результатам расчетов комбинированным методом квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) построена полноатомная трехмерная структура фермент-субстратного комплекса каталитического домена фосфодиэстераз с циклическим дигуанозинмонофосфатом.

**Ключевые слова:** циклический дигуанозинмонофосфат, фосфодиэстеразы, метод КМ/ММ.

Реакции гидролиза, приводящие к преобразованию циклических форм гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ) и дигуанозинмонофосфата (ц-ди-ГМФ) в соответствующие нециклические формы ГМФ и ди-ГМФ, осуществляются ферментами семейства фосфодиэстераз, регулирующих концентрацию вторичных посредников ц-ГМФ и ц-ди-ГМФ при передачах сигналов в клетках. Механизмы химических реакций в активных центрах фосфодиэстераз являются предметом текущих исследований, причем на сегодняшний день основные предположения сформулированы по результатам рентгеноструктурного анализа соответствующих белков [1–4]. В настоящей работе применяются современные приемы молекулярного моделирования на основе метода квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) [5] для построения полноатомной трехмерной структуры фермент-субстратного комплекса каталитического домена (EAL-домена) фосфодиэстераз с ц-ди-ГМФ. Знание этой структуры позволяет предсказать направления отдельных стадий реакции гидролиза ц-ди-ГМФ в белковой матрице.

Следуя выводам недавней работы [4], мы выделили две кристаллографические структуры EAL домена, относящиеся к фосфодиэстеразам с высокой ферментативной активностью, доступные в базе данных белковых структур (PDB), а именно, PDBid:3GG0 [1] и PDBid:3N3T [2]. Первая относится к многодоменному белку VlrP1 из *Klebsiella pneumoniae*; вторая – к димерному белку Tbd1265 из *Thiobacillus denitrificans*. EAL домен содержит два иона металла в активном центре; известно, что каталитической активностью обладают белки с ионами магния или марганца. В структуре PDBid:3GG0 координаты ионов металла отнесены к марганцу, в структуре PDBid:3N3T – к

магнию. В нашей модельной системе мы рассматривали только ионы  $Mg^{2+}$ .

При построении модели за основу были взяты координаты тяжелых атомов структуры PDBid:3GG0. После добавления атомов водорода в предположении общепринятого состояния протонирования полярных аминокислотных остатков, приводящего к возникновению отрицательно (Asp, Glu) и положительно (Lys, Arg) заряженных боковых цепей, и предварительной оптимизации координат методом молекулярной механики, система была подразделена на КМ- и ММ-части. В КМ-подсистему были включены все атомы субстрата ц-ди-ГМФ, боковые цепи Asp302, Asp303, Glu359 (по нумерации PDBid:3GG0) и 12 молекул воды. Модельная система представлена на рис. 1. Здесь явно показана только одна молекула воды, которой по результатам моделирования отведена роль нуклеофильного агента в реакции гидролиза.

Вычисления значений энергии и силы в КМ-части проводили в приближении теории функционала электронной плотности в варианте PBE0/6-31G\*. Для описания ММ-части применяли силовое поле AMBER. Использовали вариант метода КМ/ММ с конформационно-подвижными эффективными фрагментами [6, 7], позволяющий получать результаты, достаточно близкие к полному квантовому описанию всей системы. Проведена полная оптимизация равновесных геометрических параметров по минимуму полной энергии.

На рис. 2 результаты расчетов для ряда расстояний между тяжелыми атомами в активном центре сопоставлены с экспериментальными данными.

Можно заключить, что рассчитанная структура модельной системы в целом хорошо согласуется с

