

УДК 577.15

©Коллектив авторов

## МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ КОМБИНИРОВАННЫМИ МЕТОДАМИ КВАНТОВОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ

*А.В.Немухин, Б.Л.Григоренко, Е.М.Епифановский, А.В.Рогов*

Химический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы;  
тел.: (095) 939-10-96, факс: (095) 939-02-83, эл.почта: anem@lcc.chem.msu.ru

Разработан и доведен до программной реализации оригинальный вариант комбинированного метода квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ), предназначенный для моделирования химических реакций в белковом окружении, в частности, для описания механизмов ферментативных реакций. Метод основан на теории потенциалов эффективных фрагментов и предполагает разделение ММ-подсистемы на совокупность гибких цепей малых фрагментов, взаимодействующих с квантовой подсистемой и между собой. Созданная компьютерная программа метода КМ/ММ позволяет находить стационарные точки на сложных многомерных потенциальных поверхностях систем, состоящих из нескольких сотен атомов. В приложениях рассмотрены реакции гидролиза пептидных связей, катализируемые сериновыми протеазами, реакции передачи протонов по ориентированным сетям водородных связей в ионных каналах.

**Ключевые слова:** молекулярное моделирование, биоинформатика, ферментативные реакции

**ВВЕДЕНИЕ.** Молекулярное моделирование становится все более распространенным инструментом при изучении биохимических и биофизических явлений. Применение компьютерных технологий может оказать заметную поддержку экспериментальным работам, позволяя существенно снизить временные и материальные затраты, в частности, на всестороннее исследование перспективных лекарственных веществ. До последнего времени моделирование ферментативного катализа, представляющего важнейшую компоненту биомолекулярных процессов, было практически невозможно по следующим причинам. Методы молекулярной механики (ММ), активно применяемые, например, при моделировании пространственных структур биомолекул или в молекулярном докинге, не могут характеризовать разрыв и образование химических связей, т.к. параметры силовых полей подобраны по свойствам реперных систем вблизи равновесных конфигураций. Применение методов квантовой механики (КМ), которые в состоянии описывать изменения в электронной структуре участников химической реакции, ограничено размерами молекулярной системы. Вряд ли в ближайшее время следует ожидать надежных результатов полностью квантового анализа для систем, включающих более 50-100 атомов, и даже в этом случае необходимо учитывать влияние достаточно протяженного молекулярного окружения на выделенный небольшой фрагмент системы, анализируемый на уровне КМ. Надежды на континуальные модели конденсированной среды, рассматривающие, например, белковое окружение как однородный диэлектрик, позволяют получить лишь качественные заключения, но не дают возможность получения количественных результатов.

Определенный прорыв в развитии моделирования ферментативного катализа на молекулярном уровне связан с внедрением т.н. комбинированных методов квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ). Согласно основной идее этого подхода [1], часть белковой системы, в которой происходят перераспределения химических связей, включается в квантовую подсистему, а энергии и силы в ней рассчитываются по квантовой химии. Большинство атомов, окружающих эту выделенную центральную часть, относится к молекулярно-механической подсистеме. Предполагается, что приближения КМ/ММ

должны учитывать конформационные изменения в белковой матрице, сопровождающие химическую реакцию и, в то же время, учитывать влияние конформационных изменений в большой системе на энергетический рельеф пути реакции.

При подобном механистическом подходе к моделированию химических реакций основная роль отводится поверхности потенциальной энергии (ППЭ). В приближениях КМ/ММ энергия каждой точки на ППЭ складывается из энергии квантовой части в поле ММ-подсистемы и молекулярно-механической энергии. Анализ стационарных точек на данной композитной ППЭ, т.е. геометрических конфигураций локальных минимумов, отвечающих реагентам, продуктам, возможным интермедиатам, а также седловых точек, через которые происходят переходы между минимумами, составляет предмет исследования механизма реакции. Особое внимание уделяется расчетам энергетических барьеров на пути от реагентов к продуктам. Переход к экспериментально значимым величинам, таким как константы скорости реакций, осуществляется, как правило, в рамках теории переходных состояний. Данная работа относится к именно этому направлению, позволяющему рассчитывать точки на ППЭ для больших молекулярных систем, определять геометрические конфигурации стационарных точек и анализировать химические превращения и конформационные изменения вдоль путей минимальной энергии.

