

УДК 517.15

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИМЕРНОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА ФОСФОДИЭСТЕРАЗАМИ

Б.Л. Григоренко, М.А. Князева, И.В. Поляков, А.В. Немухин

(кафедра физической химии; e-mail: bell_grig@yahoo.com)

Методом квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) рассчитаны и проанализированы структуры интермедиатов реакции ферментативного гидролиза циклического димерного гуанозинмонофосфата. По результатам моделирования предложены возможные механизмы превращений в активном центре каталитических доменов фосфодиэстераз.

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

Механизмы химических превращений в активных центрах ферментов фосфодиэстераз, регулирующих концентрацию циклических форм мономерного (с-GMP) и димерного (с-di-GMP) гуанозинмонофосфата, к настоящему времени не являются установленными. Катализируемые ферментами реакции гидролиза с-GMP и с-di-GMP приводят к раскрытию циклических форм молекул субстратов с разрывом связи фосфор–кислород, но детали этих преобразований остаются спорными. Обычно основная роль отводится двухзарядным катионам металлов (Mg, Mn, Zn), присутствующим в активных центрах в виде гомо- или гетеродимеров. Предполагается, что каталитическая молекула воды, идентифицируемая в кристаллографических структурах ферментов, активируется металлическим центром и

ближайшими заряженными аминокислотными остатками, что приводит к генерации активного гидроксил-аниона OH^- , который в свою очередь осуществляет нуклеофильную атаку на атом фосфора субстрата [1–4].

В настоящей работе мы анализируем возможные механизмы реакции гидролиза с-di-GMP фосфодиэстеразами с каталитическим EAL-доменом (названным по признаку консервативной триады аминокислот Glu, Ala, Leu). На рис. 1 показано расположение субстрата в активном центре EAL-домена белка BlrP1 из организма *Klebsiella pneumoniae*. Используются согласованные данные, представленные в кристаллографической структуре PDB ID 3GG0 [1], а также полученные ранее [5] по расчетам методом квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ).

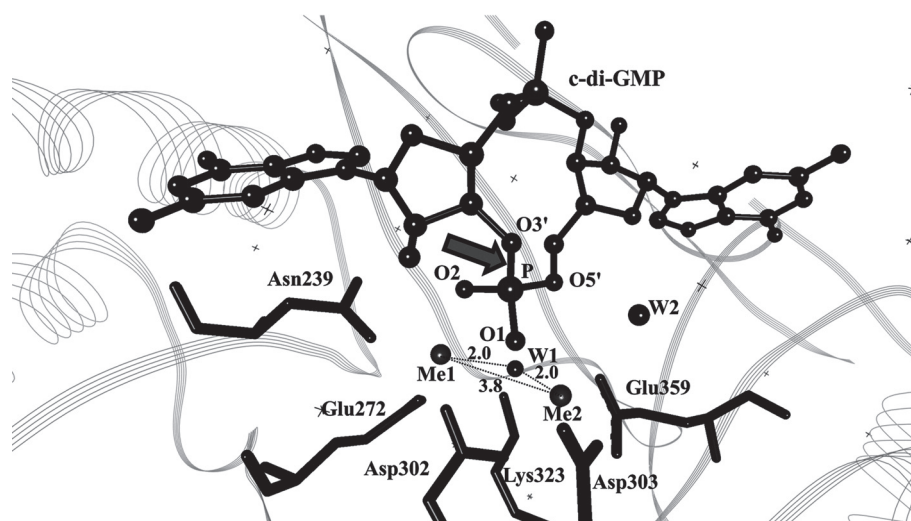


Рис. 1. Фрагмент активного центра EAL-домена из белка BlrP1, демонстрирующий расположение субстрата с-di-GMP и ближайших аминокислотных остатков. Положение разрываемой при гидролизе связи фосфор–кислород P–O3' отмечено стрелкой. Показаны только тяжелые атомы. Расстояния приведены в Å