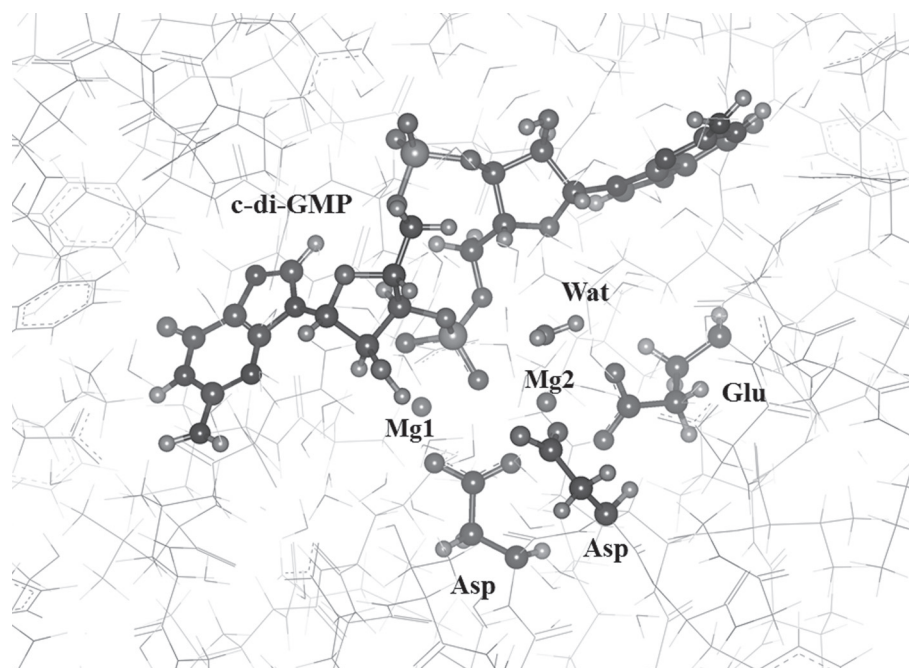


Рис.1. Модельная система для расчетов структуры фермент-субстратного комплекса каталитического EAL-домена с ц-ди-ГМФ (c-di-GMP) методом КМ/ММ. Группы, включенные в квантовую подсистему выделены шарами и стержнями (показана лишь одна из 12 молекул воды). Группы молекулярно-механической подсистемы показаны линиями

кристаллографическими данными из двух независимых источников [1, 2]. Четко воспроизведено окружение ионов магния кислородными атомами боковых цепей Asp и Glu, причем вне зависимости от того, были ли включены эти группы в КМ- или ММ-части системы при вычислениях.

Одно различие между теоретическими и экспериментальными результатами имеет большое значение. Обе экспериментальные структуры идентифицируют одну из молекул воды вблизи боковой цепи Asp303/647 и недалеко от фосфатной группы субстрата, показанной на рис. 2. Однако авторы исследований [1, 2, 4] не приписывают ей роль реакционного агента. Вместо этого предполагается, что оба иона металла вовлечены в активацию (другой) каталитической молекулы воды, из которой образуется нуклеофильный гидроксил-анион  $\text{OH}^-$ . По нашим расчетным данным, сценарий химических преобразований должен быть иным.

На рис. 3 показано расположение частиц в активном центре. Реакционная молекула воды (рис. 2, 3) ориентирована одним ионом металла ( $\text{Mg}2$ ), боковой цепью Glu359/703 и другими молекулами воды (не показанными на рисунках), образующими сетку водородных связей.

Конфигурация  $\text{O}(\text{Wat})\text{-P-O-N}(\text{Asn}239/584)$  достаточно характерна для реакций гидролиза нуклеозидфосфатов [8, 9]. Можно ожидать, что качественно механизм реакции раскрытия цикла будет похож на механизм гидролиза ц-ГМФ и ц-ди-ГМФ в водном растворе [10, 11]. При приближении молекулы воды к фосфатному центру будет образовываться интермедиат с пентакоординированным фосфором с передачей протона от воды на акцептор по сетке водородных связей. Последующее перераспределение протонов по цепи обеспечит разрыв связи  $\text{P-O}$  и формирование продуктов реакции гидролиза. Следует отметить, что расстояние  $\text{O}(\text{Wat})\text{-P}$  в белковой матрице ( $2.89 \text{ \AA}$ ) заметно меньше, чем в кластере молекул воды [10] ( $3.20 \text{ \AA}$ ), что должно коррелировать с каталитическим эффектом фермента по отношению к водному раствору.

