

УДК 517.15

РОЛЬ МАГНИЯ В РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ТРИФОСФАТОВ В ВОДЕ: МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТОДАМИ КВАНТОВОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ

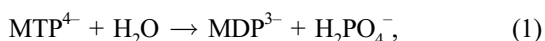
А.В. Рогов, Б.Л. Григоренко, А.В. Боченкова, А.А. Грановский, А.В. Немухин

(кафедра физической химии; e-mail: anem@lcc.chem.ru)

Описано моделирование механизма реакции гидролиза депротонированного эфира метилтрифосфата (МТР) до метилдифосфата (МДР) и неорганического фосфата (Рi) в водных кластерах в присутствии и в отсутствие катиона магния. Использован вариант метода квантовой и молекулярной механики на основе теории потенциалов эффективных фрагментов. При расчетах энергии и ее производных в квантовой подсистеме, включающей МТР, реакционные молекулы воды и Mg^{2+} , применена теория функционала плотности (B3LYP), а взаимодействие молекул воды описано модельным потенциалом TIP3P. Показано, что энергетический профиль пути минимальной энергии для реакции $MTR + H_2O \rightarrow MDP + Pi$ согласуется с двухстадийным процессом диссоциативного типа в отсутствие Mg^{2+} и с одностадийным механизмом – в присутствии Mg^{2+} .

Введение

Исследованию механизмов реакции гидролиза трифосфатов уделяется большое внимание, прежде всего вследствие важности ферментативных превращений аденозинтрифосфата (АТФ) и гуанозинтрифосфата (ГТФ) в биологических системах [1]. Анализ реакции гидролиза метилтрифосфата (МТФ) в водных растворах предоставляет необходимые реперные данные для выяснения каталитического эффекта белковых матриц при ферментативных превращениях АТФ и ГТФ [2, 3]. Измерения констант скорости гидролиза метилмонофосфата в воде при разных значениях рН [4] позволили оценить [5, 6] активационные барьеры на поверхности свободной энергии величинами (27–31 ккал/моль), однако прояснить детали реакционного механизма не удалось. Теоретические подходы к моделированию механизма гидролиза, полностью депротонированного МТФ в водных кластерах, описаны в работах [7, 8] с использованием метода молекулярной динамики Кара–Парринелло [7] (в данном случае это привело к существенно завышенным значениям активационных барьеров) и метода квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) [8]. Результаты расчетов энергетического профиля реакции



где МТР и МДР – соответственно метилтрифосфат и метилдифосфат в окружении молекул воды, представленные в нашей предшествующей работе [8], свидетельствуют в пользу преимущественно диссоциативного механизма реакции. Однако эти результаты

были получены в рамках приближения Хартри–Фока, т.е. без учета корреляционных эффектов в квантовой части, а также без участия в модельной молекулярной системе катиона Mg^{2+} , который всегда присутствует в ферментах, катализирующих гидролиз АТФ и ГТФ. В данной работе представлены результаты расчетов энергетических профилей реакции (1), а также обсуждение механизма реакции с участием и без участия катиона Mg^{2+} в системе на основании расчетов методом КМ/ММ с использованием приближений теории функционала электронной плотности в квантовой части.

Методика расчетов

Для расчетов энергии и градиентов энергии используется комбинированный метод квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) на основе теории потенциалов эффективных фрагментов [9]. В этом подходе молекулярные группы, относимые к молекулярно-механической (ММ) подсистеме, представляются эффективными фрагментами, которые вносят электростатический, поляризационный и обменный вклады в гамильтониан квантовой подсистемы. В отличие от реализации этого метода в квантово-химической программе GAMESS(US) [10] в нашей вычислительной схеме, ориентированной на использование программы PC GAMESS [11], взаимодействие между молекулами воды, относящимися к ММ-подсистеме, описывается известным эмпирическим потенциалом TIP3P [12].

В настоящей работе были рассмотрены две модельные молекулярные системы, различающиеся

прежде всего наличием или отсутствием катиона магния. В модели I в квантовую подсистему включен четырехзарядный анион МТФ и пять молекул воды; еще 75 молекул воды, описываемых эффективными фрагментами, отнесены к молекулярно-механической части. В модели II КМ-часть включает анион МТФ, катион Mg^{2+} и семь молекул воды; еще 73 молекулы воды (эффективные фрагменты) отнесены к ММ-части. Данные молекулярные кластеры были построены последовательным добавлением молекул воды к реакционным частицам ($MTP^{4-} + H_2O$) с оптимизацией на каждом шаге геометрических параметров всей системы так, чтобы поддерживалась сетка водородных связей. Выбранного числа молекул воды (всего 80) достаточно для полного окружения реакционной части молекулами растворителя (рис. 1).

