# МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ГУАНОЗИНТРИФОСФАТА БЕЛКОВЫМ КОМПЛЕКСОМ RAS-GAP ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОМБИНИРОВАННЫМ МЕТОДОМ КВАНТОВОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ

*Немухин А.В., Григоренко Б.Л.*

**Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, г.Москва**

***С использованием оригинальной версии комбинированного метода квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) исследован механизм реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (GTP), катализируемой белковым комплексом RAS-GAP ($p21^{ras}$ – $p120^{GAP}$). Показано, что предпочтительным является механизм с прямым участием Gln61 в переносе протонов и переходе Gln61 в таутомерную форму. Результаты моделирования позволяют выяснить роль ключевых аминокислотных остатков Gln61 (RAS) и Arg789 (GAP), а также роль мутаций $p21^{ras}$ в функционировании комплекса RAS-GAP.***

Комбинированный метод квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ), предназначенный для моделирования химических преобразований в конденсированных средах (Warshel A., Levitt M., 1976), в последние годы становится основным инструментом расчетов энергетических профилей ферментативных реакций. Часть молекулярной системы, в которой происходят перераспределения химических связей, включается в квантовую подсистему, и энергии и силы в ней рассчитываются по уравнениям квантовой механики (КМ). Большинство атомов, окружающих выделенную центральную часть, относится к молекулярно-механической (ММ) подсистеме. Нами разработана оригинальная реализация [1,2] метода КМ/ММ, позволяющая рассчитывать энергетические профили химических реакций в белковых системах.

Важнейшая ферментативная реакция гидролиза гуанозинтрифосфата (GTP), приводящая к гуанозиндифосфату (GDP) и неорганическому фосфату Pi

$$GTP + H_2O \rightarrow GDP + Pi \qquad (1)$$

является лимитирующей стадией всего цикла связывания/гидролиза GTP, ответственного за передачу сигналов на рост клеток. GTP/GDP-связывающие белки (G-белки) переходят из активной формы (“ON”) в неактивную (“OFF”) в результате реакции (1). Замена GDP на GTP восстанавливает активную форму. Эффективно гидролиз проходит в том случае, когда G-белок, содержащий GTP, образует комплекс с активирующим белком GAP. Сбой в работе этой молекулярной машины, в частности, замедление или прекращение реакции (1) при определенных мутациях одного из G-белков человека, $p21^{ras}$ (далее для краткости, RAS), имеет следствием развитие раковых опухолей. Экспериментальному и теоретическому изучению реакции гидролиза GTP посвящено огромное число публикаций, и тем не менее, четких и непротиворечивых ответов на вопросы о механизме реакции (1) в различных средах и о роли ключевых аминокислотных остатков не дано. Доминирующей точкой зрения является гипотеза ассоциативного механизма реакции гидролиза по схеме субстрат-ассистирующего катализа [3], однако, все попытки рассчитать энергетический профиль реакции по этому механизму в рамках различных молекулярных моделей приводят к нереально высоким активационным барьерам более 40 ккал/моль.

В настоящей работе впервые моделирование реакции гидролиза GTP выполнено для реального белкового окружения методом КМ/ММ.

В 1997 г. по данным рентгено-структурного анализа была определена структура комплекса RAS-GAP ($p21^{ras}$ – $p120^{GAP}$) с аналогом GTP ($GDP+AlF_3$) [4], фактически являющаяся единственным источником информации о строении активного центра фермента. Часто считается, что данная структура (код 1WQ1 в Банке данных белковых структур) соответствует переходному состоянию в реакции гидролиза (1), поскольку плоская группа

$AlF_3$ имитирует предполагаемую конфигурацию γ-фосфатной группы GTP на вершине энергетического барьера. Рис.1 дает представление о структуре 1WQ1.