Таким образом, по результатам расчетов методом КМ/ММ построена модель фермент-субстратного комплекса EAL-домена фосфодиэстеразы с ц-ди-ГМФ, хорошо согласующаяся с кристаллическими структурами фосфодиэстераз белков BlrP1 [1] и Tbd1265 [2] с высокой ферментативной активностью. Анализ расположения молекулярных групп в равновесной геометрической конфигурации модельной

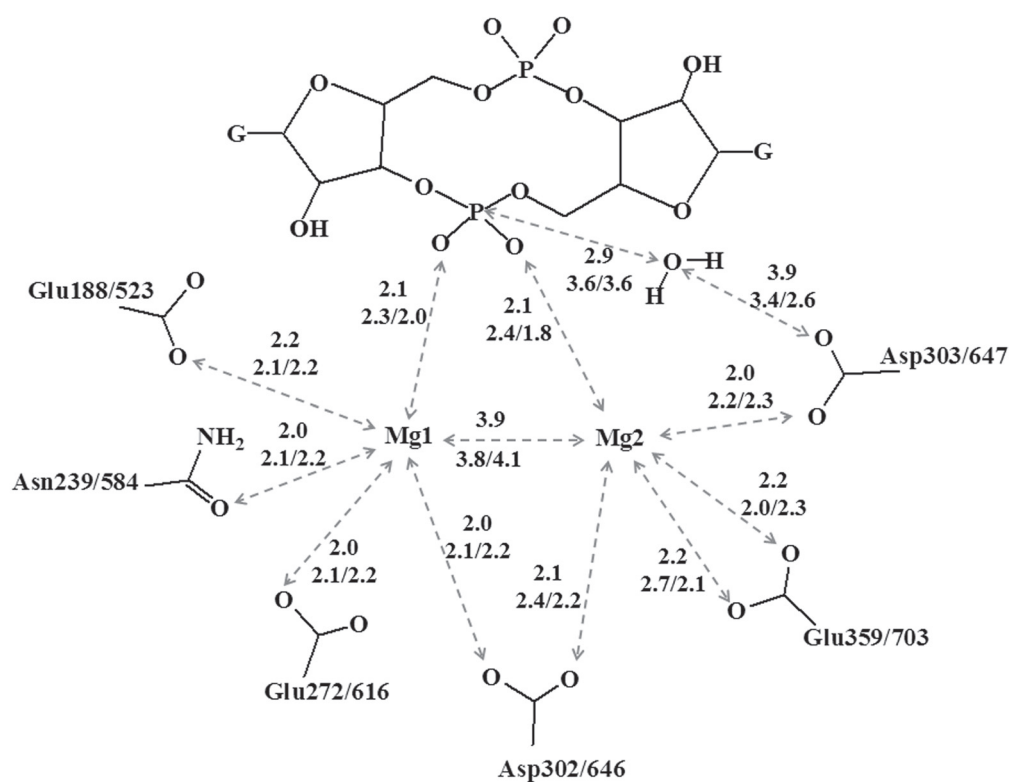


Рис. 2. Структура активного центра EAL-домена с ц-ди-ГМФ. Расстояния приведены в Å; верхнее значение относится к расчетным результатам, нижние значения – к экспериментальным данным. Указана нумерация аминокислотных остатков в структурах PDBid:3GG0 (до косой черты) и PDBid:3N3T (после косой черты); таким же способом на рисунке приведены расстояния в кристаллографических структурах

