

УДК 577.15

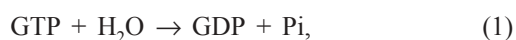
МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ГУАНОЗИНТРИФОСФАТА БЕЛКОВЫМ КОМПЛЕКСОМ RAS–GAP

Б.Л. Григоренко, А.В. Рогов, М.А. Князева, Е.В. Исаева, А.В. Немухин

(кафедра физической химии)

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.

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



является лимитирующей стадией всего цикла связывания/гидролиза GTP, ответственного за передачу сигналов на рост клеток. В результате реакции (1) GTP/GDP-связывающие белки (G-белки) переходят из активной формы (“ON”) в неактивную (“OFF”). Замена GDP на GTP восстанавливает активную форму. Гидролиз проходит эффективно 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 p21^{ras} – одного из G-белков человека, именуемого далее для краткости RAS, может привести к развитию раковых опухолей. Огромное число публикаций посвящено экспериментальному и теоретическому изучению реакции гидролиза GTP, однако четких однозначных ответов на вопросы о механизме реакции (1) в разных средах, а также о роли ключевых аминокислотных остатков не дано. Доминирующей точкой зрения является гипотеза ассоциативного механизма реакции гидролиза по схеме субстрат-ассистирующего катализа [1], однако все попытки рассчитать энергетический профиль реакции по этому механизму в рамках разных молекулярных моделей традиционными методами квантовой химии приводят к нереально высоким активационным барьерам (более 30 ккал/моль).

В настоящей работе моделирование механизма реакции гидролиза GTP выполнено для реального бел-

кового окружения комбинированным методом квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ), который в последние годы становится основным инструментом расчетов энергетических профилей ферментативных реакций. Часть молекулярной системы, в которой происходят перераспределения химических связей, включается в квантовую подсистему, поэтому значения энергии и силы рассчитываются по уравнениям квантовой механики (КМ). Большинство атомов, окружающих выделенную центральную часть, относятся к молекулярно-механической (ММ) подсистеме. Расчеты, описанные в настоящем сообщении, выполнены с использованием оригинальной реализации метода КМ/ММ [2, 3], позволяющей рассчитывать энергетические профили химических реакций в белках.

Детали расчетов

В 1997 г. по данным рентгено-структурного анализа с разрешением 2,5 Å была определена структура комплекса RAS–GAP (p21^{ras}–p120^{GAP}) с аналогом GTP (GDP+AlF₃) [4], являющаяся основным источником информации о строении активного центра фермента. Принято считать, что данная структура (код 1WQ1 в Банке данных белковых структур) соответствует переходному состоянию в реакции гидролиза (1), поскольку плоская группа AlF₃ имитирует предполагаемую конфигурацию γ-фосфатной группы GTP на вершине энергетического барьера. В настоящей статье используется нумерация аминокислотных остатков, соответствующая структуре 1WQ1. По координатам тяжелых атомов этой структуры была построена молекулярная модель для расчетов (рис. 1), группа