**МЕТОДИКА.** Известно несколько компьютерных реализаций метода КМ/ММ, различающихся способом учета взаимодействия КМ- и ММ-подсистем. Наша оригинальная разработка базируется на теории эффективных фрагментов (ЭФ) [2], позволяющей достаточно точно подсчитывать вклады в квантовый гамильтониан КМ-части от жестких фрагментов ММ-подсистемы и оценивать обратное влияние квантовой подсистемы на ММ-часть. В исходном варианте метод КМ/ММ(ЭФ) также применялся для моделирования свойств ферментативных систем [3, 4], однако, только в нашей реализации [5-7] можно обеспечить достаточную гибкость молекулярно-механического окружения.

Рисунок 1 иллюстрирует методику разбиения системы на квантовую и молекулярно-механическую части.

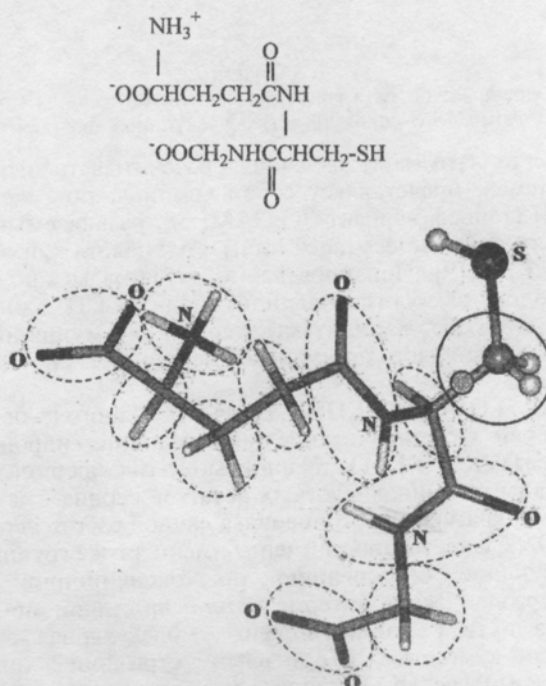


Рисунок 1.

Молекула глутатиона и её подразделение на квантовую часть (представление шарами и стержнями) и ММ-совокупность эффективных фрагментов (стержни):  $\text{CO}_2^-$ ,  $\text{CH}$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CONH}$ . Каждый эффективный фрагмент для наглядности окружен пунктирной линией. Буферный фрагмент принадлежащий и КМ-, и ММ-подсистеме, окружен непрерывной линией. В буферном фрагменте кружком с орнаментом показано положение связующего атома водорода.

Показана одна из конформаций молекулы глутатиона с отнесением к КМ-подсистеме реакционной сульфгидрильной группы SH и ближайшего "буферного" фрагмента CH<sub>3</sub>. Остальная часть молекулы представлена совокупностью малых эффективных фрагментов (CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, CH, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, CH<sub>2</sub>, CONH), которые взаимодействуют с квантовой частью через вклады в гамилтониан, но взаимодействуют между собой посредством молекулярно-механических силовых полей. В рамках подобной модели можно, в частности, моделировать реакции тушения свободных радикалов глутатионом.

Другой пример показан на рисунке 2, на котором изображена молекула модельного субстрата для реакции гидролиза пептидной связи трипсином. Предполагается описание молекулярных групп ближайшего окружения C-N (представление шарами и стержнями) уравнениями квантовой химии, в то время как остальная часть (представление линиями) отнесена к ММ-подсистеме, рассматриваемой совокупностью эффективных фрагментов. На рисунках 1 и 2 показаны положения связывающих (или замыкающих) атомов водорода, которые располагаются вдоль ковалентных связей, через которые проходит КМ/ММ граница [6, 7].

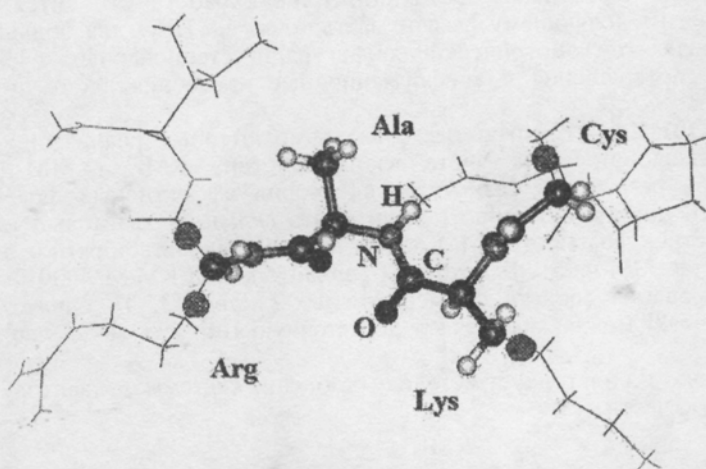


Рисунок 2.

