

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.25

**МЕХАНИЗМ ДЕПРОТОНИРОВАНИЯ АМИНОГРУППЫ ГЛУТАМАТА
ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С N-АЦЕТИЛГЛУТАМАТСИНТАЗОЙ****Анастасия Романовна Блинова^{1,2}, Анна Михайловна Кулакова^{1,2},
Белла Людвиговна Григоренко^{1,2}**¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия**Автор, ответственный за переписку:** Анастасия Романовна Блинова,
blinova.lcc@gmail.com

Аннотация: Gcn5-связанные N-ацетилтрансферазы катализируют перенос ацетильной группы на первичную аминогруппу широкого класса субстратов. Депротонирование аминогруппы при связывании с ферментом необходимо для активации нуклеофильной атаки на субстрат. С помощью методов молекулярного моделирования и квантовой химии рассмотрен процесс связывания глутамата с N-ацетилглутаматсинтазой. Показано, что депротонирование первичной аминогруппы глутамата происходит по мере его встраивания в активный центр фермента при участии боковой цепи остатка аспартата.

Ключевые слова: ацетилтрансферазы, протонированная форма, молекулярная динамика, КМ/ММ, энергия Гиббса

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-4-312-318

Финансирование. Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 23-13-00011) и выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Для цитирования: Блинова А.Р., Кулакова А.М., Григоренко Б.Л. Механизм депротонирования аминогруппы глутамата при связывании с N-ацетилглутаматсинтазой // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 4. С. 312–318.

ORIGINAL ARTICLE

**MECHANISM OF DEPROTONATION OF THE AMINO GROUP OF
GLUTAMATE UPON BINDING TO N-ACETYLGLUTAMATE SYNTHASE****Anastasia R. Blinova^{1,2}, Anna M. Kulakova^{1,2}, Bella L. Grigorenko^{1,2}**¹ Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia² N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia**Corresponding Author:** Blinova A.R., blinova.lcc@gmail.com

Abstract. Gcn5-related N-acetyltransferases catalyze the transfer of an acetyl group to a primary amino group of a wide class of substrates. Protonation of the amino group upon binding to the enzyme is necessary to activate the nucleophilic attack on the substrate. The process of glutamate binding to N-acetylglutamate synthase is considered

using molecular modeling and quantum chemistry methods. It has been shown that deprotonation of the primary amino group of glutamate occurs upon binding to the active site of the enzyme with the participation of the side chain of the aspartate residue.

Keywords: acetyltransferases, protonation state, molecular dynamics, QM/MM, Gibbs energy.

Financial Support. The work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-13-00011) and was performed using the equipment of the Center for Collective Use of Ultra-high-performance Computing Resources of Lomonosov Moscow State University.

For citation: Blinova A.R., Kulakova A.M., Grigorenko B.L. Mechanism of Deprotonation of the Amino Group of Glutamate Upon Binding to N-Acetylglutamate Synthase // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 4. S. 312–318.

Механизм ферментативного катализа многих белков основан на серии кислотно-основных реакций, включающих перенос протона [1–3]. От протонирования отдельного атома активного сайта, кофермента и/или субстрата может зависеть стабильность структуры, изменение ее конформационного состояния и каталитическая активность [4]. Таким образом, для достоверного описания молекулярного механизма ферментативных реакций необходимо установить структуру фермент-субстратного комплекса с точностью до атомов водорода. Однако разрешение большинства кристаллографических структур составляет 1,5–2,5 Å, что не позволяет определить состояние протонированности ключевых ионогенных групп. В связи с этим большую актуальность приобретают методы молекулярного моделирования и квантовой химии, позволяющие рассмотреть поведение систем в протонированной и непротонированной формах *in silico* и сделать вывод о наиболее вероятном варианте *in vivo*.