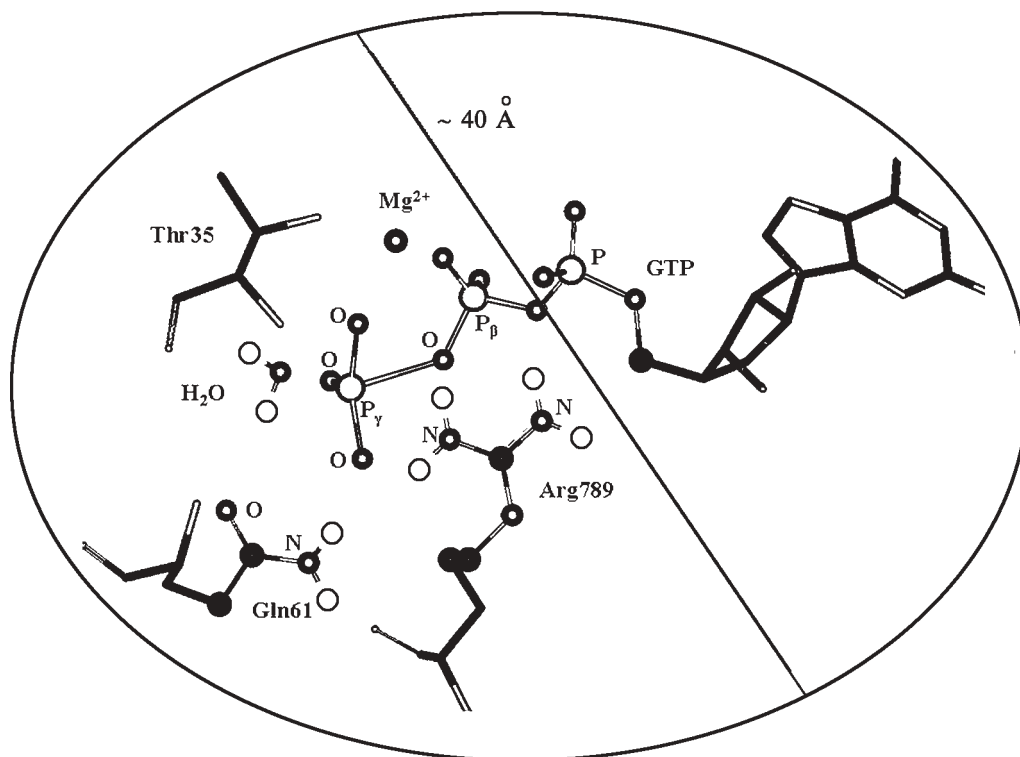


Рис. 1. Молекулярная модель, использованная в данной работе (в квантовую подсистему включены 43 атома, часть из которых показана шарами и стержнями; с учетом молекулярно-механической подсистемы, включающей 1622 атомов, общий размер системы составляет примерно 40 Å)

AlF_3 заменена на PO_3^- , добавлены атомы водорода, а из всего объема системы был выделен окружающий реакционный центр – фрагмент с линейными размерами около 40 Å.

В квантовую подсистему были включены фосфатные группы GTP, молекула воды, катион магния, фрагмент Gln61 от RAS и фрагмент Arg789 от GAP (так называемый «аргининовый палец»). 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 (и псевдопотенциалом для фосфора) LANL2DZdp_ECP в КМ-части и параметры силового поля AMBER в ММ-части.

Обсуждение результатов

Результатом расчетов является набор стационарных точек на композитной (КМ+ММ) поверхности потенциальной энергии модельной молекулярной системы, переходы между которыми соответствуют течению реакции (1) от реагентов к продуктам. В соответ-

ствии с данными квантово-химических расчетов для более простой молекулярной модели [6] реакционный путь минимальной энергии проходит от конфигурации реагентов (рис. 1) к интермедиату через достаточно невысокий (по разным оценкам от 8 до 17 ккал/моль) потенциальный барьер. По предположениям работы [4] кристаллическая структура 1WQ1 является аналогом конфигурации на вершине барьера.

На рис. 2 сопоставлены расстояния (Å) между некоторыми тяжелыми атомами, полученные для рассчитанной геометрической конфигурации переходного состояния (числа без скобок), и экспериментальные расстояния (числа в скобках), полученные для структуры 1WQ1. Следует отметить, что в кристалле вместо GTP находится аналог ($\text{GDP} + \text{AlF}_3$), причем AlF_3 располагается на месте γ -фосфатной группы GTP.