Подразделение молекулы субстрата трипсина на квантовую часть (представление шарами и стержнями) и ММ-совокупность эффективных фрагментов (линии).

Компьютерная программа, позволяющая рассчитывать энергии и силы в подобных молекулярных системах, представляет собой комбинацию пакета программ квантовой химии GAMESS [8] (точнее, вариант PC GAMESS, развиваемый А.А.Грановским: URL <http://lcc.chem.msu.ru/gran/games/index.html>) и пакета программ молекулярного моделирования TINKER [9]. При проведении расчетов можно пользоваться квантово-химическими методом самосогласованного поля (ССП), многоконfigurационным вариантом СПП, а также вариантами теории возмущений Меллера-Плессе. В молекулярно-механической части доступны общепринятые системы параметров AMBER, CHARMM, OPLSAA.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В качестве одного из первых применений новой методики был выбран каталитический цикл реакции гидролиза пептидных связей сериновыми протеазами [10]. Особенностью этих ферментов является наличие каталитической триады из аминокислотных остатков серина, гистидина и аспарагиновой кислоты. Следуя номенклатуре химотрипсина, в данной работе используются обозначения: Ser195, His57, Asp102. Существенное значение имеют также группы NH остатков Gly193 и Ser195, способствующие образованию т.н. оксианионной дыры, позволяющей стабилизировать тетраэдрические интермедиаты и на стадии ацилирования, и на стадии деацилирования. На пути реакции гидролиза молекулярная система проходит через фермент-субстратный комплекс (ES), первый тетраэдрический интермедиат (INT1), фермент-ацильный комплекс (EA), второй тетраэдрический интермедиат (INT2) [10]. Каждой структуре отвечает область локального минимума на потенциальной поверхности.

На рисунке 3 представлена схема разделения системы трипсин-субстрат на КМ- и ММ-части. В качестве начальных координат атомов был взят комплекс трипсин-ингибитор BPTI (код 2PTC из банка данных белковых структур [11]). Из молекулы ингибитора был выделен участок (рис.2), моделирующий субстрат.



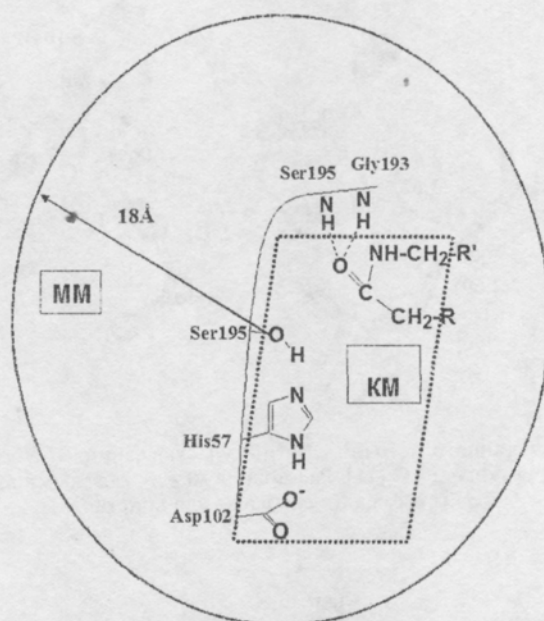


Рисунок 3.

Разделение комплекса трипсин-субстрат на квантовую (КМ) и молекулярно-механическую (ММ) части.

В квантовую область (рис.3) были включены фрагменты каталитической триады и центральная часть модельного субстрата около разрываемой связи. ММ подсистема включала примерно 750 атомов в пределах 18 Å от кислородного центра серина каталитической триады. Расчеты в квантовой области при локализации точек минимумов на потенциальной поверхности были проведены в приближении ССП с базисом 6-31G. Параметры молекулярно-механической части соответствовали библиотеке AMBER [12]. Энергии в найденных стационарных точках пересчитывались в квантово-химических приближениях более высокого уровня, т.е. по теории возмущений с расширенными базисами.