Включение пяти (модель I) или семи (модель II) молекул воды в КМ-подсистему было обусловлено необходимостью обеспечения нескольких вариантов выбора пути передачи протонов для образования неорганического фосфата. Для окончательного заключения были выбраны пути с наименьшими энергиями активации.

При расчетах энергии в приближении КМ/ММ сканировались области многомерных поверхностей потенциальной энергии, в которых происходят разрывы и образования химических или водородных связей. Затем более точно геометрической оптимизацией определялись положения стационарных точек на поверхно-

стях энергии. Геометрические конфигурации седловых точек (или переходных состояний) были найдены на основании следующего критерия: градиент по внутренней координате, отнесенной к координате реакции рассматриваемой стадии, в этой точке должен менять знак.

Энергии и градиенты энергии в КМ-подсистеме вычисляли по теории функционала электронной плотности с известным функционалом B3LYP в рамках пакета программ PC GAMESS [11]. Был использован базисный набор LANL2DZdp_ECP [13] с соответствующим псевдопотенциалом для фосфора. Для описания орбиталей катиона магния был использован общепринятый базис 6-31G.

Результаты расчетов

Результаты расчетов в рамках модели I (без катиона магния) качественно согласуются с данными расчетов, проведенных с использованием приближения Хартри–Фока в КМ-подсистеме [8]. На поверхности потенциальной энергии локализуются стационарные точки, соответствующие реагентам ($MTP^{4-} + H_2O$), продуктам ($MDP^{3-} + H_2PO_4^-$), интермедиату реакции (см. рис. 1–3 в работе [8]) и двум переходным состояниям ПС1 и ПС2. Реакция протекает по диссоциативному механизму: при отделении γ -фосфатной группы $P_\gamma O_3$ от метилдифосфата происходит разрыв связи $P_\gamma-O_{\beta\gamma}$ с последующими переносами протонов вдоль водородных связей молекул воды и

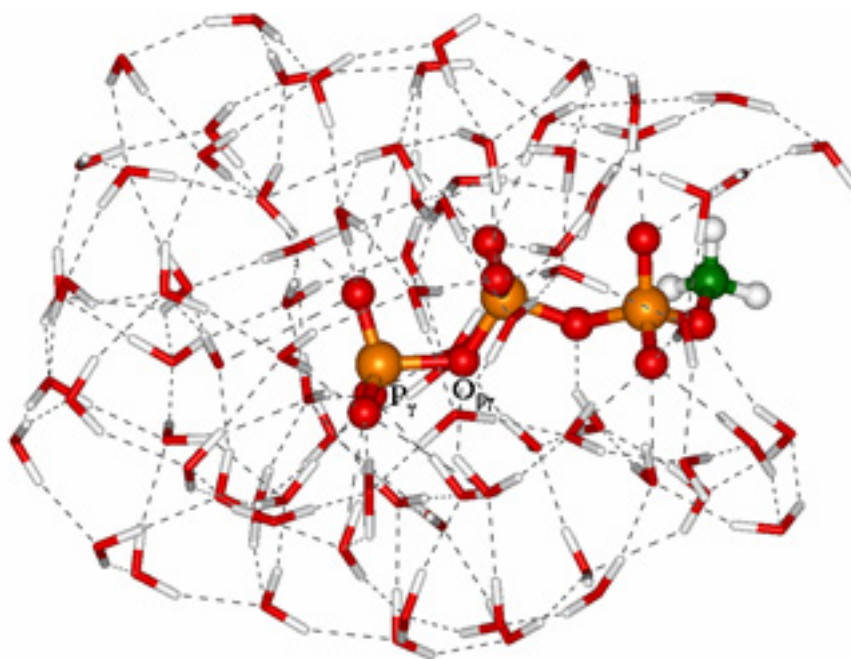


Рис. 1. Общий вид модельного кластера (без катиона магния)

Относительные энергии (ккал/моль) стационарных точек на пути реакции гидролиза метилтрифосфата (I) в модельной системе без катиона магния (модель I), полученные ранее [8] в приближении Хартри–Фока и вычисленные в настоящей работе с использованием теории функционала электронной плотности (B3LYP). В обоих случаях использовался базис LANL2DZdp_ECP (в КМ-подсистеме) и потенциал TIP3P для взаимодействия молекулы воды в ММ-подсистеме