Проблема протонирования/депротонирования субстрата является ключевой при изучении механизма катализа Gcn5-связанных N-ацетилтрансфераз (GNAT). Они представляют собой огромное семейство ферментов, состоящее более чем из трехсот тысяч ацетилтрансфераз, которые катализируют перенос ацетильной груп-

пы с ацетил-КоА на первичную аминогруппу химически различных субстратов: от низкомолекулярных соединений до белков-гистонов [5]. В литературе [6] для GNAT-белков предполагается механизм прямой S_N2 -атаки первичной аминогруппы на карбонильный атом углерода ацетил-КоА (рис. 1). Но для того, чтобы нуклеофильная атака осуществилась, аминогруппа субстрата не должна быть заряжена и с учетом высокого значения ее pK_a (~10) в GNAT-белках вблизи активного центра должен существовать некий аминокислотный остаток, который может выступить в роли основания. Для ряда GNAT-белков такое основание действительно обнаружено (Glu, Asp или His) [7–10]. Описаны случаи, когда депротонирование происходит посредством взаимодействия с двумя аминокислотами [11]. Однако для многих GNAT-белков необходимое основание так и не было установлено. Для них предложены альтернативные пути попадания в активный центр депротонированного субстрата:

1) субстрат может быть депротонирован посредством взаимодействия с упорядоченным кластером воды в активном центре [12];

2) белок может быть селективен по отношению к непротонированной форме субстрата за счет концентрации на входе в активный центр положительно заряженных аминокислот [13];

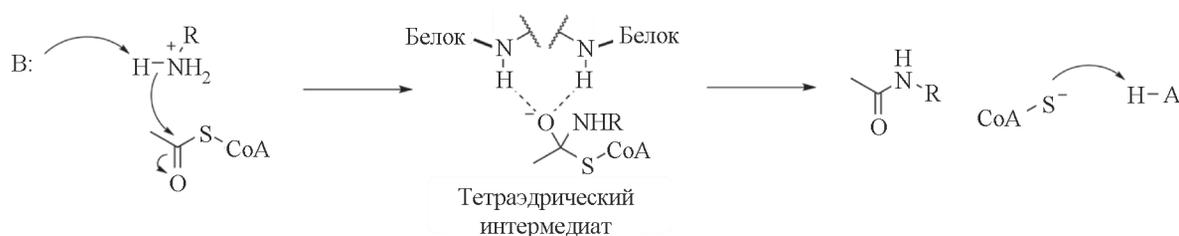


Рис. 1. Общая схема катализируемой реакции в GNAT-белках

3) субстрат может иметь более низкое значение pK_a , чем то, которое обычно характерно для ацетил-акцепторов GNAT [14].

В настоящей работе на примере N-ацетил-глутаматсинтазы (NAGS) из бактерии *Neisseria gonorrhoeae* мы предлагаем еще одну стратегию попадания непротонированного субстрата (глутамата для NAGS) в активный центр фермента: субстрат может быть депротонирован аминокислотой-основанием не в активном центре непосредственно, а в локальном сайте связывания на пути к нему. Мы обосновываем наш подход с помощью методов молекулярного моделирования и квантовой химии.

Методы расчета

Для моделирования методом молекулярной динамики была выбрана система, состоящая из каталитического N-ацетилтрансферазного домена одного из мономеров NAGS *Neisseria gonorrhoeae* (PDB ID: 3D2M) [15], карбаматки-назного домена соседнего мономерного звена и обоих субстратов реакции – глутамата в протонированной и непротонированной формах и ацетил-КоА. Оба домена были включены, так как связывание субстратов обеспечивается ими совместно. Система для расчетов была собрана следующим образом: неразрешенные в кристалле атомы водорода белка были добавлены с помощью программы Reduce, а атомы водорода субстратов реакции – с помощью визуального редактора Discovery Studio, таким образом, чтобы соответствовать физиологическому значению pH. NAGS и глутамат были описаны набором параметров силового поля CHARMM36 [16], молекулы воды – параметрами TIP3P [17]. Параметризацию ацетил-КоА проводили на основе работы [18] и программы CGenFF (от CHARMM General Force Field). Моделируемая система комплекса NAGS с субстратами реакции была сольватирована так, чтобы обеспечить возможность полного выхода глутамата в раствор, затем в систему были добавлены ионы для нейтрализа-

ции общего заряда. Общий размер системы как с протонированным, так и с непротонированным глутаматом составил $102 \times 72 \times 92 \text{ \AA}^3$.