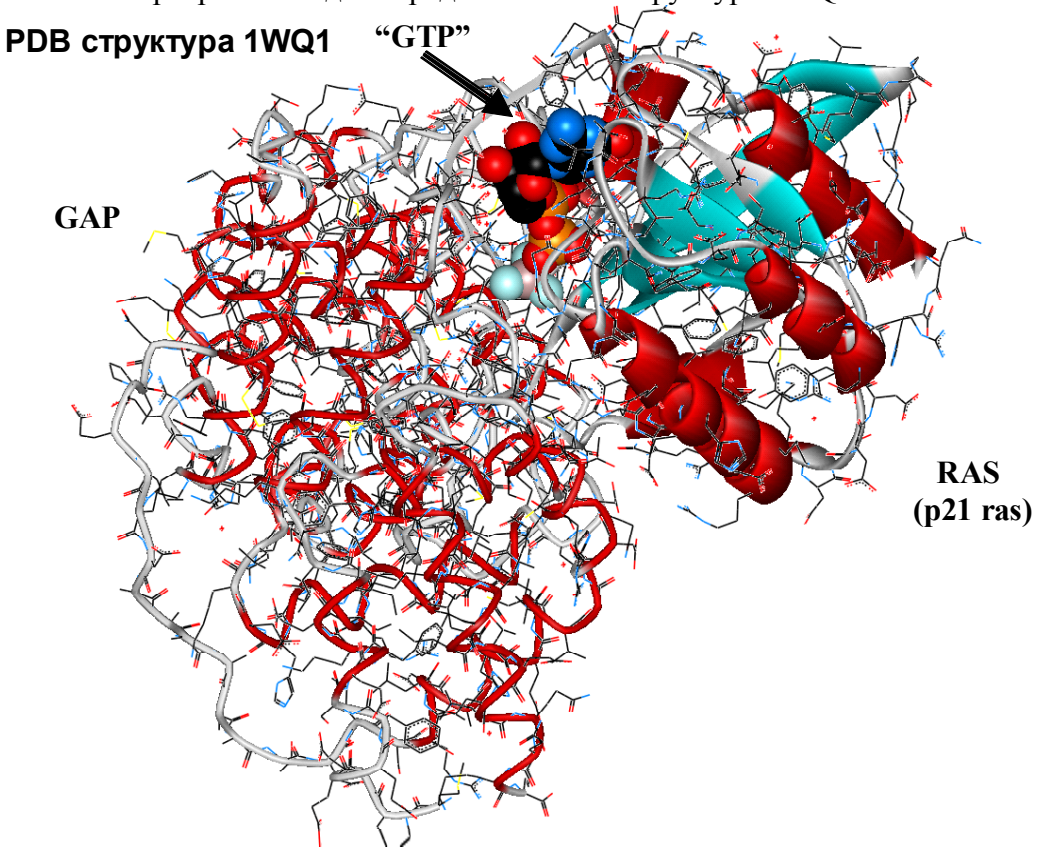



*Рис.1. Структура комплекса 1WQ1: p21$^{ras}$ (ribbon), GAP (tube), аналог GTP (CPK).*

На основе атомных координат структуры 1WQ1 была построена молекулярная модель для расчетов методом КМ/ММ, схематично показанная на Рис.2.

