

УДК 539.196

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ГУАНОЗИНТРИФОСФАТА В БЕЛКОВОМ КОМПЛЕКСЕ RasGAP

М.Г. Хренова, Е.Д. Коц, А. М. Кулакова, И.В. Поляков

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

Сопоставлены результаты расчетов структур и энергий интермедиатов для реакции гидролиза гуанозинтрифосфата белковым комплексом Ras·GAP, полученные с помощью комбинации методов квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) и фрагментных молекулярных орбиталей. Были подтверждены полученные ранее результаты, показывающие, что гидролиз связи Р–О приводит к образованию фосфата H_2PO_4^- и имидной формы функциональной группы боковой цепи каталитического остатка Gln61.

Ключевые слова: GTP, Ras, GAP, ферментативный гидролиз.

Реакция гидролиза гуанозинтрифосфата (GTP) с образованием гуанозиндифосфата (GDP) и неорганического фосфата H_2PO_4^- (Pi) белком Ras происходит крайне медленно с константой скорости $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, однако при образовании комплекса с белком-ускорителем GAP скорость реакции увеличивается на пять порядков. Последний процесс является важным для функционирования клеток, и его нарушение приводит к развитию онкологических заболеваний [1, 2].

Реакция гидролиза GTP белковым комплексом Ras·GAP состоит из четырех стадий: связывание белка GAP с комплексом Ras·GTP, гидролиз GTP в активном центре Ras·GAP, выход неорганического фосфата в раствор и диссоциация комплекса Ras·GAP. Для определения скорости химической стадии $\text{GAP} \cdot \text{Ras} \cdot \text{GTP} \rightarrow \text{GAP} \cdot \text{Ras} \cdot \text{GDP} \cdot \text{Pi}$, проходящей в активном центре фермента, используется метод остановленной струи с последующим определением соотношения GTP и GDP в условиях избытка фермента по сравнению с субстратом [3–5], что приводит к зна-

чению константы скорости k_2 , равной 19 с^{-1} . Расчетные работы в этом направлении ведутся более 20 лет и сходятся в том, что гидролиз гуанозинтрифосфата проходит в результате нуклеофильной атаки каталитической молекулы воды с последующим переносом протона с этой молекулы на γ -фосфатную группу через Gln61 с образованием его таутомерной имидной формы (рис. 1). Однако количественные оценки для рассматриваемой схемы существенно различаются. В работе [6] впервые предложен механизм реакции гидролиза: проведены расчеты методом КМ/ММ с описанием квантовой подсистемы, состоящей из 43 атомов, методом Хартри–Фока с базисом 6-31G; взаимодействие подсистем КМ и ММ описывалось в рамках метода потенциалов эффективных фрагментов. В рамках такой модели барьер на первой и второй стадиях составлял соответственно 8,6 и 14,2 ккал/моль, при этом положение Р' оказывалось на 6,6 ккал/моль ниже фермент-субстратного комплекса. Проведенный в более поздних работах расчет профилей