Все расчеты классической молекулярной динамики проводили в NPT-ансамбле при температуре 298 К и давлении в 1 атм. с шагом интегрирования в 1 фс в программном пакете NAMD [19]. Предварительную релаксацию обеих систем осуществляли в течение 15 нс. Для моделирования процесса выхода глутамата из активного центра NAGS в раствор использовали классическую молекулярную динамику с применением метода зонтичной выборки. В этом моделировании в качестве координаты реакции был выбран вектор $C\beta(\text{Asn394}) - C\beta(\text{глутамат})$. Для каждого из двух вариантов системы с разными формами глутамата моделировали 14 копий системы с константами жесткости ограничивающих гармонических потенциалов 0,5 или 1,5 ккал/(моль· \AA^2) и центрами, соответствующими расстояниям $C\beta(\text{Asn394}) - C\beta(\text{глутамат})$ от 9,5 до 27,5 \AA с интервалом в 1,5 \AA . Общая длина молекулярно-динамического моделирования для каждой модели составила 70 нс (14×5 нс). Начальные геометрии системы для запусков в каждом «окне» были получены из предварительного моделирования методом направленной молекулярной динамики. Для получения значений энергии связывания двух форм глутамата и NAGS был проанализирован набор молекулярно-динамических траекторий с помощью метода анализа взвешенных гистограмм (WHAM).

Для построения профиля реакции депротонирования глутамата в локальном сайте связывания использовали гибридный метод квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ). В квантовую часть были включены боковые группы Arg316, Asp419, Asn423, Arg425, а также сам субстрат реакции и ближайшие молекулы воды. КМ-подсистема составила 86 атомов (+ 4 линк-атома). Общий заряд КМ-подсистемы равен 0.

Для описания квантовой подсистемы был выбран гибридный функционал PBE0 с дисперсионной поправкой D3, а также базис 6-31G**.

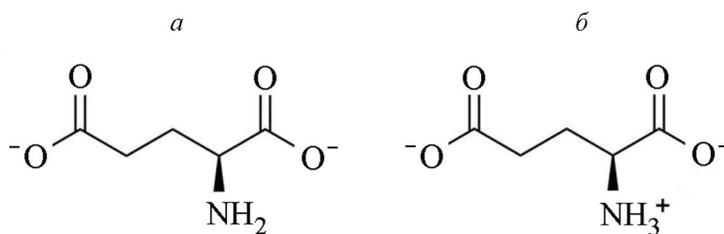


Рис. 2. NH_2 -форма (а) и NH_3^+ -форма (б) глутамата

Описание молекулярно-механической подсистемы осуществляли аналогично расчетам классической молекулярной динамики. Для молекулярно-динамических расчетов с использованием потенциалов КМ/ММ использовали интерфейс взаимодействия квантово-химической программы *terachem* (КМ-часть) и молекулярно-динамической программы *NAMD* (ММ-часть). Молекулярно-динамическое моделирование с КМ/ММ-потенциалами проводили в ансамбле *NPT* ($p = 1$ атм., $T = 298$ К) с шагом интегрирования 1 фс.

В качестве координаты реакции для моделирования методом зонтичной выборки использовали разность между расстояниями $N_{\text{глутамат}} - H_{\text{глутамат}}$ и $O_{\text{Asp419}} - H_{\text{глутамат}}$. Моделировали 22 копии системы с константами жесткости ограничивающих гармонических потенциалов от 80 до 250 ккал/(моль·Å²) и центрами, соответствующими значениям координаты реакции от -0,8 до 3,0 Å с интервалом в 0,2 Å. Общая длина траекторий составила 110 пс (22×5 пс). Профили энергии Гиббса реакции были получены с помощью метода *UI* (метода зонтичного интегрирования).

Результаты и обсуждение

Как и во многих других GNAT-белках, в активном центре *NAGS* нет подходящей аминокислоты-основания, которая могла бы участвовать в депротонировании заряженной аминокислотной группы

субстрата. Единственная близлежащая кислая аминокислота *Glu353* входит в состав структурообразующего солевого мостика с *Arg416*, что в значительной степени понижает ее pK_a . Поэтому мы предположили, что депротонирование субстрата реакции (глутамата) осуществляется до его попадания в активный центр фермента. В таком случае ожидаемое значение энергии Гиббса связывания активным центром NH_2 -формы глутамата (рис. 2, а) было бы ниже, чем NH_3 -формы (рис. 2, б). Для оценки этих значений нами были построены профили энергии Гиббса связывания NH_2 - и NH_3 -форм глутамата белком (рис. 3).

Действительно, энергия Гиббса связывания для NH_2 - и NH_3 -форм составила соответственно -12 и -10 ккал/моль (энергия была рассчитана как разность между энергиями глутамата в активном центре (**A** на рис. 3) и свободного глутамата в растворе (**P-P** на рис. 3)), а разница между ними равна 2 ккал/моль, что может свидетельствовать о селективности *NAGS* по отношению к NH_2 -глутамату. Однако различие между энергиями связывания составляет лишь 2 ккал/моль, что соответствует погрешности метода расчета, поэтому, если *NAGS* и селективна по отношению к непротонированному глутамату, то эта селективность может оказаться несущественной.