В активном центре находятся два катиона металла – Me1 и Me2 (рис. 1); фермент является активным, если $Me = Mg$ или $Me = Mn$; замещение на кальций приводит к потере активности. Фосфатная группа субстрата в фермент-субстратном комплексе расположена близко к металлическому центру. Рядом с катионами металла находится также молекула воды, атом кислорода которой на рис. 1 обозначен W1. Расстояния от W1 до катионов металла достаточно близки и составляют ~ 2 Å. Авторы исследований кристаллов EAL-домена фосфодиэстераз с заместителями, блокирующими быстрый гидролиз c-di-GMP, предполагают, что именно из этой молекулы воды образуется гидроксил-анион [1, 2]. Другая молекула воды (W2), идентифицированная в кристаллографической структуре, предположительно assisteрует процессу гидролиза.

Важно отметить, что экспериментальные структурные данные [1], позволяющие проанализировать геометрические конфигурации активного центра, и результаты расчетов структуры фермент-субстратного комплекса методом КМ/ММ [5] дают полностью согласующиеся картины строения молекулярной системы. Как в предыдущих [5], так и в настоящих расчетах мы применяли вариант метода КМ/ММ с конформационно-подвижными эффективными фрагментами [6, 7], который позволяет получать результаты, достаточно близкие к полному квантовому описанию всей системы. Вычисление значений энергии и силы в КМ-части проводили в приближении теории функционала электронной плотности в варианте PBE0/6-31G*; для описания ММ-части использовалось силовое поле

AMBER. В КМ-подсистему были включены все атомы субстрата c-di-GMP, катионы магния в качестве металлических частиц (Me1 и Me2), боковые цепи Asp302, Asp303 и Glu359.

На первом этапе данной работы был рассмотрен механизм гидролиза c-di-GMP, предполагающий нуклеофильную атаку гидроксил-анионом. Следуя рекомендациям исследования [3], в котором утверждалось, что гидроксил-анион может быть зафиксирован в активном центре фосфодиэстеразы, гидролизующей мономерный циклический аденозинмонофосфат, мы предположили, что частица W1 между катионами металла относится к гидроксил-аниону. В другой теоретической работе [4], также относящейся к фосфодиэстеразам, гидролизующим мономерные циклические нуклеозидмонофосфаты, процесс генерации гидроксил-аниона был рассмотрен с использованием методов квантовой химии, и подобное расположение гидроксил-аниона между катионами металла было обосновано.

На рис. 2 проиллюстрирована равновесная геометрическая конфигурация модельной системы, полученная при расчетах методом КМ/ММ, с гидроксил-анионом, расположенным между катионами магния. Расстояние от атома кислорода гидроксил-аниона до атома фосфора ($2,52$ Å) представляется благоприятным для реакции. Используя это расстояние в качестве координаты реакции, мы рассчитывали сечение поверхности потенциальной энергии, оптимизируя все остальные геометрические параметры модельной системы методом КМ/ММ. На начальном участке от точки минимальной энергии (рис. 2) рельеф поверхности был достаточно пологим, но при расстояниях

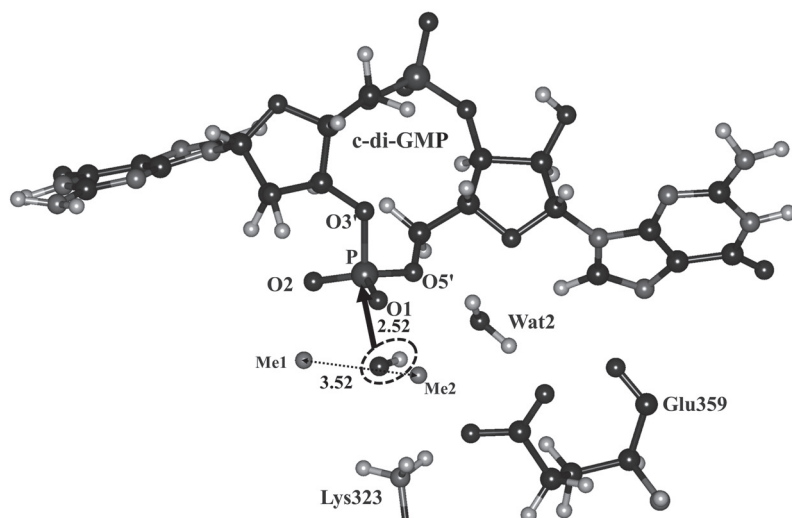


Рис. 2. Иллюстрация механизма гидролиза c-di-GMP фосфодиэстеразами с EAL-доменом, предусматривающего атаку гидроксил-аниона. Расстояния приведены в Å