На рисунке 4 показана суперпозиция рассчитанного методом КМ/ММ участка фермент-субстратного комплекса и рентгеновской структуры фермента с ингибитором 2РТС. Видно, что ключевые для реакционного центра расстояния воспроизводятся методом КМ/ММ достаточно хорошо.

Для выбранной системы (рис.3) были найдены равновесные геометрические конфигурации как точки минимумов на ППЭ, отвечающие характерным структурам на пути реакций всего каталитического цикла (ES, INT, EA). Было показано, что результаты моделирования методом КМ/ММ полностью соответствуют химическим представлениям о механизме ферментативного катализа сериновыми протеазами. В качестве иллюстрации на рисунках 5 и 6 изображены структуры, относящиеся к лимитирующей стадии реакции, т.е. переходу от фермент-субстратного комплекса (ES) к первому тетраэдрическому интермедиату (INT1). Показаны как химические (верхние части рисунков), так и молекулярные (нижние части) структуры. На данной стадии происходит перенос протона от остатка серина Ser195 к гистидину His57, сопровождающийся образованием ковалентной связи O-C серин-субстрат.

В таблице 1 приведены вычисленные в приближении MP2/6-31+G\*\*/RHF/6-31G в квантовой части и при использовании силовых полей AMBER в молекулярно-механической части разности энергий между конфигурацией, отвечающей барьеру (B) при переходе ES → INT1, и исходной точкой (ES), а также между INT1 и B. Результаты для исходной системы (вторая строка) показывают, что энергетический эффект данной стадии оценивается как близкий к нулю, в то время как энергетический барьер составляет примерно 13 ккал/моль. В таблице 1 также указаны разности энергий, полученные для "мутированных" систем, в которых формальные заряды на остатках аргинина и лизина субстрата или на остатке аспарагиновой кислоты фермента считали равными нулю. Эти результаты демонстрируют важность электростатических вкладов в энергетику ферментативных реакций.

В еще одном приложении новым методом КМ/ММ было выполнено моделирование реакций передачи протонов по ориентированным сетям водородных связей в белковом

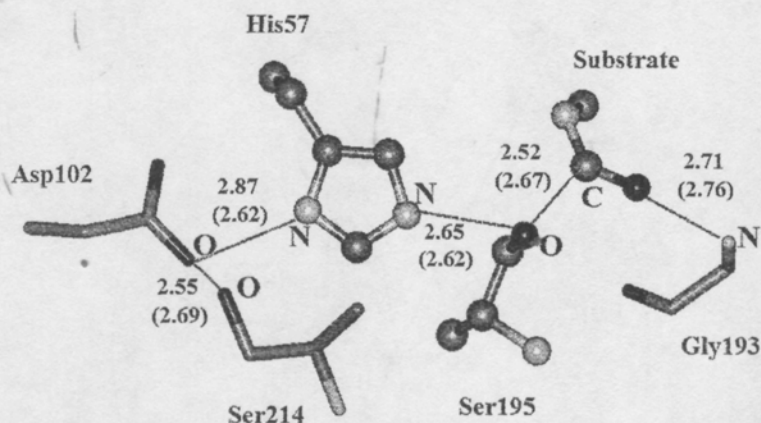


Рисунок 4

Суперпозиция рассчитанного методом КМ/ММ участка фермент-субстратного комплекса и рентгеновской структуры 2PTC [11]. Расстояния между тяжелыми атомами приведены в ангстремах (в скобках - для кристалла).

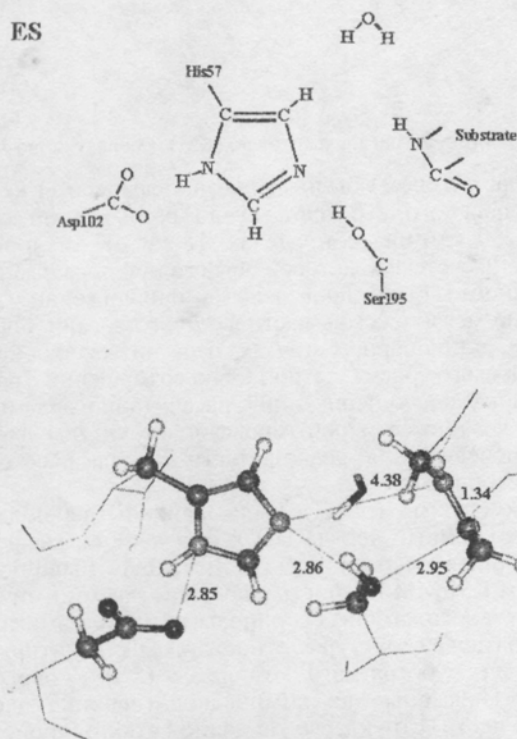


Рисунок 5.