Более примечательна сама структура профилей энергии связывания. Как для NH_2 -, так и для

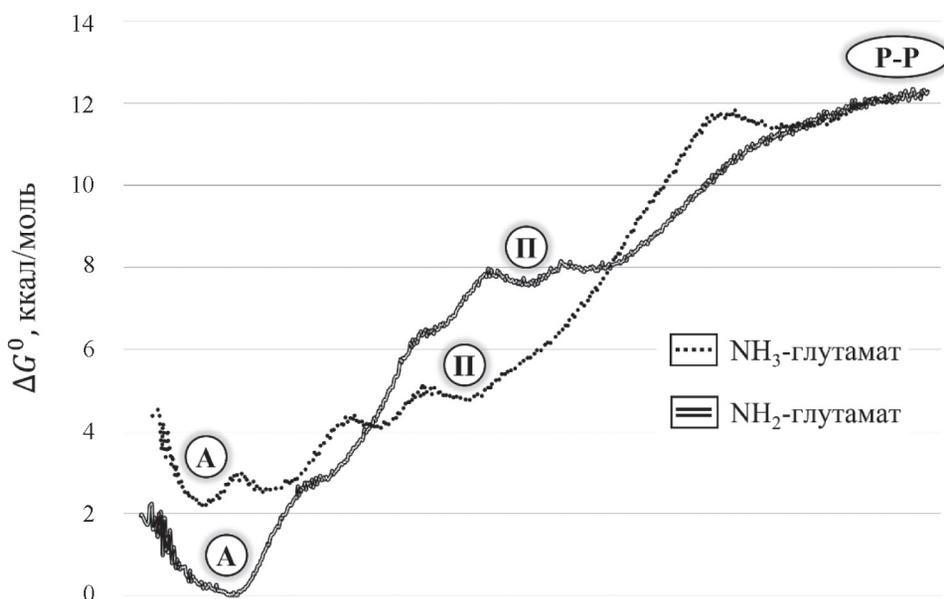


Рис. 3. Профили энергии Гиббса связывания NH_2 - и NH_3 -формы глутамата с *NAGS* (**A** – глутамат, связанный в активном центре; **П** – глутамат, связанный в локальном сайте связывания, в котором предположительно происходит депротонирование заряженной аминокислотной группы; **P-P** – свободный глутамат в растворе)

NH_3 -формы глутамата в одном и том же месте существует локальный сайт связывания с белком (**П** на рис. 3) на пути к активному центру (**А**). Рассчитанная энергия Гиббса связывания NH_2 -формы в локальном сайте связывания (из **Р-Р** в **П**) равна $-4,5$ ккал/моль, тогда как для NH_3 -формы она составляет $-7,5$ ккал/моль. Эта разница обусловлена тем, что на всем пути глутамата до активного центра встречается лишь одна кислая аминокислота (Asp419), способная образовывать водородные связи с заряженной аминогруппой субстрата, а расположена она именно в локальном сайте связывания (рис. 4, *a*). Таким образом, обнаруженный локальный сайт связывания лучше стабилизирует именно NH_3 -глутамат.

При движении из локального сайта связывания (**П**) в активный центр (**А**) глутамат связывается с белком посредством лишь своих карбоксильных групп. Так же, как в локальном сайте связывания (**П**), в связывании глутамата в активном центре участвуют Arg316, Asn423 и Arg425 (однако эти аминокислоты меняют свою конформацию, направляя субстрат к

активному сайту); к ним добавляется Arg416 (рис. 4, *b*).