Структура	Расчеты [8] методом Хартри–Фока	Расчеты по теории функционала плотности (B3LYP)
Реагенты	0,0	0,0
ПС1	20,0	12,9
Интермедиаг	7,0	3,0
ПС2	14,1	4,5
Продукты	-20,7	-16,4

$P_\gamma O_3$, при этом образуется неорганический фосфат $H_2PO_4^-$. В таблице сопоставлены относительные энергии стационарных точек на пути реакции, вычисленные в приближении Хартри–Фока и по теории функционала плотности. Согласно опыту расчетов энергетических профилей химических реакций, активационные барьеры приближения Хартри–Фока, скорее всего, завышены, а барьеры теории функциона-

ла плотности – занижены. Результаты расчетов для модели II (с катионом магния) существенно отличаются. На рис. 2 изображена равновесная конфигурация реагентов, полученная безусловной оптимизацией геометрических параметров. Видно, что катион магния координируется четырьмя молекулами воды и атомами кислорода γ - и β -фосфатных групп МТФ. Реакционная молекула воды W_1 расположена на расстоянии 3,73 Å от P_γ .

Как и для модели I, поиск переходного состояния проводили сканированием потенциальной поверхности вдоль двух координат: расстояние от кислорода реакционной молекулы воды (W_1) до фосфора P_γ (исходное значение в конфигурации реагентов 3,73 Å) и расстояния $P_\gamma-O_{\beta\gamma}$ (исходное значение 1,75 Å). Серией условных оптимизаций геометрических параметров нам удалось получить точку переходного состояния, изображенную на рис. 3. Как и во всех реакциях гидролиза трифосфатов, стадия разрыва связи $P_\gamma-O_{\beta\gamma}$ в окружении молекул растворителя или белковой матрицы происходит через стереохимическую инверсию около атома P_γ . В отличие от модели I после найденной точки переходного состояния путь минимальной энергии от седловой точки приводит к продуктам реакции ($MDP^{3-} + H_2PO_4^-$) после серии переносов протонов с участием молекул воды W_1, W_2, W_3 . Равновесная конфигурация продуктов, полученная безусловной оптимизацией геометрических параметров, показана на рис. 4. Подобный одностадийный механизм реакции характерен для гидролиза аденозинтрифосфата белком миозином.

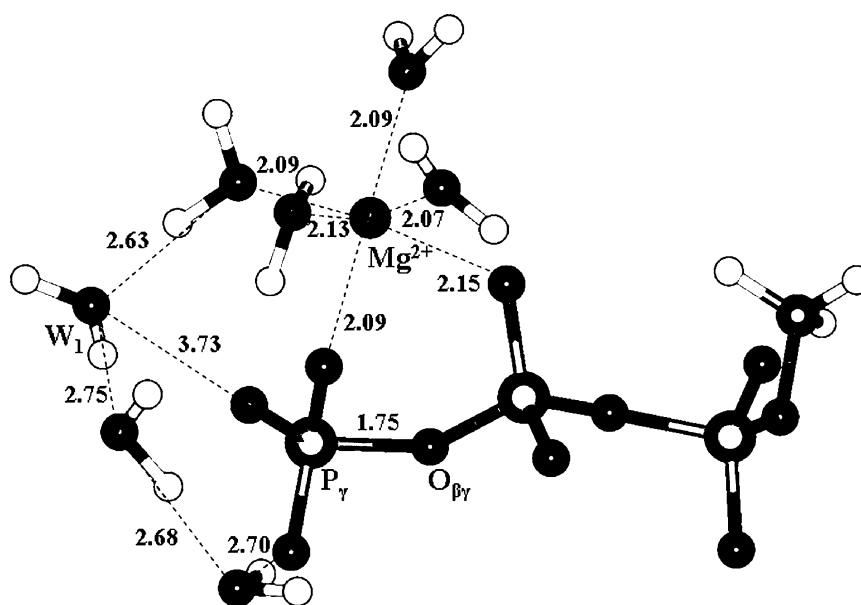


Рис. 2. Геометрическая конфигурация квантовой подсистемы реагентов для модели II (расстояния приведены в Å)