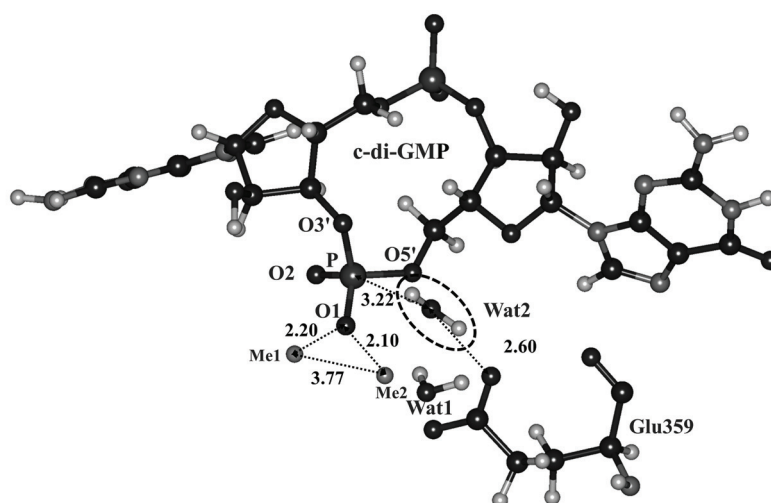


Рис. 3. Иллюстрация механизма гидролиза *c*-di-GMP фосфодиэстеразами с EAL-доменом, предусматривающего участие аминокислотного остатка глутаминовой кислоты (здесь, Glu359). Расстояния приведены в Å

$< 2 \text{ \AA}$ наблюдался резкий рост энергии с величинами, явно превышающими разумные энергии активации ферментативной реакции. С качественной стороны причины такого роста энергии можно понять, если заметить, что катионы металла находятся достаточно близко друг к другу и к кислороду гидроксил-аниона. Таким образом, распределение зарядов не способствует подобному механизму.

Другой возможный сценарий процесса гидролиза *c*-di-GMP фосфодиэстеразами с EAL-доменом сформулирован в качестве гипотезы в работе [8]. Авторы исследовали белок RocR из организма *Pseudomonas aeruginosa*, кристаллографическая структура которого (PDB ID 2SY8) показывает наличие одного катиона металла (Mg) в активном центре фосфодиэстеразы. Основные аминокислотные остатки в активном центре, показанные на рис. 1, идентифицируются в структуре PDB ID 2SY8. Экспериментально показано [8], что мутация остатка глутаминовой кислоты (Glu359 на рис. 1) на Ala, Cys, Asn, Asp практически полностью снижает активность фермента. Соответственно, высказано предположение, что именно данный аминокислотный остаток (Glu359 на рис. 1) ответственен за гидролиз.

На рис. 3 показана рассчитанная КМ/ММ-методом равновесная геометрическая конфигурация модельной системы, для которой не предполагается наличия свободного гидроксил-аниона. Молекула воды Wat1 располагается вблизи металлического центра (ее атом кислорода обозначен как W1 на рис. 1). Видно, что расстояние Me1–Me2 увеличено по сравнению с конформацией, показанной на рис. 2, что согласуется с отсутствием между катионами металла отрицательно заряжен-

ной частицы (ОН⁻). Кроме того, атом кислорода O1 фосфатной группы ближе к катионам металла, чем в случае гипотетического механизма с гидроксил-анионом (рис. 2).

