

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Кулакова

Кулакова Анна Михайловна

**Молекулярное моделирование механизмов реакций
нуклеофильного присоединения остатков цистеина белков
к органическим молекулам**

02.00.15 – Кинетика и катализ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре физической химии химического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Хренова Мария Григорьевна,**
доктор физико-математических наук

Официальные оппоненты: **Коваленко Илья Борисович,**
доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник кафедры
биофизики биологического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова

Полежаев Андрей Александрович,
доктор физико-математических наук,
главный научный сотрудник Лаборатории
нелинейной динамики и теоретической
биофизики Физического института имени
П.Н. Лебедева Российской академии наук

Свитанько Игорь Валентинович,
доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник, заведующий
лабораторией молекулярного моделирования и
направленного синтеза Института
органической химии имени Н.Д. Зелинского
Российской академии наук

Защита диссертации состоится «3» декабря 2019 года в 15:00 часов на
заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские
горы, д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной
библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на
сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/244259067/>

Автореферат разослан «30» октября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

 И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из распространенных способов модификации белков является ковалентная сшивка тиольной группы аминокислотного остатка цистеина с органическими молекулами, обладающими определенными свойствами. Так, например, можно закрепить одну или несколько флуоресцентных меток на поверхности белка и изучать его диффузию или размеры и конформационную динамику, или присоединить метку, детектируемую определенным сенсором или саму являющуюся сенсором. Также эти реакции лежат в основе природных процессов образования ковалентных комплексов белков с органическими кофакторами.

Бактериальные светочувствительные белки фитохромы функционируют в результате образования ковалентного аддукта между хромофором биливердином и аминокислотным остатком цистеина в белке. Они имеют большой потенциал благодаря флуоресценции в дальней красной и ближней ИК областях спектра. Ткани млекопитающих являются прозрачными в данных спектральных областях, что делает фитохромы перспективными для биоимиджинга. Для улучшения фотофизических свойств: квантового выхода флуоресценции, размера, скорости созревания и др., проводятся многочисленные эксперименты по мутагенезу. Один из предложенных фитохромов обладает необычными свойствами: при взаимодействии биливердина с белком образуются два ковалентных аддукта, один с одной S-S связью, а другой – с двумя, притом основным является комплекс, ковалентно связанный с двумя остатками цистеина. Понимание механизма протекания реакции по двум путям дает подсказки для контроля преимущественного протекания реакции по одному из возможных путей, а также представляет самостоятельную фундаментальную ценность.

Ковалентная сшивка остатков цистеина с органическими лигандами также используется в биомедицинских приложениях. В частности, в последние несколько лет произошел прорыв в создании селективных ингибиторов мутантной формы белка KRAS^{G12C}, отвечающего за гидролиз гуанозинтрифосфата и, как результат, за передачу сигналов пролиферации клеток, их роста и размножения. Экспериментально предложен ряд органических соединений, содержащих двойную связь у терминального атома углерода, селективно образующих ковалентную связь именно с атомом серы Cys12 белка KRAS^{G12C} и не взаимодействующего с другими остатками цистеина в белках и олигопептидах, находящихся в клетке. Кинетический анализ взаимодействия этих соединений с белком показал сложную зависимость эффективной константы скорости образования ковалентного аддукта от концентрации органического соединения. Это указывает на сложный

реакционный механизм, для изучения и детализации которого недостаточно применения экспериментальных методов.

Обе выбранные задачи, бесспорно, являются актуальными и могут быть решены в рамках современных методов молекулярного моделирования, включая метод молекулярного докинга, метод молекулярной динамики и комбинированный метод квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ). Многочисленные работы по механизмам ферментативных реакции, выполненные в рамках подхода КМ/ММ с описанием КМ подсистемы методом функционала электронной плотности (DFT) и ММ подсистемы в рамках классических силовых полей, подтверждают адекватность такого подхода. К его существенным недостаткам стоит отнести высокие затраты вычислительных ресурсов. В то же время появляются приближенные варианты метода функционала электронной плотности, в частности, вариант метода в приближении сильной связи, DFTB, позволяющий значительно снижать вычислительные затраты. Этот метод является привлекательной альтернативой, однако должен быть предварительно протестирован. В рамках данной работы в качестве модельных объектов выбраны молекулярные системы, хорошо изученные в рамках стандартного варианта метода DFT. Для изучения качества описания сопряженных органических систем выбраны флуоресцентные белки, содержащие хромофорную группу с протяженной π -электронной системой. Для оценки возможности описания реакции нуклеофильной атаки рассчитывался энергетический профиль реактивации бутирилхолинэстеразы.