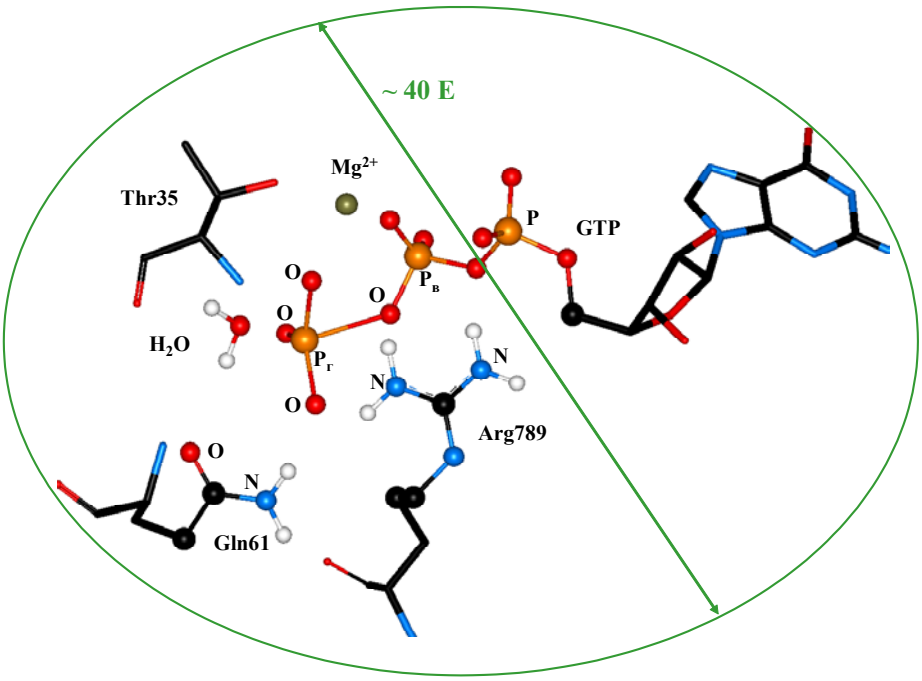


*Рис.2. Молекулярная модель для расчетов КМ/ММ общим размером примерно 40 Å. В квантовую подсистему включены 43 атома, часть из которых показана шарами и стержнями, в молекулярно-механической подсистеме - 1622 атома.*

Общий размер выбранной модельной системы, включающей GTP, гидролитическую воду, ближайшие к реакционной зоне аминокислотные остатки белков RAS и GAP и молекулы воды, составляет примерно 40 Å. В квантовую подсистему включены фосфатные группы GTP, молекула воды, катион магния, фрагмент Gln61 от RAS, фрагмент Agr789 от GAP (т.н. «аргининовый палец») (Рис.2). Именно эти аминокислотные остатки считаются ключевыми при функционировании всего ферментативного комплекса [5]. В процедуру оптимизации геометрических параметров по минимуму полной энергии включены все 43 атома квантовой части и большинство атомов ММ-части. При расчетах использован неэмпирический метод Хартри-Фока с базисом 6-31G в КМ-части и параметры силового поля AMBER в ММ-части.

На Рис.3 сопоставлены расстояния (Å) между некоторыми тяжелыми атомами, полученные для равновесной геометрической конфигурации модельной задачи (числа без скобок), и экспериментальные расстояния (числа в скобках), полученные для структуры 1WQ1 при разрешении 2.5 Å. Следует отметить, что в кристалле вместо GTP находится аналог (GDP+$AlF_3$), причем $AlF_3$ располагается на месте γ-фосфатной группы GTP.