Рассчитанная конфигурация фермент-субстратного комплекса (расстояния в ангстремах).

окружении. На рисунке 7 показана одна из таких систем, описывающая участки канала мембранного белка M2 [13]. Передача протона осуществляется через последовательность молекул воды в полости канала, и очевидным препятствием на этом пути является наличие аминокислотного остатка гистидина.

Результаты моделирования методом КМ/ММ [14] показали, что рельеф поверхности потенциальной энергии для перемещения протона вдоль ориентированных цепей молекул воды, прикрепленных к молекулярным стенкам, оказывается настолько пологим, что реориентация молекул воды позволяет избежать энергетических затрат на перегруппировку химических и водородных связей. Единственный барьер на пути протона до концевой группы Asp возникает из-за необходимости разрыва связи Ne-H в His, причем расчетные оценки этой величины приводят к значениям, не превышающим 5 ккал/моль.

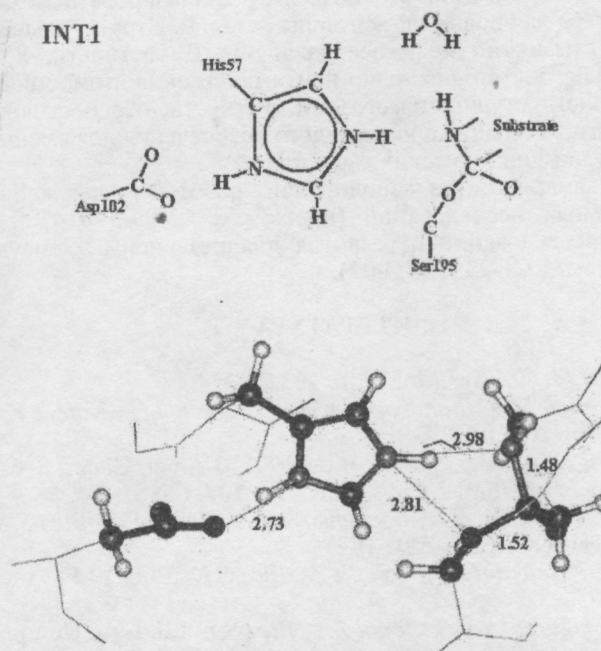


Рисунок 6.

Рассчитанная конфигурация первого тетраэдрического интермедиата (расстояния в ангстремах).

Таблица 1. Разности энергий (ккал/моль) между конфигурацией, отвечающей барьеру (В) при переходе ES → INT1, и исходной точкой (ES), а также между INT1 и В, вычисленные в приближении MP2/6-31+G\*\*/RHF/6-31G в квантовой части и при использовании силовых полей AMBER в молекулярно-механической части. Приведены данные для исходной системы и для "мутированных" систем, в которых формальные заряды на остатках аргинина и лизина субстрата или на остатке аспарагиновой кислоты фермента полагались равными нулю.

Модель	ES → В	В → INT1
Исходная система	12.8	-12.8
Мутация {Q(Arg)=0, Q(Lys)=0}	17.5	-14.4
Мутация {Q(Asp102)=0}	25.1	-7.5

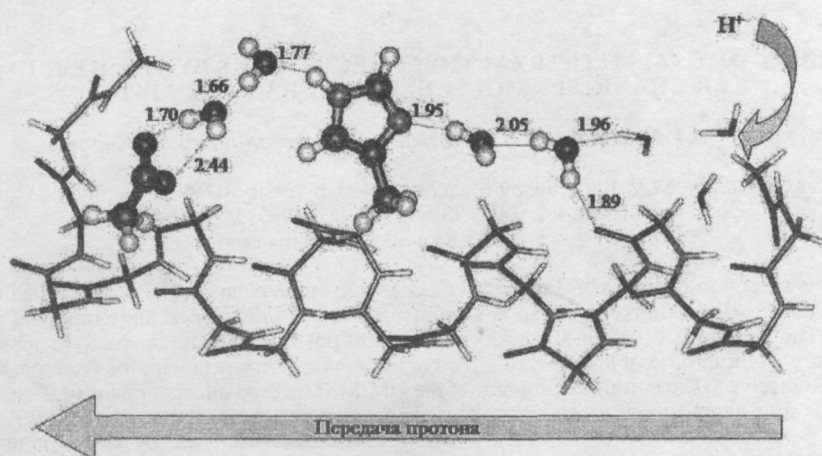


Рисунок 7.