Таким образом, данная работа содержит методологическую часть, связанную с выбором оптимального протокола расчета, а также определение механизмов образования ковалентных комплексов белка с органической молекулой за счет реакции присоединения остатка цистеина к двойной связи для двух практически значимых систем.

Степень разработанности темы исследования. Методы молекулярного моделирования активно применяются для изучения механизмов ферментативных реакций. Также существует тенденция к упрощению протоколов расчета квантово-механической подсистемы в КМ/ММ расчетах, что делает возможным не только изучение поверхности потенциальной энергии, но и поверхностей энергии Гиббса и Гельмгольца. При этом в литературе отсутствует анализ надежности приближенных методов при моделировании процессов в белках. Несмотря на большое прикладное значение реакций присоединения остатков цистеина к двойной связи органического соединения, с точки зрения молекулярного моделирования этот вопрос мало изучен. В литературе представлены единичные работы, в которых бы проводилось численное решение системы дифференциальных кинетических уравнений для

полученного в результате молекулярного моделирования механизма реакции с последующим сопоставлением с эффективными кинетическими параметрами.

Цель работы – с использованием современных методов молекулярного моделирования определить механизмы образования ковалентных аддуктов остатков цистеина с органическими молекулами в белках KRAS^{G12C} и miRFP670 и оценить кинетические параметры этих процессов.

В работе поставлены и решены следующие **основные задачи**:

1. Изучение применимости метода DFTB для описания реакций нуклеофильной атаки и сопряженных органических молекул в белковых системах в рамках метода КМ/ММ.
2. Молекулярное моделирование механизма образования ковалентных аддуктов биливердина с апо-формой белка miRFP670.
3. Молекулярное моделирование механизма образования ковалентного аддукта соединения ARS-853 с белком KRAS^{G12C}.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. В ходе выполнения работы решены методологические вопросы, связанные с выбором протокола расчета, а также решены практически значимые биохимические задачи по определению механизмов реакции присоединения остатков цистеина к органическим молекулам, содержащим двойную связь, и предложены подходы для корректного сопоставления результатов расчёта и эксперимента. В работе впервые показано, что:

1. Метод DFTB может быть использован для качественного описания молекулярных моделей белковых систем, однако не подходит для количественной оценки их свойств.
2. В результате кинетического контроля преимущественно образуется ковалентный аддукт биливердина с апо-формой белка miRFP670 с двумя S-C связями.
3. Предложенный механизм образования ковалентного аддукта соединения ARS-853 с белком KRAS^{G12C} позволяет интерпретировать наблюдаемую концентрационную зависимость эффективной константы скорости.
4. Необходимо учитывать полную кинетическую схему процесса, полученную по результатам молекулярного моделирования, для корректного сопоставления результатов расчетов с макроскопическими наблюдаемыми параметрами исследуемых систем.

Научная и практическая значимость. Результаты исследования позволяют детализировать механизмы химических реакции присоединения остатков цистеина к двойной связи органических соединений, показывают влияние различных факторов на кинетику реакции и, следовательно, дают принципиальную возможность управлять подобными реакциями.

Методология и методы исследования. В работе применялся весь арсенал современных методов молекулярного моделирования. Для оценки энергии нековалентного связывания использовался метод молекулярного докинга и метод классической молекулярной динамики с применением техники перекрещивающихся распределений H-REUS. Энергические профили химических реакций описывались методом КМ/ММ с описанием квантово-механической подсистемы методом функционала электронной плотности и упрощенным методом функционала электронной плотности в приближении сильной связи. Конформационный анализ динамики фермент-субстратного комплекса проводился методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами. Энергии вертикальных электронных переходов в модельных флуоресцентных белках рассчитывались в рамках нестационарного варианта теории функционала электронной плотности TDDFT, метода конфигурационного взаимодействия с однократными и выборочными двукратными возбуждениями с поправками по теории возмущений SOS-CIS(D), а также многоконфигурационным методом самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей CASSCF с поправками по теории возмущений в варианте XMCQDPT2.