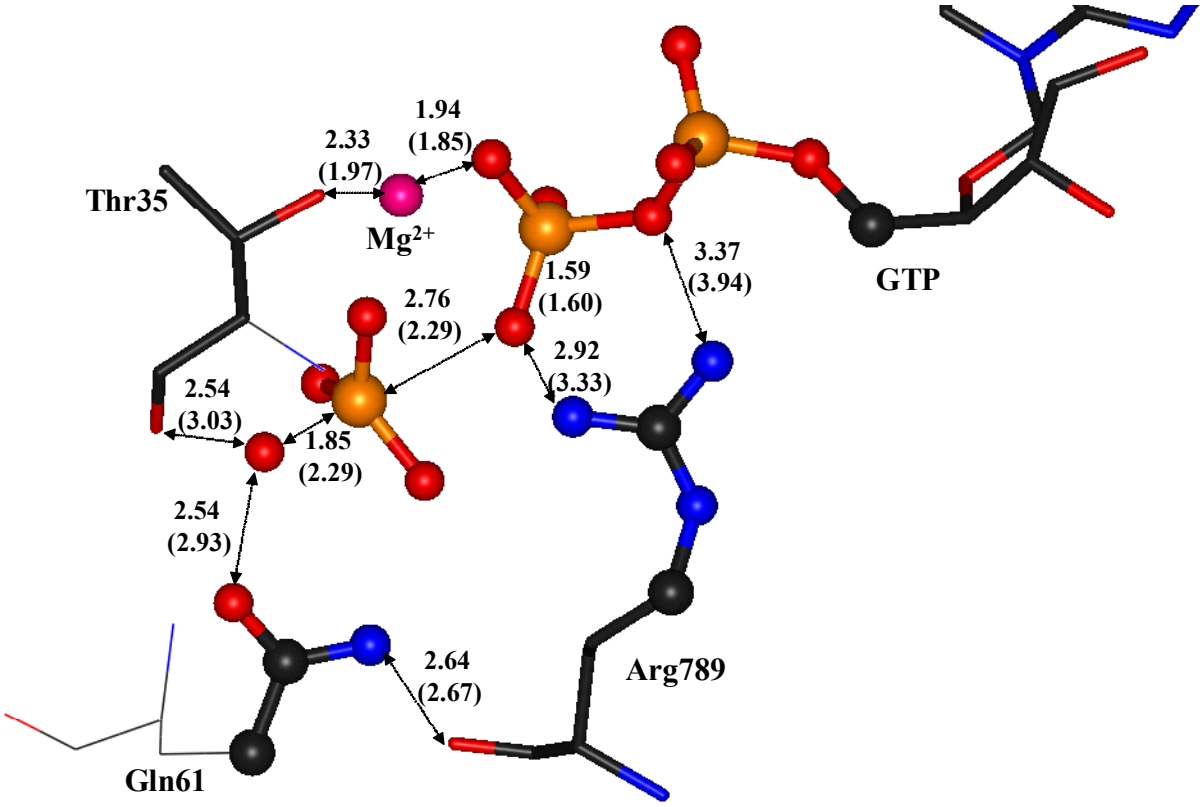



*Рис.3. Сопоставление расстояний (Å) между некоторыми тяжелыми атомами в равновесной геометрической конфигурации модельной системе (числа без скобок) и в кристалле 1WQ1 (числа в скобках). Следует отметить, что в кристалле на месте γ-фосфатной группы находится заменитель $AlF_3$.*

Наиболее важные результаты сопоставления геометрических параметров следующие. Для подавляющего большинства координат молекулярных групп внутри белков согласие рассчитанных и экспериментальных параметров достаточно хорошее (учитывая погрешности

разрешения). В частности, показанные на Рис.3 расстояния между карбонильным кислородом Arg789 и азотом Gln61 практически совпадают. Этот параметр весьма важен, поскольку одна из функций остатка Arg789 от GAP состоит в том, чтобы подтянуть остаток Gln61 от RAS достаточно близко к гидролитической воде.

Результатом замены чужеродного фрагмента $AlF_3$ на $PO_3^-$, т.е. реставрации молекулы GTP при моделировании, является серия изменений в геометрической конфигурации. Во-первых, Arg789 становится достаточно близко к мостиковым атомам кислорода $O(P_\beta)$ и $O(P_\alpha)$ – расстояния N-O сокращаются на 0.4 – 0.5 Å. Во-вторых, остатки Thr35 и Gln61 подтягиваются к гидролитической воде – расстояния O-O сокращаются на 0.5 Å.

Наиболее важным является заключение, что расстояние $P_\gamma$-$O(P_\beta)$ (2.76 Å) отвечает практически разорвавшейся связи P-O, и γ-фосфатная группа $PO_3^-$ располагается близко от гидролитической воды. Схема Рис.4 иллюстрирует изменения в системе вследствие влияния фермента.