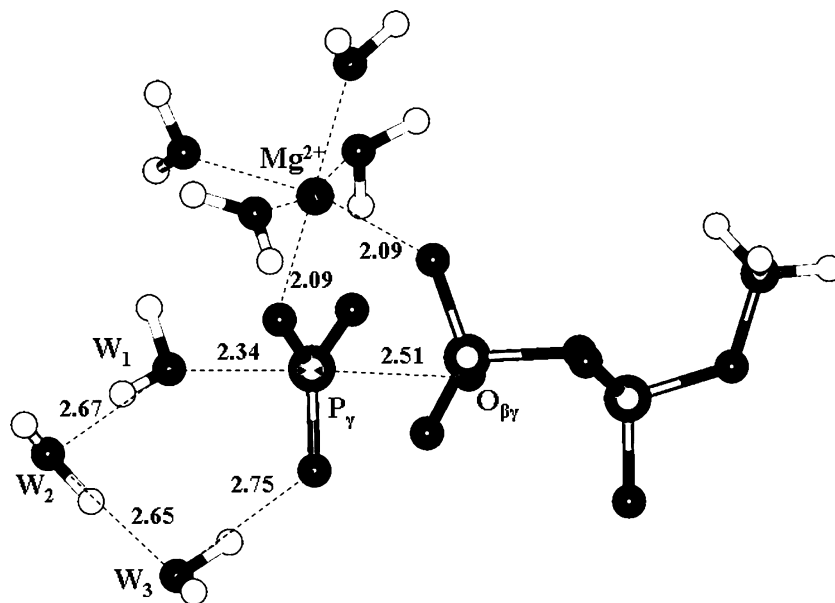


Рис. 3. Геометрическая конфигурация квантовой подсистемы для единственного переходного состояния в модели II (расстояния приведены в Å)

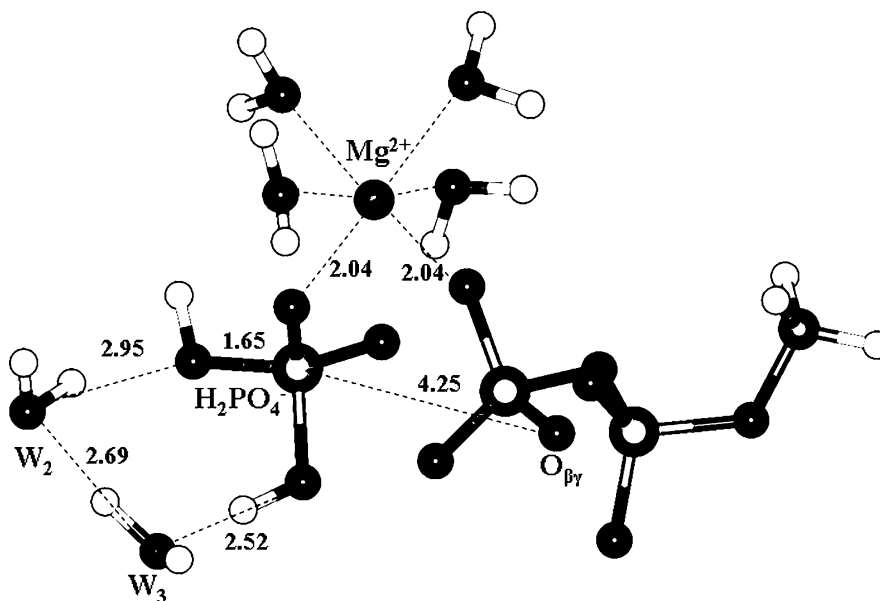


Рис. 4. Геометрическая конфигурация квантовой подсистемы продуктов в модели II (расстояния приведены в Å)

По отношению к уровню энергии реагентов положение единственного переходного состояния составляет 11,1 ккал/моль, а энергетический эффект реакции – (–8,6) ккал/моль.