Положения, выносимые на защиту:

1. Для получения надежных результатов исследования процессов в белках необходимо использовать метод КМ/ММ с описанием КМ подсистемы методом функционала электронной плотности с гибридными функционалами, однако для получения качественной картины возможно применение упрощенного варианта в приближении сильной связи DFTB.
2. При взаимодействии биливердина с апо-формой белка mRFP670 возможно образование двух ковалентных аддуктов, причем в результате кинетического контроля основным является аддукт с двумя S-C связями.
3. При взаимодействии соединения ARS-853 с белком KRAS^{G12C} происходит слабое связывание, активация ингибитора ферментом и их ковалентное связывание, что объясняет экспериментальную зависимость эффективной константы скорости образования ковалентного аддукта от концентрации ингибитора.
4. Построение полной кинетической схемы по результатам молекулярного моделирования и последующее численное решение системы дифференциальных кинетических уравнений позволяет корректно сопоставлять результаты расчетов с макроскопическими наблюдаемыми параметрами исследуемых систем.

Личный вклад автора заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке задач и разработке путей их решения, проведении вычислений методами квантовой химии, комбинированными методами

квантовой механики и молекулярной механики, методами молекулярной динамики, докинга, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы.

Степень достоверности результатов. Достоверность представленных в диссертационной работе результатов обеспечивается использованием современных методов молекулярного моделирования и верификацией получаемых результатов сопоставлением с экспериментальными данными.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертационной работы были представлены на 25 и 26 международных конференциях «Математика. Компьютер. Образование.» (Дубна 2018, Пущино 2019), международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва 2015, 2018, 2019), XV и XVIII ежегодной молодежной конференции с между народным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва 2015, 2018), I конференции с международным участием «Физическая химия в России и за рубежом: от квантовой химии до эксперимента» (Черноголовка 2019), XXXVI всероссийском симпозиуме молодых ученых по химической кинетике (Московская область 2019), второй школе молодых ученых "Компьютерное моделирование структуры и динамики биомолекул" (Новосибирск 2018).

Результаты опубликованы в 4 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, и в 7 тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы из 139 наименований. Работа изложена на 101 странице машинописного текста и включает 32 рисунка и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель и ставятся задачи работы.

В **Главе 1** рассматриваются современные методы компьютерного моделирования, использованные в рамках данной диссертационной работы. К ним относятся такие методы расчета энергий и сил как метод молекулярной механики, комбинированный метод квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ) и методы квантовой химии. Особое внимание уделяется методу функционала электронной плотности DFT и его полуэмпирическому варианту DFTB. Также в данной главе представлен обзор использованных

методов изучения энергетических поверхностей, включая методы поиска стационарных точек на поверхности потенциальной энергии и метод молекулярной динамики с техниками, позволяющими эффективно сканировать конфигурационное пространство вдоль выбранной координаты реакции.

Глава 2 посвящена изучению применимости метода функционала электронной плотности в приближении сильной связи DFTB для описания реакций нуклеофильного присоединения и сопряженных органических молекул в белковых системах в рамках метода КМ/ММ. Привлекательность метода DFTB связана с тем, что он является значительно менее ресурсозатратным, чем обычные методы функционала электронной плотности.

Применимость метода DFTB для описания реакций нуклеофильной атаки рассматривается на примере реакции реактивации ковалентного аддукта бутирилхолинэстеразы BChE с остатком фосфорорганического соединения экотиофата. Энергетические профили реакции реактивации рассчитаны для нативной бутирилхолинэстеразы и ее мутантной формы BChE^{G117H} с использованием комбинированного метода квантовой механики / молекулярной механики с описанием квантовой части методом DFTB. При разделении системы на квантовую и молекулярно-механическую части учтено возможное участие молекулярных групп в реакции или в формировании системы водородных связей с компонентами активного центра.

Каталитический механизм гидролиза ковалентного аддукта серина бутирилхолинэстеразы выглядит следующим образом: на первой стадии происходит нуклеофильная атака каталитической молекулы воды ацил-фермента с образованием тетраэдрического интермедиата; на второй стадии происходит разрыв связи Р-О, что приводит к регенерации фермента.

Энергетические профили реакций для обеих систем представлены на рисунке 1. Анализ результатов показывает, что геометрические конфигурации реагента, интермедиата и переходных состояний, вычисленные с использованием метода DFTB, достаточно близки к геометрическим конфигурациям, вычисленным с использованием метода DFT (BВ1К/6-31G**). Однако в структуре продуктов реакции, полученной методом DFTB диэтилфосфат протонирован, в то время как в расчетах методом DFT он находится в депротонированной форме, что является более правильным с точки зрения общих представлений химии.