Подобная концентрация положительно заряженных аминокислот на входе в активный центр должна обеспечивать его селективность по отношению к непротонированной форме глутамата. Это подтверждается и значениями энергии связывания NH_2 - и NH_3 -форм субстрата относительно локального сайта связывания (из **П** в **А**): $-7,5$ и $-2,5$ ккал/моль соответственно. Тогда наиболее энергетически выгодный путь глутамата из раствора в активный центр NAGS может выглядеть следующим образом: NH_3 -глутамат входит в белок и связывается в локальном сайте, далее с его заряженной аминогруппы осуществляется перенос протона на Asp419, затем NH_2 -форма следует до активного центра. Чтобы оценить возможность протекания этого процесса, методом КМ/ММ мы построили профиль переноса протона с заряженной аминогруппы глутамата на карбоксильную группу Asp419 в локальном сайте связывания (рис. 5). Энергия Гиббса барьера химической реакции составляет 11 ккал/моль,

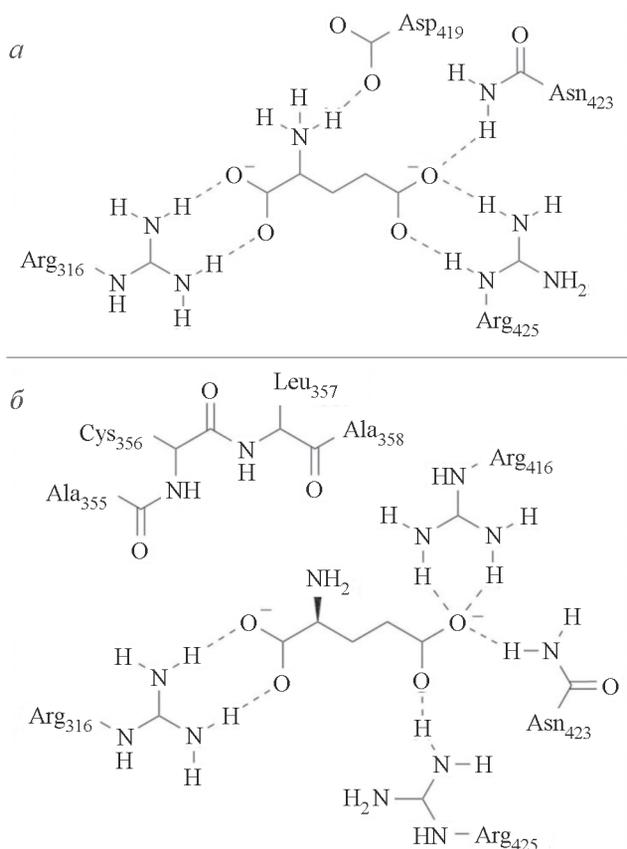


Рис. 4. Строение локального сайта связывания глутамата в NAGS (*a*) и активного центра фермента (*b*)

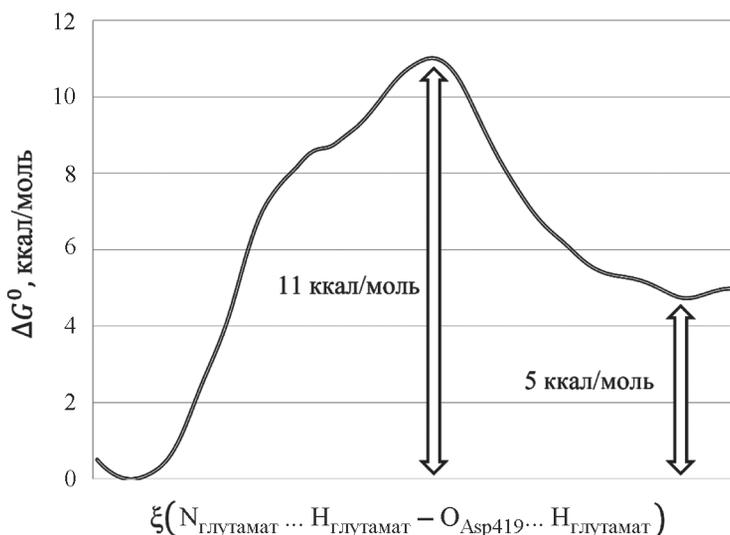
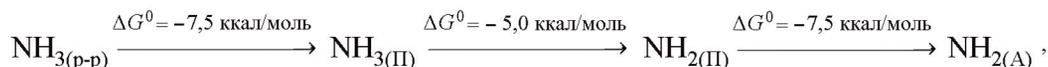


Рис. 5. Профиль энергии Гиббса переноса протона с заряженной аминогруппы глутамата на Asp419

С х е м а



что не выходит за пределы ожидаемых значений для ферментативной реакции. Получающаяся NH_2 -форма глутамата оказалась на 5 ккал/моль выше по энергии, чем исходная NH_3 -форма, но суммарная энергия Гиббса процесса, оцененная по схеме, составляет -10 ккал/моль, что сопоставимо со значениями энергии связывания чистых NH_2 - и NH_3 -форм с активным сайтом белка (на схеме использованы следующие обозначения: p-p – раствор, II – локальный сайт связывания, где происходит перенос протона, A – активный центр, NH_3 – протонированная форма глутамата, NH_2 – непротонированная форма глутамата). Описанный нами путь протекания реакции выглядит наиболее вероятным, поскольку при физиологическом pH доминирующей формой глутамата является NH_3 -глутамат, а его депро-

тонирование в активном центре NAGS невозможно.