Выводы

Результаты молекулярного моделирования методом КМ/ММ реакции (1) в водных кластерах в присут-

ствии и в отсутствие катиона Mg^{2+} в модельной молекулярной системе позволяют сформулировать следующие выводы. Гидролиз полностью депротонированного метилтрифосфата в воде происходит по диссоциативному механизму: γ -фосфатная группа $P_{\gamma}O_3$ отделяется от метилдифосфата с разрывом связи $P_{\gamma}-O_{\beta\gamma}$ с последующими переносами протонов вдоль водородных связей молекул воды и $P_{\gamma}O_3$ с образова-

ем неорганического фосфата H_2PO_4^- . Активационные барьеры, вычисленные в приближении B3LYP/LANL2DZdp_ECP в квантовой части, оцениваются в 13 и 11 ккал/моль при отсутствии и наличии катиона Mg^{2+} в системе. С учетом того, что приближения квантовой химии на основе теории функционала электронной плотности обычно дают оценки снизу для барьеров потенциальной энергии, а оценки барьеров свободной энергии (27–31 ккал/моль) [5, 6] по экспериментальным данным [4] относятся к гидролизу метилмонофосфата и очевидно завышают барьеры для полностью депротонированного метилтрифосфата, согласие теоретических и экспериментальных резуль-

татов вполне удовлетворительное. Рассчитанный энергетический эффект реакции (1) в присутствии катиона магния в модельной системе (–8,6 ккал/моль) также согласуется с ожидаемыми по экспериментальным данным величинами [14]. Согласно результатам моделирования, реакция гидролиза (1) с участием катиона магния происходит несколько иначе, чем в его отсутствие. В последнем случае после разрыва связи $\text{P}_\gamma\text{--O}_{\beta\gamma}$ образуется интермедиат, для превращения которого в неорганический фосфат требуется второе переходное состояние. Гидролиз депротонированного метилтрифосфата в воде с присутствием катиона магния происходит в одну стадию.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 05-03-39010) и Государственного фонда естественных наук Китая.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М., 2005.
2. Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Topol I.A., Cachau R.E., Burt S.K. // Proteins: Struct. Func. Bioinf. 2005. **60**. P. 495.
3. Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Shadrina M.S., Topol I.A., Burt S. K. // Proteins: Struct. Func. Bioinf. 2007. **66**. P. 456.
4. Bunton C.A., Llewellyn D. R., Oldham K.G., Vernon C.A. // J. Chem. Soc. **1958**. P. 3574.
5. Glennon T. M., Villa J., Warshel A. // Biochem. 2000. **39**. P. 9641.
6. Hu C.H., Brinck T.J. // Phys. Chem. A. 1999. **103**. P. 5379.
7. Akola J., Jones R.O. // J. Phys. Chem. B. 2003. **107**. P. 11774.
8. Grigorenko B.L., Rogov A.V., Nemukhin A.V. // J. Phys. Chem. B. 2006. **110**. P. 4407.
9. Gordon M.S., Freitag M.A., Bandyopadhyay P., Jensen J.H., Kairys V., Stevens W.J. // J. Phys. Chem. A. 2001. **105**. P. 293.
10. Schmidt M.W., Baldridge K.K., Boatz J.A. et al. // J. Comput. Chem. 1993. **14**. P. 1347.
11. Granovsky A. URL <http://lcc.chem.msu.ru/gran/games/index.html>
12. Kaminski G., Friesner R.A., Tirado-Rives J., Jorgensen W.L. // J. Phys. Chem. B. 2001. **105**. P. 6474.
13. Hay P.J., Wadt W.R. // J. Chem. Phys. 1985. **82**. P. 270.
14. Bagshaw C.R., Trentham D.R., Wolcott R.G., Boyer P.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. **72**. P. 2592.

Поступила в печать 23.11.06

THE ROLE OF MAGNESIUM IN THE HYDROLYSIS REACTION OF TRIPHOSPHATES IN AQUEOUS SOLUTION: QUANTUM MECHANICAL – MOLECULAR MECHANICAL SIMULATIONS

A.V. Rogov, B.L. Grigorenko, A.V. Bochenkova, A.A. Granovskii, A.V. Nemukhin

(Division of Physical Chemistry)

The mechanism of the hydrolysis reaction of the unprotonated methyl triphosphate (MTP) ester resulting in the methyl diphosphate (MDP) and inorganic phosphate (Pi) in water clusters in presence and absence of magnesium cation has been modeled. The effective fragment potential based quantum mechanical – molecular mechanical (QM/MM) approach has been applied in the simulations. Density functional theory (B3LYP) approximation has been used for calculations of energies and energy derivatives in the quantum subsystem (MTP, reacting water molecules and Mg^{2+}) while water-water interactions have been described with the TIP3P model potential. It is shown that the minimum energy path for the reaction $\text{MTP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MDP} + \text{Pi}$ is consistent with the two-step dissociative-type process in the absence of Mg^{2+} , and the single-step transformation in the presence of Mg^{2+} .