Активационные барьеры для первой стадии реакции реактивации для нативного фермента и мутантной формы BChE^{G117H}, вычисленные методом DFTB, составили 43 ккал/моль и 30 ккал/моль, соответственно. Эти величины достаточно хорошо совпадают с результатами, вычисленными с использованием метода DFT (36 ккал/моль для нативной формы и 27 ккал/моль

для мутантной формы). Оба метода решения квантовых уравнений (DFT и DFTB) в рамках подхода КМ/ММ правильно описывают роль экспериментально изученной мутации Gly117His; в обоих случаях активационные барьеры заметно меньше для мутированного фермента, чем для нативного. Для второй стадии реакции энергетические барьеры различаются значительно. По результатам, полученным методом DFTB, вторая стадия протекает практически безбарьерно (менее 1 ккал/моль для обеих систем). Энергетические барьеры для этой стадии, полученные методом DFT, составляют 19 ккал/моль и 18 ккал/моль, соответственно.

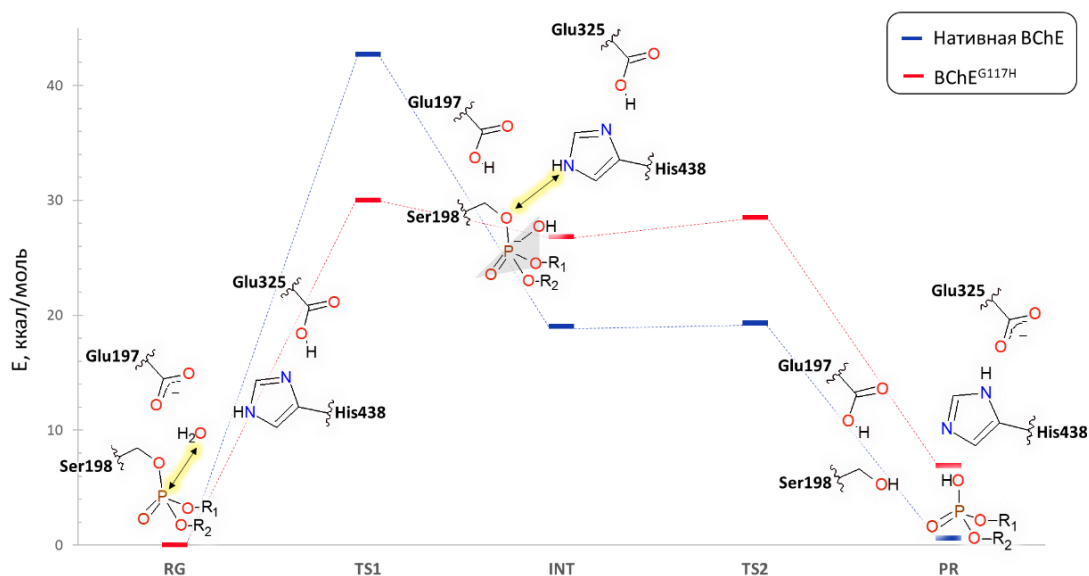


Рисунок 1. Энергетический профиль реакции реактивации для нативной (синий цвет) и мутированной (красный цвет) бутирилхолинэстеразы. Координаты реакции указаны черными стрелками, подсвеченными желтым.

Применимость метода DFTB для описания свойств сопряженных систем в белковом окружении исследована с помощью оценки равновесных геометрических конфигураций и рассчитанных для этих структур энергий вертикальных электронных переходов на примере красных флуоресцентных белков mCherry и его модификаций mRojoA, mRojoA-VYGV и mRojoA-YChroY, содержащих аминокислотные замены, в том числе на ароматические остатки тирозина, участвующие в π -стэкинге с хромофором. Для сравнения использованы литературные данные, полученные методом КМ/ММ с описанием квантовой части в рамках теории функционала электронной плотности PBE0-D3/6-31G**.

Хромофоры изучаемых систем являются хорошими моделями в контексте рассматриваемых в работе задач, поскольку они являются сопряженными системами с отрицательным зарядом. Поэтому анализ длин связей в хромофоре покажет правильность описания сопряженных систем в целом и систем, в которых могут реализовываться различные резонансные структуры, в

частности. Длины ковалентных связей в сопряженной системе хромофора систематически завышены в методе DFTB/MM по сравнению с методом DFT/MM (в среднем на 0,03 Å). Наибольшие различия наблюдаются в области локализации отрицательного заряда.