Для подавляющего большинства координат молекулярных групп внутри белков согласие рассчитанных и экспериментальных параметров достаточно хорошее (учитывая погрешности разрешения). В частности, показанные на рис. 2 расстояния между карбонильным кислородом Arg789 и азотом Gln61 практически совпадают. Этот параметр весьма важен, поскольку

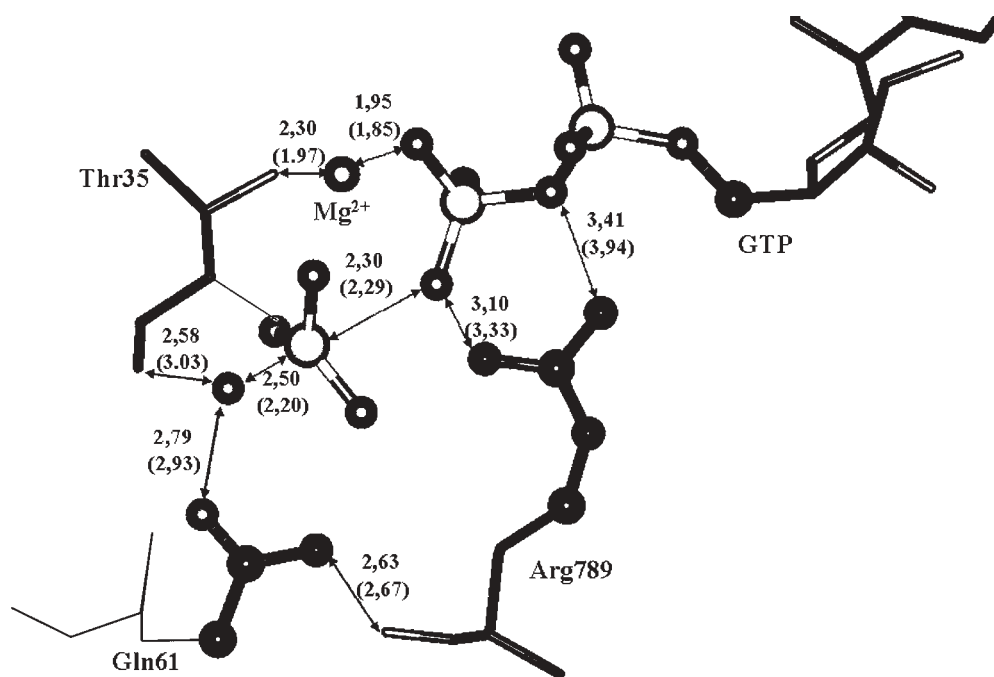


Рис. 2. Сопоставление расстояний (Å) между некоторыми тяжелыми атомами в равновесной геометрической конфигурации первого переходного состояния реакции гидролиза (числа без скобок) и в кристалле 1WQ1 (числа в скобках)