Роль каталитической молекулы воды в данном сценарии отводится Wat2 (рис. 3). Расстояния от атома кислорода этой молекулы до атома фосфора (3,22 Å) и до кислорода Glu359 (2,60 Å) совместимы с реакцией, при которой протон Wat2 переходит на Glu359, а образующийся гидроксил-анион присоединяется к атому фосфора. Качественно механизм реакции раскрытия цикла похож на механизм гидролиза *c*-GMP и *c*-di-GMP в водном растворе [9, 10]. В этих системах при приближении молекулы воды к фосфатному центру образуются интермедиаты с пентакоординированным фосфором с передачей протона от воды на акцептор по сетке водородных связей. Последующее перераспределение протонов по цепи участников системы водородных связей обеспечивает разрыв химической связи фосфор–кислород и формирование продуктов реакции гидролиза.

Для начального сегмента реакционного пути для гидролиза *c*-di-GMP EAL-доменом выполнены расчеты поверхности потенциальной энергии методом КМ/ММ. Координатой реакции служило расстояние между атомом кислорода Wat2 и атомом фосфора. При последовательном уменьшении этого расстояния от значения 3,22 Å в точке минимальной энергии (рис. 3) и оптимизации всех остальных геометрических параметров модельной системы действительно наблюдался перенос протона от Wat2 на остаток Glu359. С активационным барьером 11 ккал/моль образовывался интермедиат с пентакоординированным фосфором.

Таким образом, по результатам расчетов методом КМ/ММ предлагается дискриминировать один из часто обсуждаемых сценариев для механизма реакции гидролиза c-di-GMP фосфодиэстеразами с EAL-доменом, предусматривающий наличие свободного гидроксил-аниона в системе. Более реалистичным представляется реакционный

путь, при котором остаток глутаминовой кислоты (Glu359 на рис. 1–3) активизирует молекулу воды, не связанную с металлическим центром. Авторы выражают благодарность сотрудникам суперкомпьютерных центров МГУ имени М.В. Ломоносова и РАН за возможность использовать вычислительные ресурсы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barends T. R., Hartmann E., Griese J. J., et al. // Nature (London). 2009. Vol. 459. P. 1015.
2. Tchigvintsev A., Xu X., Singer A., et al. // Mol. Biol. 2010. Vol. 402. P. 524.
3. Zhan C.-G., Zheng F. // J. Am. Chem. Soc. 2001. Vol. 123. P. 2835.
4. Salter E.A., Wierzbicki A. // J. Phys. Chem. B. 2007. Vol. 111. P. 4547.
5. Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Хренова М.Г. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2014. Т. 55. С. 3.
6. Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Topol I.A., et al. // J. Phys. Chem. A. 2002. Vol. 106. P. 10663.
7. Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Topol I.A., et al. // J. Comput. Chem. 2003. Vol. 24. P. 1410.
8. Rao F., Yang Y., Qi Y., et al. // J. Bacteriol. 2008. Vol. 190. P. 3622.
9. Андрийченко Н.Н., Хренова М.Г., Немухин А.В. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. 52. С. 277.
10. Morozov D., Khrenova M., Andrijchenko N., et al. // Comput. Theor. Chem. 2012. Vol. 983. P. 88.

Поступила в редакцию 01.08.15

MODELING HYDROLYSIS OF THE CYCLIC DIMERIC GUANOSINE MONOPHOSPHATE BY PHOSPHODIESTERASES

B.L. Grigorenko, M.A. Knyazeva, I.V. Plyakov, A.V. Nemukhin

(Division of Physical Chemistry)

The structures of intermediates of the reaction of enzymatic hydrolysis of the cyclic dimeric guanosine monophosphate are computed by using the quantum mechanics – molecular mechanics (QM/MM) method. Tentative mechanisms of transformations at the active site of catalytic domains of phosphodiesterases are suggested by the results of simulations.

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

Сведения об авторах: Григоренко Белла Львововна – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ, докт. физ.-матем. наук (bell_grig@yahoo.com); Князева Марина Александровна – науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук (marina.a.knyazeva@yandex.ru); Поляков Игорь Владимович – науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук (polyakoviv@gmail.com); Немухин Александр Владимирович – профессор кафедры физической химии химического факультета МГУ, лаборатория химической кибернетики, докт. хим. наук (anemukhin@yahoo.com).