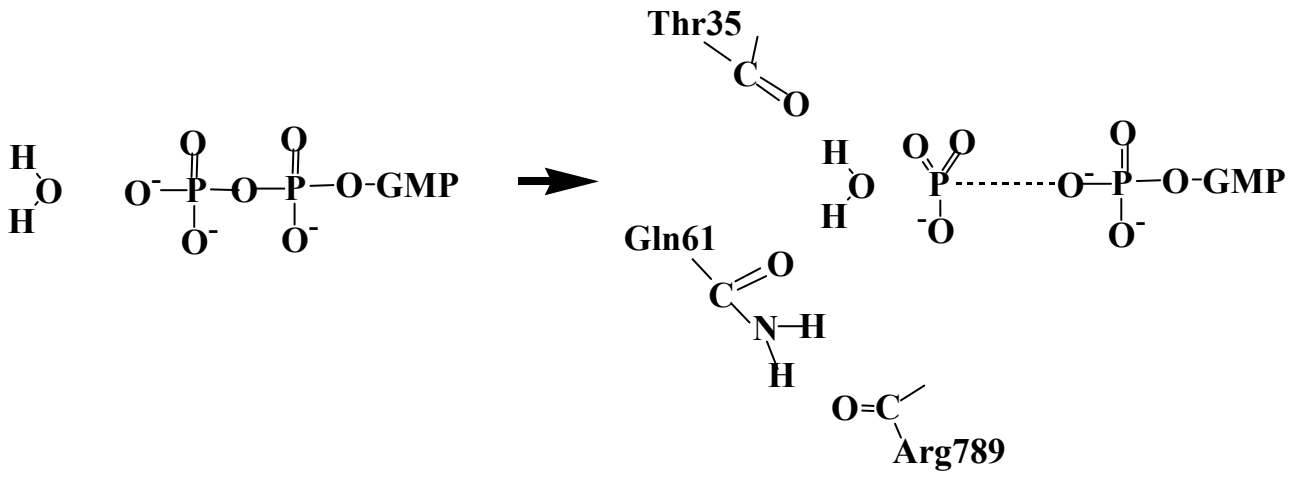



*Рис.4. Схема, иллюстрирующая действие фермента на первой стадии реакции гидролиза.*

Это означает, что разделение GTP на GDP + $PO_3^-$ внутри белкового комплекса происходит в результате действия окружающих молекулярных групп белков до начала собственно реакции гидролиза, поскольку гидролитическая молекула воды в рассматриваемой конфигурации (Рис.3) остается практически в неизменном виде. Решающими взаимодействиями внутри сеток водородных связей являются:

- взаимодействие Arg789 (GAP) - Gln61 (RAS), подтягивающее Gln61 к реакционному центру,
- взаимодействия Thr35 и Gln61 с молекулой воды, ориентирующие ее соответствующим образом по отношению к γ-фосфату,
- взаимодействие подходящим образом ориентированной молекулы воды с GTP, что приводит к «выворачиванию зонтика» $PO_3$, как в $S_N2$ реакциях.

Для проверки высказанных утверждений был проведен численный эксперимент с заменой боковой цепи Arg на Leu («мутация» в GAP). Оптимизация геометрических параметров в подобной модифицированной системе не приводит к разъединению GTP на GDP и $PO_3^-$: равновесное расстояние $P_\gamma$-$O(P_\beta)$ составляет 1.93 Å. Данные результаты были получены в рамках расчетов методом КМ/ММ, причем рассчитанный рельеф поверхности потенциальной энергии показывает, что разъединение GTP происходит без энергетического барьера. Дополнительные расчеты в рамках полностью квантового подхода с использованием приближений Хартри-Фока и теории функционала электронной плотности

для 150-атомного кластера, включающего атомы реакционного центра, показали, что для разрыва связи $P_\gamma$-O($P_\beta$) может потребоваться небольшой активационный барьер [6].

Рис.5 иллюстрирует механизм второй (заключительной) стадии реакции гидролиза.

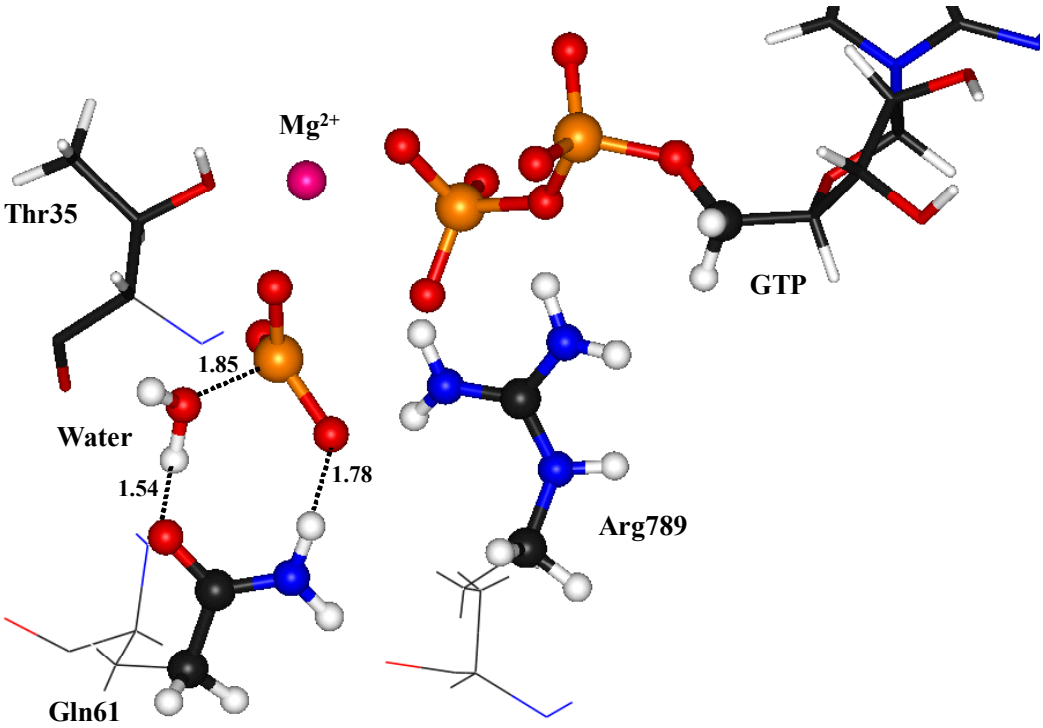
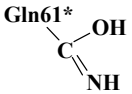