Молекулярная система, участвующая в передаче протона в полости канала M2.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** С помощью нового комбинированного метода квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) можно моделировать свойства и химические реакции в любых белковых системах. Наибольший интерес представляет построение энергетических



профилей ферментативных реакций, что позволяет анализировать механизмы реакций ферментативного катализа на уровне элементарных стадий. Структурные задачи являются технически более простыми, но не менее важными. В частности, с использованием методики КМ/ММ можно достаточно точно найти положения атомов водорода в белках, исследованных рентгеноструктурными методами. В качестве перспективного направления на будущее представляется создание программного обеспечения для смешанных квантово-классических молекулярно-динамических расчетов.

При написании данной статьи использованы работы, поддержанные Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 02-03-39014) и Американским фондом гражданских исследований и развития для независимых государств бывшего Советского Союза (проект RC1-2350-MO-02).

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Warshel A., Levitt M. (1976) *J.Mol.Biol.*, **103**, 227.
- 2 Gordon M.S., Freitag M.A., Bandyopadhyay P., Jensen J.H., Kairys V., Stevens W.J. (2001) *J.Phys.Chem.A.*, **105**, 293.
- 3 Wladkowski B.D., Krauss M., Stevens W.J. (1995) *J.Amer. Chem. Soc.*, **117**, 10537.
- 4 Kairys V., Jensen J.H. (2000) *J. Phys. Chem.A.*, **104**, 6656.
- 5 Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Bochenkova A.V., Topol I.A., Burt S.K. (2002) *J. Molec. Struct. (THEOCHEM)*, **581**, 167.
- 6 Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Topol I.A., Burt S.K. (2002) *J.Phys. Chem.A*, **106**, 10663.
- 7 Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Topol I.A., Burt S.K. (2003) *J. Comput. Chem.*, **24**, 1410.
- 8 Schmidt M.W., Baldridge K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S.J., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. (1993) *J. Comput. Chem.*, **14**, 1347.
- 9 Ponder J.W., Richards F.M. (1987) *J. Comput. Chem.*, **8**, 1016.
- 10 Hedstrom L. (2002) *Chem. Rev.*, **102**, 4501.
- 11 Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.H., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000) *Nucl. Acids Res.*, **28**, 235-242.
- 12 Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell, J.W., Kollman, P.A. (1995) *J. Amer. Chem. Soc.*, **117**, 5179-5197.
- 13 Schweighofer K.J., Pohorille A. (2000) *Biophys.J.*, **78**, 150-163.
- 14 Nemukhin A.V., Topol I.A., Grigorenko B.L., Burt S.K. (2002) *J.Phys. Chem. B.*, **107**, 2958-2965.

### MODELING OF ENZYMATIC REACTIONS MECHANISMS BY THE HYBRID QUANTUM MECHANICAL - MOLECULAR MECHANICAL METHODS

*A.V.Nemukhin, B.L.Grigorenko, E.M.Epifanovsky, A.V.Rogov*

School of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992, Leninskie Gory, Moscow, Russia; tel: (095) 939-10-96; fax: (095) 939-02-83;  
e-mail: anem@lcc.chem.msu.ru

A new version of the hybrid quantum mechanical - molecular mechanical (QM/MM) method for modeling chemical reactions in protein environments has been developed and employed as a computer program. The method is based on the effective fragment potential technique and assumes partitioning of the MM subsystem into flexible chains of effective fragments interacting with the quantum subsystem and between themselves. The computer program of the QM/MM method allows one to locate stationary points on complex multidimensional potential surfaces for the systems composed of several hundred atoms. The applications include the reaction of hydrolysis of peptide bonds catalyzed by serine proteases, the reactions of proton transfer along oriented hydrogen bonding networks.

**Key words:** molecular modeling, bioinformatics, enzymatic reactions