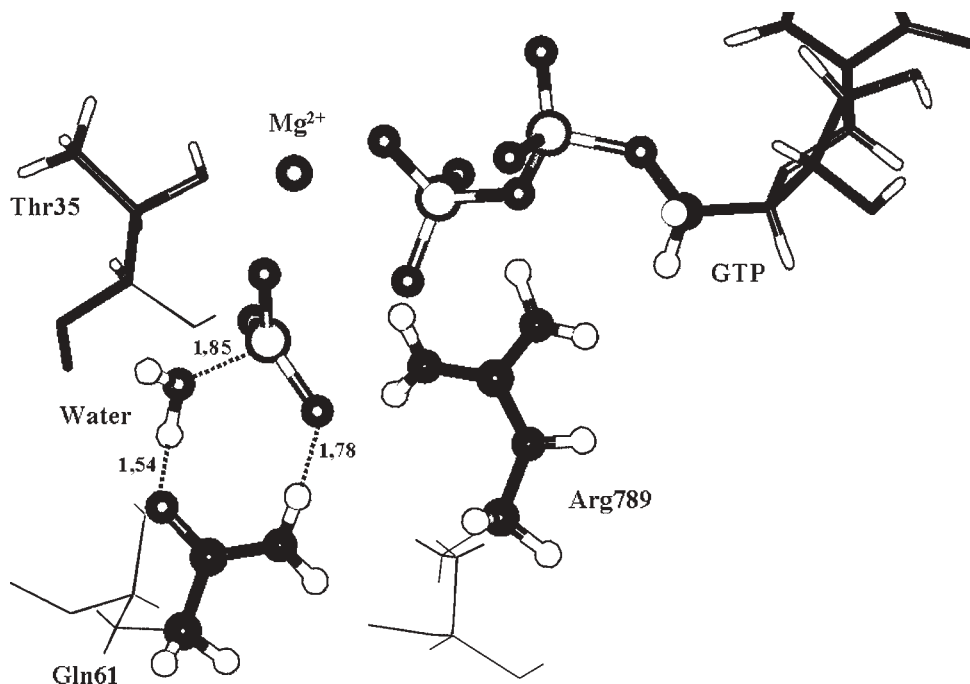


Рис. 3. Конфигурация, соответствующая интермедиату реакции (1)

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, во-первых, приближение Arg789 к мостиковым атомам кислорода $\text{O}(\text{P}_\beta)$ и $\text{O}(\text{P}_\alpha)$, во-вторых, подтягивание остатков Thr35 и Gln61 к гидролитической воде – расстояния O–O сокращаются на 0,5 Å.

Наиболее важный вывод заключается в том, что расстояние $\text{P}_\gamma\text{--O}(\text{P}_\beta)$ (2,30 Å) отвечает практически разорвавшейся связи P–O и γ -фосфатная группа PO_3^- располагается близко от гидролитической воды. Это означает, что разделение GTP на $\text{GDP} + \text{PO}_3^-$ 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.

Решающую роль играют следующие взаимодействия внутри сеток водородных связей: 1) взаимодействие Arg789 (GAP) – Gln61 (RAS), подтягивающее Gln61 к реакционному центру; 2) взаимодействие Thr35 и Gln61 с молекулой воды, ориентирующее ее соответствующим образом по отношению к γ -фосфату; 3) взаимодействие подходящим образом ориентированной молекулы воды с GTP, что приводит к «выворачиванию зонтика» PO_3^- .

В дальнейшем химические превращения могут проходить по двум схемам.

Во-первых, по схеме субстрат-ассистирующего катализа [1, 5], согласно которой протон от воды присоединяется к кислороду γ -фосфатной группы, а гидроксил – к атому фосфора P_γ . Для этого 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 ($\text{GDP} \dots \text{PO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$) и продуктов ($\text{GDP} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$). Однако этот путь вряд ли возможен вследствие нереально высокого активационного барьера (более 30 ккал/моль).

По другой схеме после преодоления потенциально-го барьера система оказывается в локальном минимуме на энергетической поверхности, отвечающей конфигурации интермедиата реакции (рис. 3). Видно, что молекула воды ориентирована водородными связями с карбонильными группами остатков Gln61 и

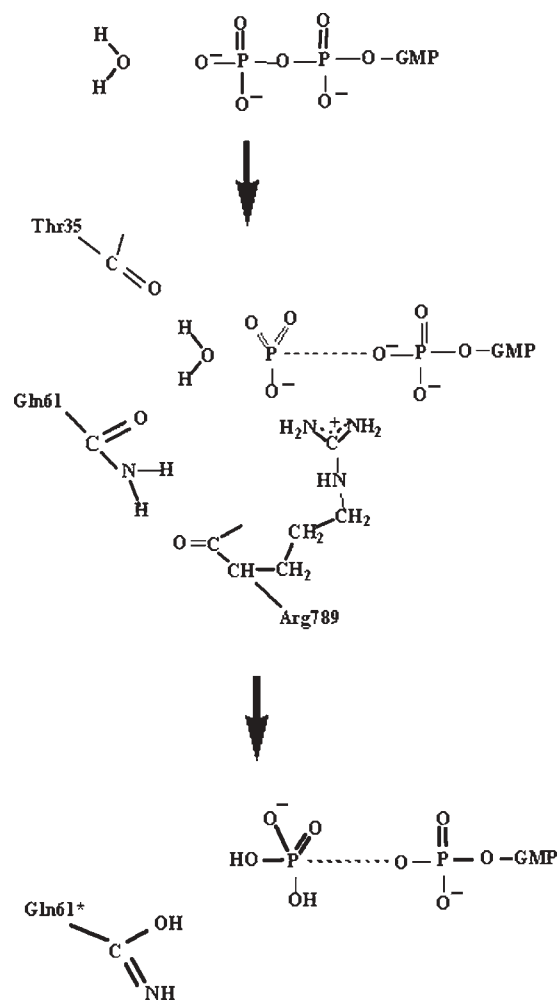
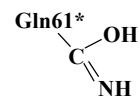