*Рис 5. Схема, иллюстрирующая механизм второй стадии реакции гидролиза.*

На Рис.5 изображена та же конфигурация, что и на Рис.2, но явно показаны некоторые атомы водорода. Дальнейший ход химических превращений может проходить по двум возможным каналам. Во-первых, может быть применима схема субстрат-ассистирующего катализа [3], согласно которой протон от воды присоединяется к кислороду γ-фосфатной группы, а гидроксил – к атому фосфора $P_\gamma$. Для подобного механизма были выполнены расчеты полного энергетического профиля методом КМ/ММ: локализована конфигурация на вершине барьера поверхности потенциальной энергии, с которой безусловной минимизацией получены структуры реагентов (GDP…$PO_3^-$ + $H_2O$) (показана на Рис.5) и продуктов (GDP + $H_2PO_4^-$). Однако, этот путь реакции невозможен вследствие нереально высокого активационного барьера (более 30 ккал/моль).

Можно предложить другой путь реакции. Видно, что молекула воды ориентирована водородными связями с карбонильными группами остатков Gln61 и Thr35 в удобной позиции для перегруппировки внутри 8-членного цикла. А именно, при двойном переносе протонов вдоль направлений Gln_N-H…O (длина водородной связи 1.78 Å) и Gln_O…H-O (длина водородной связи 1.54 Å) и присоединении образующегося гидроксила от воды к $P_\gamma$ может образоваться неорганический фосфат $H_2PO_4^-$. Расчеты соответствующего энергетического профиля методом КМ/ММ предсказывают активационный барьер на этом пути менее 10 ккал/моль, что вполне разумно для биохимических процессов.

При подобной перегруппировке глютамин остается в таутомерной форме




что не может вызывать серьезных возражений – исходная форма достаточно легко может быть восстановлена, если вблизи окажется молекула воды после освобождения продуктов.

Энергетический рельеф двойного переноса протонов был дополнительно проверен в серии неэмпирических квантовохимических расчетов для упрощенной молекулярной модели, сохраняющей основные черты реакционной части ферментативной системы (показана на Рис.6). Для локализации равновесных геометрических конфигураций реагентов, продуктов и переходного состояния (точки с единственной мнимой частотой колебаний) использовались подходы RHF/6-31+G** и B3LYP/6-31+G**. Показано, что энергия активации не превышает 10 ккал/моль, а энергетический эффект реакции – порядка 10 ккал/моль.