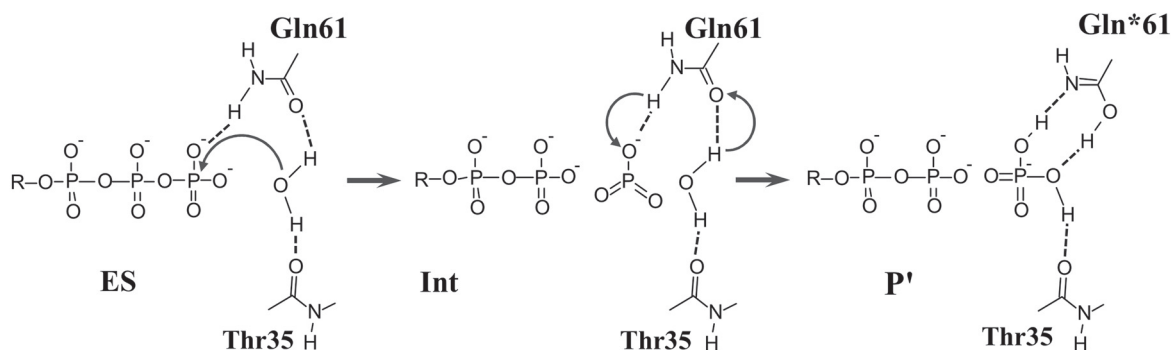


Рис. 1. Схема реакции гидролиза молекулы GTP белковым комплексом RasGAP

поверхности свободной энергии [7, 8] показал, что на первой стадии барьер составляет порядка 10–15 ккал/моль, а вторая стадия проходит практически безбарьерно, при этом Р' находится значительно выше реагентов. Выполненные ранее работы не лишены недостатков, и остается непонятным, связан ли такой разброс результатов с разными методами описания системы или переходом от потенциальной энергии к свободной. Важно отметить, что в результате второй стадии реакции образуется таутомерная имидная форма глутамина, и возникает необходимость дальнейших превращений для восстановления амидной формы. Такие превращения возможны путем поворотов ОН-групп вокруг одинарных Р–О-связей неорганического фосфата и переноса протонов; энергетические барьеры таких процессов, как правило, не превышают 10–12 ккал/моль. Сами по себе все барьеры элементарных стадий в соответствии с теорией активированного комплекса соответствуют гораздо большей скорости, чем экспериментальное значение 19 с^{-1} , что указывает на важность оценки их относительного положения.

Для этой оценки в данной работе выбраны два разных подхода: 1) комбинация методов квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) и метода фрагментных молекулярных орбиталей (ФМО), 2) расчет относительной энергии минимумов на поверхности потенциальной энергии.

Для расчетов в качестве начальной структуры использовали кристалл белкового комплекса Ras-GAP, содержащий аналог интермедиата, который был заменен на молекулу GTP. В кристаллическую структуру были добавлены атомы водорода, и система была сольватирована молекулами воды. Далее для расчетов система была уменьшена до 5000 атомов (рис. 2). При

расчете методом КМ/ММ квантовая подсистема описывалась методом теории функционала электронной плотности с функционалом PBE0 [9] с дисперсионной поправкой D3 и базисом *cc-pvdz*, ММ-подсистема описывалась с помощью силового поля AMBER [10], взаимодействие КМ- и ММ-подсистем описывалось в рамках электронного внедрения; расчеты проводились в программе NWChem [11]. Расчеты методом ФМО [12] проводились в программном пакете GAMESS US [13].

Расчеты методом КМ/ММ проводили с двумя разными разбиениями на КМ- и ММ-подсистемы. На рис. 2 показана меньшая КМ-часть (КМ1), состоящая из 89 атомов. В нее входят метилтрифосфат от молекулы GTP, каталитическая молекула воды, заряженные остатки (аргинин и лизин), катион магния и его координационная сфера. По результатам расчетов с таким протоколом было получено, что барьер на первой стадии составляет 6 ккал/моль, а на второй – 1,9 ккал/моль, при этом минимумы, соответствующие Int и Р' находятся выше ES (таблица). Дальнейшее расширение КМ-части (КМ2) с добавлением в нее всех основных цепей белка, образующих водородные связи с β - и γ -фосфатными группами, не приводит к заметным изменениям.

Принципиально другим является подход фрагментных молекулярных орбиталей, в рамках которого вся система описывается квантово-механическими методами, при этом она разбивается на фрагменты, в каждом из которых проводится процедура самосогласования, которая потом корректируется с учетом взаимодействия фрагментов. Для выбора разбиения проводилась серия расчетов с молекулярным кластером, состоящим из 272 атомов и включавшим молекулу GTP и окружающие ее аминокис-