Рис. 4. Механизм реакции гидролиза GTP в комплексе RAS–GAP

Thr35 в удобной позиции для перегруппировки внутри 8-членного цикла. А именно, при двойном переносе протонов вдоль направлений $\text{Gln_N}\text{--H} \dots \text{O}$ (длина водородной связи 1,78 Å) и $\text{Gln_O} \dots \text{H}\text{--O}$ (длина водородной связи 1,54 Å) и присоединении образующегося гидроксила от воды к P_γ может образоваться неорганический фосфат H_2PO_4^- . Расчеты соответствующего энергетического профиля методом КМ/ММ определяют величину активационного барьера на этом пути менее 12 ккал/моль, что вполне разумно для биохимических процессов.

При подобной перегруппировке глутамин переходит в таутомерную форму



что, однако, не является причиной серьезных возражений – исходная форма достаточно легко может быть восстановлена, если вблизи окажется молекула (или молекулы) воды после освобождения продуктов из белкового комплекса.

В литературе можно найти упоминание о возможности таутомерного механизма реакции гидролиза в G-белках, высказанное в качестве гипотезы [7]. Однако эта гипотеза была позднее отвергнута в теоретической работе [8] на основании полуколичественных 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 необходимо принимать во внимание наличие рядом аниона PO_3^- , что существенно меняет энергетику перегруппировки.

Таким образом, по результатам моделирования можно утверждать, что реакция гидролиза GTP в белковом комплексе RAS–GAP проходит по следующей схеме (рис. 4).

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 РФФИ (проект 04-03-32008).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shurki A., Warshel A.* // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2004. **55**. P.1.
2. *Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Topol I.A. et al.* // J. Phys. Chem. B. 2002. **106**. P. 10663.
3. *Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Topol I.A. et al.* // J. Comp. Chem. 2003. **24**. P. 1410.
4. *Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W. et al.* // Science. 1997. **277**. P. 333.
5. *Kosloff M., Selinger Z.* // Trends in Biochemical Sciences. 2001. **26**. P. 161.
6. *Topol I.A., Cachau R.E., Nemukhin A.V. et al.* // Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics. 2004. **1700**. P. 125.
7. *Sondek J., Lambright D.G., Noel J.P. et al.* // Nature. 1994. **372**. P. 276.
8. *Schweins T., Warshel A.* // Biochemistry. 1996. **35**. P. 14232.

Поступила в редакцию 16.11.04

MODELING THE MECHANISM OF GTP HYDROLYSIS BY THE RAS–GAP PROTEIN COMPLEX

B.L. Grigorenko, A.V. Rogov, M.A. Knyazeva, E.V. Isaeva, A.V. Nemukhin

(Division of Physical Chemistry)

Reaction mechanism of the GTP hydrolysis reaction catalyzed by the protein complex RAS–GAP (p21^{ras} – p120^{GAP}) was studied by using an original hybrid quantum mechanical – molecular mechanical approach. It was shown that the mechanism involving Gln61 in proton transfers associated with the formation of Gln61 in its tautomeric form is preferable in this reaction. The results of the modeling allow one to clarify the role of the key amino-acid residues Gln61 (RAS) and Arg789 (GAP) and the role of p21^{ras} mutations for the RAS–GAP functionality.