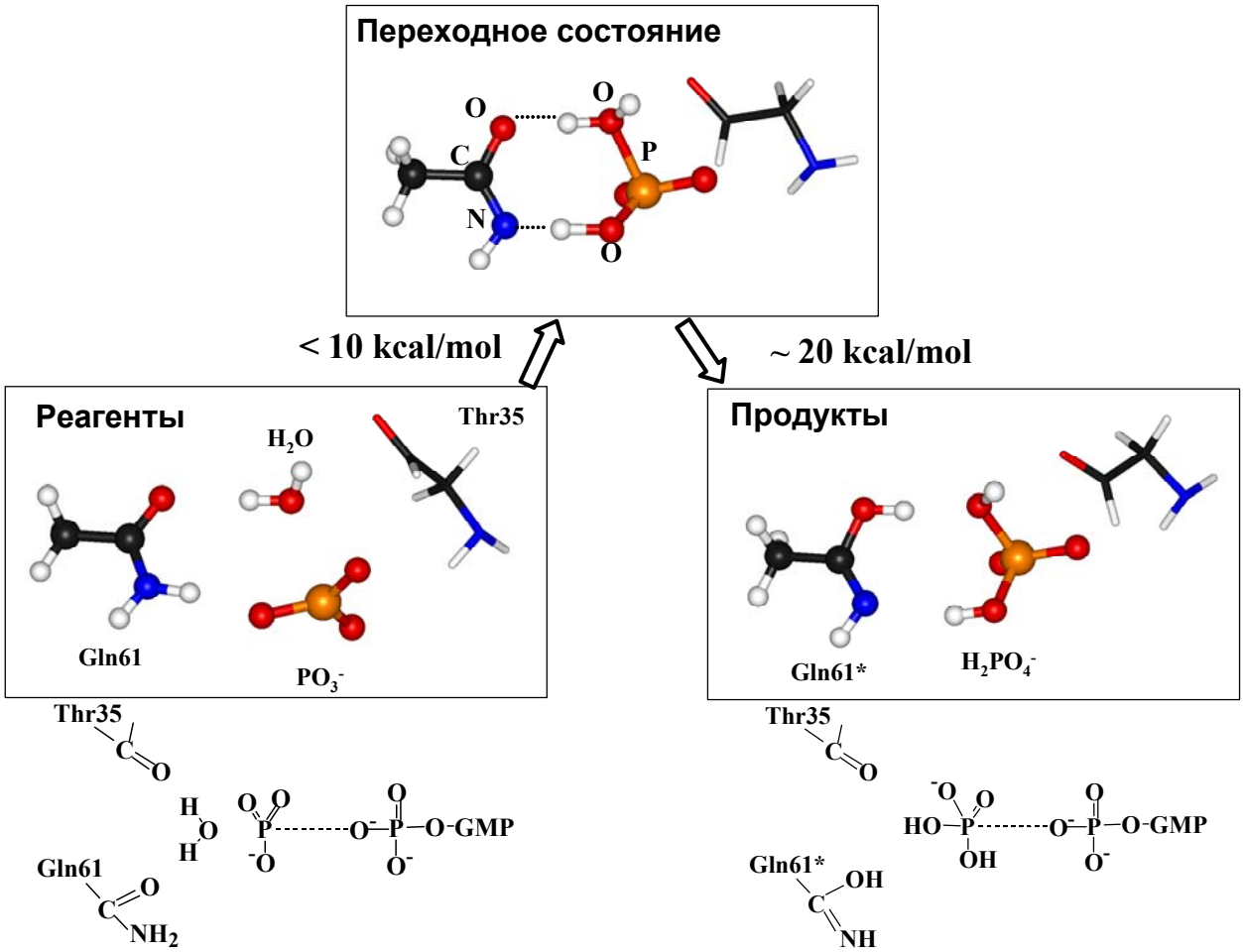



*Рис.6. Механизм двойной переноса протонов в модельной системе по данным неэмпирических квантовохимических расчетов.*

Эти расчеты не оставляют сомнений в том, что реакция гидролиза GTP в белковом комплексе RAS-GAP, наиболее вероятно, происходит именно по такому механизму.

В литературе удалось найти упоминание про возможность таутомерного механизма реакции гидролиза в G-белках, высказанное в качестве гипотезы [7]. Однако, эта гипотеза была позднее отвергнута в теоретической работе [8] на основании полу-количественных оценок энергетических затрат. Действительно, в изолированном состоянии таутомерная форма Gln61* должна быть выше по энергии (примерно на 18 ккал/моль), однако, в данном молекулярном окружении (Рис.6) необходимо принимать во внимание наличие рядом аниона $PO_3^-$, что существенно меняет энергетику перегруппировки. Неэмпирические квантовохимические расчеты (Рис.6) предоставляют прямую возможность проверить таутомерный механизм.