Таким образом, нами получены профили энергии Гиббса связывания NAGS *Neisseria gonorrhoeae* с протонированным и непротонированным по аминогруппе глутаматом, а также обнаружен локальный сайт связывания субстрата в белке. На основании полученных значений энергий связывания, а также энергии Гиббса реакции депротонирования NH_3 -формы глутамата в локальном сайте связывания, нами была предложена новая стратегия попадания непротонированного субстрата в активный центр фермента. Она заключается в связывании протонированного глутамата в найденном локальном сайте, переносе протона с аминогруппы на Asp419 и дальнейшем следовании NH_2 -глутамата до активного центра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kirby A.J. // Acc. Chem. Res. 1997. Vol. 30. P. 290 (DOI: 10.1021/ar960056r).
2. Hartwell E., Hodgson D., Kirby, A. J. // J. Am. Chem. Soc. 2000. Vol. 122. P. 9326 (DOI: 10.1021/ja002335m).
3. Schowen K.B, Limbach H.H., Denisov G.S., Schowen R.L. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1458. P. 43 (DOI: 10.1016/s0005-2728(00)00059-1).
4. Schultz B., Chan S. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2001. Vol. 30, P. 23 (DOI: 10.1146/annurev.biophys.30.1.23).
5. Paysan-Lafosse T. et al. // Nucl. Acids Res. 2023, Vol. 51, P. D418–D427 (DOI: 10.1093/nar/gkac993).
6. Baumgartner J.T. et al. // Front. Mol. Biosci. 2021 (DOI: 10.3389/fmolb.2021.646046).

7. Vetting M.W. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 2005. Vol. 433. P. 212 (DOI: 10.1016/j.abb.2004.09.003).
8. Pourreza A. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. Vol. 49. P. 2979 (DOI: 10.1128/AAC.49.7.2979-2982.2005).
9. Trievel R.C. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999. Vol. 96. P. 8931 (DOI: 10.1073/pnas.96.16.8931).
10. Cheng K.C., Liao J.N., Lyu P.C. // Biochem. J. 2012, Vol. 446. P. 395 (DOI: 10.1042/BJ20120520).
11. Salah U.-D.A., Tikhomirova A., Roujeinikova A. // Int. J. Mol. Sci. 2016. Vol. 17 (DOI: 10.3390/ijms17071018).
12. Majorek K.A. et al. // J. Biol. Chem. 2013, Vol. 288. P. 30223 (DOI: 10.1074/jbc.M113.501353).
13. Angus-Hill M.L. et al. // J. Mol. Biol. 1999, Vol. 294. P. 1311 (DOI: 10.1006/jmbi.1999.3338).
14. Peneff C., Mengin-Lecreulx D., Bourne Y. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 16328 (DOI: 10.1074/jbc.M009988200).
15. Min L. et al. // J. Biol. Chem. 2009, Vol. 284. P. 4873 (DOI: 10.1074/jbc.M805348200).
16. MacKerell A.D. et al. // J. Phys. Chem. B, 1998. Vol. 102. P. 3586 (DOI: 10.1021/jp973084f).
17. Jorgensen W.L. // J. Chem. Phys. 1983. Vol. 79. P. 926 (DOI: 10.1063/1.445869).
18. Aleksandrov A. et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2011. Vol. 13. P. 10503 (DOI: 10.1039/c0cp02828b).
19. Phillips J.C. et al. // J. Chem. Phys. 2020. Vol. 153. 044130 (DOI: 10.1063/5.0014475).

Информация об авторах

Анастасия Романовна Блинова – аспирант лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (blinova.lcc@gmail.com);

Анна Михайловна Кулакова – доцент кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (kulakova@lcc.chem.msu.ru);

Белла Людвиговна Григоренко – гл. науч. сотр. лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, вед. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (bell_grig@yahoo.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 10.03.2024;
одобрена после рецензирования 16.03.2024;
принята к публикации 25.03.2024.