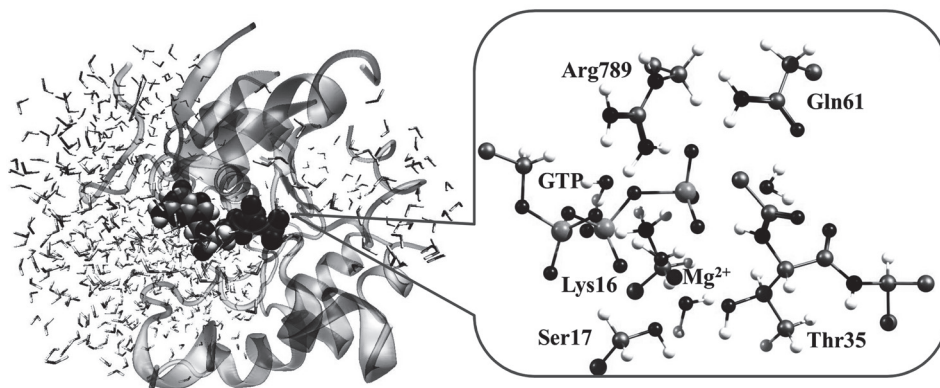


Рис. 2. Модельная система белкового комплекса RasGAP с молекулой GTP, сольватированная водой (на вставке справа показана квантовая подсистема КМ1)

**Относительная энергия стационарных точек, полученных методами КМ/ММ и FMO
(точки оптимизированы методом КМ/ММ (*) и методом FMO (**), ккал/моль)**

Структура	КМ/ММ (КМ1)	КМ/ММ (КМ2)	FMO2 2 слоя*	FMO2*	FMO2 2 слоя**	FMO2**
ES	0	0	0	0	0	0
Int	4,9	4,6	2,4	4,8	2,3	2,0
P'	4,2	3,8	0,8	2,4	-1,3	1,0

лотные остатки, молекулы воды и катион магния. В ходе расчетов расширялся реакционный фрагмент, в котором происходит химическая реакция, до тех пор, пока разности энергий, полученных методом FMO и PBE0/6-31G** не стали меньше 0,1 ккал/моль. Результирующий размер фрагмента составил 174 атома и включал в себя метилтрифосфат, боковые цепи Lys16, Gln61, Thr35, Ser17, Arg789, катион магния, две молекулы воды из его координационной сферы и каталитическую молекулу воды.

Далее применяли два разных подхода: 1) расчет энергий во всех фрагментах проводили методом PBE0/6-31G**; 2) систему разбивали на два слоя, реакционный фрагмент и ближайшие к нему фрагменты описывались методом PBE0/6-31G**, а все остальные фрагменты – методом HF/3-21G. Второй подход примерно в 10 раз менее затратный, чем первый и, как видно из таблицы, дает сопоставимые результаты с более затратным подходом. Проводили также оптимизацию методом FMO, при этом все фрагменты, кроме реакционного, были заморожены, что могло внести ошибку в расчет. Для полученных

равновесных геометрических конфигураций проводили расчет энергии двумя описанными выше подходами (таблица). Суммируя результаты, можно отметить, что для всех выбранных протоколов расчетов Int по энергии находится выше, чем ES; P' стабилизирован по сравнению с Int, и для всех, кроме одной, схем расчета выше, чем ES. Результаты данной работы показывают необходимость учета динамической электронной корреляции и выбора базисного набора, включающего в себя поляризационные функции. Это связано с тем, что система сильно поляризована, так как содержит большое количество положительно заряженных групп (Arg789, Lys16 и Mg^{2+}) и отрицательно заряженную группу (GTP^{4-}). Результаты работ [7, 8] находятся в качественном согласии с данной работой. Большие величины барьеров и относительных энергий Int и P' могут быть обусловлены сканированием поверхности свободной энергии. Это связано с тем, что процедура поиска профиля на поверхности потенциальной энергии приводит к наименее энергетически затратному пути, в то время как профиль свободной энергии является суперпозицией всех возможных (в том числе и менее выгодных) путей реакции.

При объединении полученных результатов расчета стадии разрыва связи P–O с оценочными значениями для стадии регенерации глутамина оказалось, что первые две стадии имеют гораздо меньшие барьеры, поэтому между ES, Int и P' устанавливается квазиравновесие, а суммарная скорость образования продукта определяется как произведение константы равновесия между P' и ES и константы скорости следующей за ней стадии. Полученные кинетические кривые приведены на рис. 3 и соответствуют эффективной константе скорости, равной $\sim 15 \text{ с}^{-1}$, что согласуется с экспериментальными данными. Работа выполнена с использованием ресурсов суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова [14].