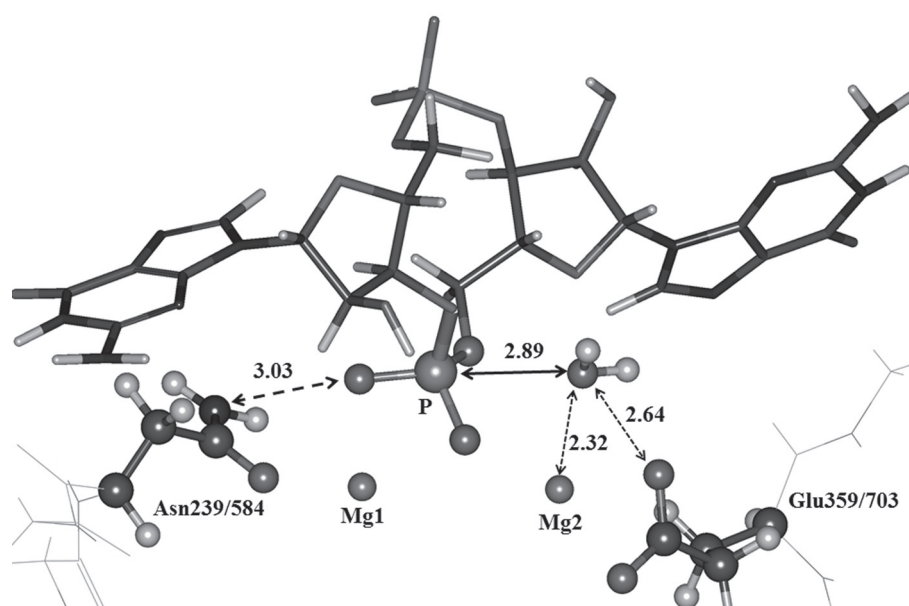


Рис. 3. Расположение молекулярных групп в активном центре фермент-субстратного комплекса EAL-домена с ц-ди-ГМФ. Расстояния приведены в Å

системы подсказывает перспективный механизм реакции гидролиза.

При написании данной статьи использованы работы, поддержанные РФФИ (проект 13-03-00210-а).

Авторы выражают благодарность суперкомпьютерным центрам МГУ имени М.В. Ломоносова и РАН за возможность использовать вычислительные ресурсы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barends T. R., Hartmann E., Griese J. J., et al.* // Nature (London). 2009. **459**. P. 1015.
2. *Tchigvintsev A., Xu X., Singer A., et al.* // Mol. Biol. 2010. **402**. P. 524.
3. *Ko-Hsin C., Wei-Ting K., Yu-Jen Yu et al.* // Acta Cryst. 2012. **D68**. P. 1380.
4. *Tarnawski M., Barends T.R.M., Hartmann E., et al.* // Acta Cryst. 2013. **D69**. P. 1045.
5. *Warshel A., Levitt M.* // J. Mol. Biol. 1976. **103**. P. 227.
6. *Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Topol I.A., et al.* // J. Phys. Chem. A. 2002. **106**. P. 10663.
7. *Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Topol I.A., et al.* // J. Comput. Chem. 2003. **24**. P. 1410.
8. *Grigorenko B.L., Rogov A.V., Topol I.A. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. **104**. P.7057.
9. *Немухин А.В., Григоренко Б.Л., Луцкекина С.В., и др.* // Усп. хим. 2012. **81**. С. 1011.
10. *Андрійченко Н.Н., Хренова М.Г., А.В.Немухин, и др.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. **52**. С. 277.
11. *Morozov D., Khrenova M., Andrijchenko N., et al.* // Comput. Theor. Chem. 2012. **983**. P. 88.

Поступила в акцию 12.11.13..

### STRUCTURE OF THE ENZYME-SUBSTRATE COMPLEX FOR THE CATALYTIC DOMAIN OF PHOSPHODIESTERASES WITH THE CYCLIC DIGUANOSINE MONOPHOSPHATE

**Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Khrenova M.G., Novichkova D.A.**

*(Division of Physical Chemistry)*

**The full-atom three-dimensional structure of the enzyme-substrate complex for the catalytic domain of phosphodiesterases with the cyclic diguanosine monophosphate is constructed by results of the combined quantum mechanical – molecular mechanical (QM/MM) simulations.**

**Key words:** cyclic diguanosine monophosphates, phosphodiesterases, QM/MM method.

**Сведения об авторах:** *Григоренко Белла Людвиговна* – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ, докт. физ.-матем. наук (bell\_grig@yahoo.com); *Немухин Александр Владимирович* – профессор кафедры физической химии химического факультета МГУ, лаборатория химической кибернетики, докт. хим. наук (anemukhin@yahoo.com); *Хренова Мария Григорьевна* – науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук (wasabiko13@gmail.com); *Новичкова Дана Александровна* – аспирант химического факультета МГУ (dana.novichkova@gmail.com).