Таким образом, по результатам моделирования можно утверждать, что реакция гидролиза GTP в белковом комплексе RAS-GAP проходит по следующей схеме (Рис.7):

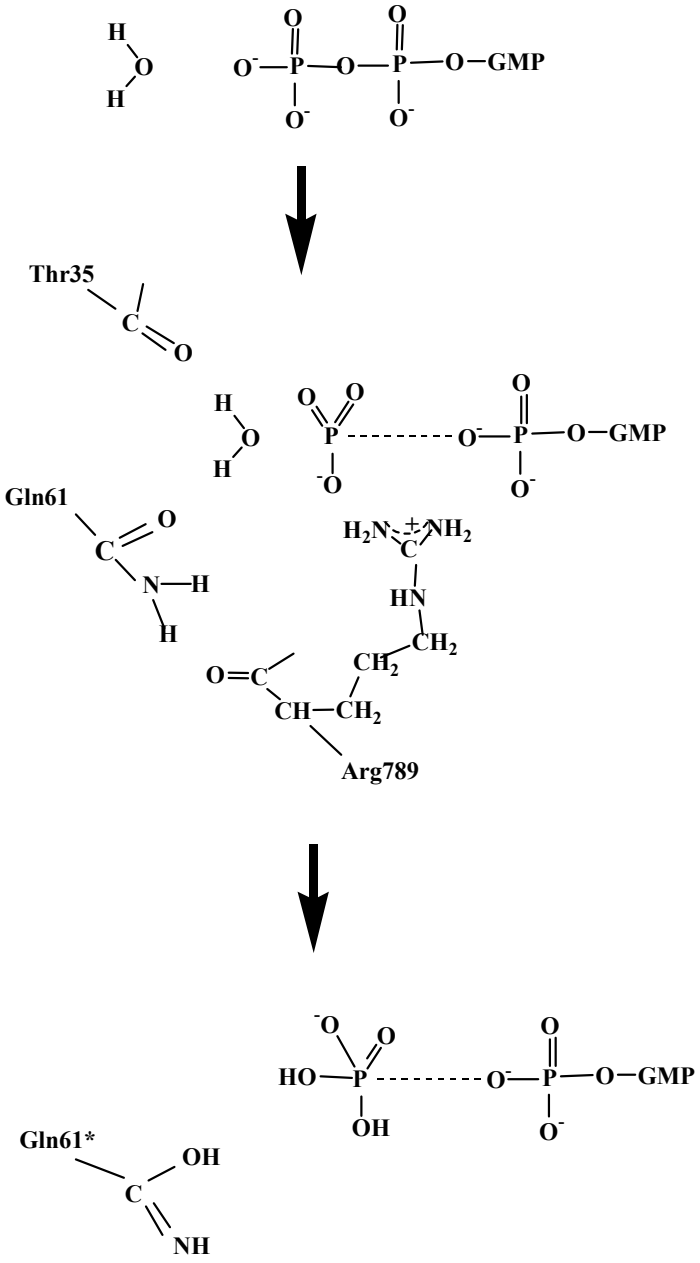



*Рис.7. Схема, иллюстрирующая механизм реакции гидролиза GTP в комплексе RAS-GAP.*

Роль ключевых аминокислотных остатков Gln61(RAS) и Arg789(GAP) полностью ясна, и понятно, что мутации по этим позициям должны приводить к возрастанию активационного барьера реакции или полностью менять механизм катализа.

Работа выполнена при частичной поддержке Американского фонда гражданских исследований для и развития для независимых государств бывшего Советского Союза (проект RC1-2350-MO-02) и Российского фонда фундаментальных исследований.

## Литература


1. *Grigorenko B.L., Nemukhin A.V, Topol I.A., Burt S.K.* //Journal of Physical Chemistry B. 2002. V.106. P. 10663.
2. *Nemukhin A.V, Grigorenko B.L., Topol I.A., Burt S.K.* //Journal of Computational Chemistry. 2003. V.24. P. 1410.
3. *Shurki A., Warshel A.* // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2004. V.55. P.1.
4. *Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmüller L., Lautwein A., Schmidt F., Wittinghofer A.* //Science. 1997. V.277. P.333.
5. *Kosloff M., Selinger Z.* //Trends in Biochemical Sciences. 2001. V.26. P.161.
6. *Topol I.A., Cachau R.E., Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Burt S.K.* //Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics. 2004. (in press)
7. *Sondek J., Lambright D.G., Noel J.P., Hamm H.E., Sigler P.B.* //Nature. 1994. V.372. P.276.
8. *Schweins T., Warshel A.* //Biochemistry. 1996. V.35. P.14232.