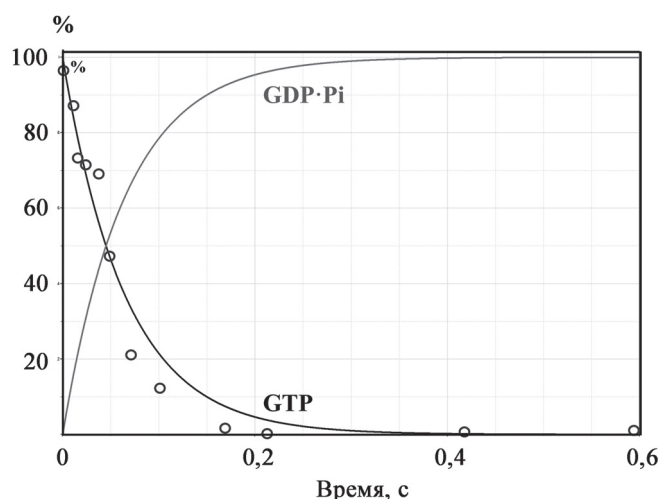


Рис. 3. Кинетическая кривая расходования GTP и накопления GDP с неорганическим фосфатом (точками показаны экспериментальные данные из [5])

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cox A.D., Der C.J. // Small GTPases. 2010. Vol. 1. P. 2.
2. Malumbres M., Barbacid M. // Nat. Rev. Cancer. 2003. Vol. 3. P. 459.
3. Gideon P., John J., Frech M., et al. // Mol. Cell Biol. 1992. Vol. 12. P. 2050.
4. Schweins T., Geyer M., Scheffzek K., et al. // Nat. Struct. Biol. 1995. Vol. 2. P. 36.
5. Phillips R.A., Hunter J.L., Eccleston J.F., et al. // Biochemistry. 2003. Vol. 42. P. 3956.
6. Grigorenko, B.L.; Nemukhin, A.V.; Topol, I.A., et al. // Proteins: Struct. Funct. Bioinf. 2005. Vol. 60. P. 495.
7. Prasad B.R., Plotnikov N.V., Lameira J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. Vol. 110. P. 20509.
8. Mironov V. A., Khrenova M. G., Lychko L. A., et al. // Proteins. 2015. Vol. 83. P. 1046.
9. Adamo C., Barone V. // J. Chem. Phys. 1999. Vol. 110. P. 6158.
10. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., et al. // J. Am. Chem. Soc. 1995. Vol. 117. P. 5179.
11. Valiev M., Bylaska E.J., Govind N., et al. // Comput. Phys. Commun. 2010. Vol. 181. P. 1477.
12. Kitaura K., Ikeo E., Asada T. // Chem. Phys. Lett. 1999. Vol. 313. P. 701.
13. Schmidt M. W., Baldrige K. K., Boatz J. A., et al. // J. Comput. Chem. 1993. Vol. 14. P. 1347.
14. Воеводин В., Жуматий С., Соболев С. и др. // Открытые системы. 2012. Т. 7. 2012. С. 36.

Поступила в редакцию 01.08.15

MODELING GTP HYDROLYSIS IN PROTEIN COMPLEX RasGAP

M.G. Khrenova, E.D. Kots, A.M. Kulakova, I.V. Polyakov

(Division of Physical Chemistry)

Fragmented molecular orbitals and combined quantum mechanics / molecular mechanic methods are applied to calculate geometry configurations and relative energies of the intermediates of GTP hydrolysis in protein complex RasGAP. It was proved that hydrolysis of the GTP P–O bond results in the formation of inorganic phosphate $H_2PO_4^-$ and tautomerization of the side chain of Gln61 to the imide form.

Key words: GTP, Ras, GAP, enzymatic hydrolysis.

Сведения об авторах: Хренова Мария Григорьевна – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук (wasabiko13@gmail.com); Коц Екатерина Дмитриевна – мл. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ (kots.katya@gmail.com); Кулакова Анна Михайловна – студентка химического факультета МГУ (kulakovaam@gmail.com); Поляков Игорь Вадимович – науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук (polyakoviv@gmail.com).