Следующим этапом оценки применимости метода DFTB/MM для описания свойств сопряженных систем в белковом окружении стал расчет энергий вертикальных переходов на геометриях, полученных методом DFTB/MM.

Значения энергий вертикальных электронных переходов между основным и первым возбужденным состояниями ($S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$) рассчитаны методами нестационарной теории функционала электронной плотности (TDDFT), конфигурационного взаимодействия с однократными и выборочными двукратными возбуждениями с масштабированием вкладов от динамической корреляции электронов с противоположными спинами (SOS-CIS(D)) и многоконфигурационной квазивырожденной теории возмущений второго порядка (XMCQDPT2) с волновой функцией, полученной в рамках многоконфигурационного метода самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей (CASSCF) для равновесных геометрических конфигураций, полученных ранее методом DFTB/MM, и представлены в таблице 1.

Таблица 1. Значения энергии вертикальных переходов $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$ в эВ, полученные в расчётах различными методами и экспериментальные данные

Система	TDDFT (ω B97X-D)		SOS-CIS(D)		XMCQDPT2		Эксп.
	DFTB/MM	DFT/MM	DFTB/MM	DFT/MM	DFTB/MM	DFT/MM	
mCherry	3,03	3,11	2,28	2,39	2,11	2,20	2,14
mRojoA	3,04	3,02	2,40	2,32	2,08	2,10	2,08
mRojoA-VYGV	2,96	2,94	2,22	2,27	1,98	2,08	2,10
mRojoA-YChroY	2,87	3,01	2,10	2,28	1,78	1,93	—

Значения энергии вертикальных переходов $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$, рассчитанные методом TDDFT для равновесных геометрических конфигураций систем mRojoA и mRojoA-VYGV, полученных методом DFTB/MM хорошо согласуются с результатами DFT/MM. Однако оба этих результата не воспроизводят экспериментально показанный сдвиг энергий переходов $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$ систем mRojoA и mRojoA-VYGV относительно реперной структуры mCherry. Значения энергии вертикальных переходов $S_{0, \text{мин}} \rightarrow S_1$, полученные методом SOS-CIS(D) для равновесных геометрических конфигураций, рассчитанных методом DFTB/MM, также достаточно хорошо согласуются с результатами для равновесных геометрий DFT/MM. Характер сдвига энергии вертикального перехода правильно определяется лишь для структуры

mRojoA-VYGV. Многоконфигурационная квазивыврожденная теория возмущений второго порядка ХМCQDPT2 лучше других методов воспроизводит значения энергии вертикальных переходов $S_{0,\text{мин}} \rightarrow S_1$. Однако сделать однозначный вывод о надежности применения метода DFTB для последующего описания спектральных свойств не представляется возможным. Поскольку значение энергии вертикального перехода $S_{0,\text{мин}} \rightarrow S_1$, рассчитанное на геометрии, полученной методом DFTB/ММ, достаточно точно воспроизводит экспериментальное значение для структуры mRojoA, но имеет большую ошибку для структуры mRojoA-VYGV (0,12 эВ).

Таким образом, метод DFTB может быть использован для качественного описания молекулярных моделей белковых систем, однако не подходит для количественной оценки их свойств.

Глава 3 посвящена изучению механизма образования ковалентных аддуктов биливердина с апо-формой белка mRFP670.

Белок mRFP670 является недавно разработанным вариантом красного флуоресцентного белка фитохрома и интересен тем, что при взаимодействии с биливердином образует два ковалентных аддукта, один с одной S-C связью, а другой – с двумя, притом основным является ковалентный комплекс биливердина, связанный с двумя остатками цистеина.

Для понимания механизма протекания реакции по двум путям с помощью методов молекулярного моделирования оценены все стадии данной реакции. Для оценки свободной энергии нековалентного связывания проведено моделирование выхода лиганда в раствор методом классической молекулярной динамики с применением техники перекрещивающихся распределений H-REUS. Обработка статистических данных и определение свободной энергии процесса проведены с использованием метода анализа взвешенных гистограмм WHAM. Значение стандартной энергии Гиббса выхода биливердина в раствор составило $-8,44 \pm 0,04$ ккал/моль, что соответствует константе диссоциации $K_{\text{diss}} = 6,6 \times 10^{-7} - 7,6 \times 10^{-7}$ М при 300 К.

Согласно экспериментальным данным, биливердин способен ковалентно связываться либо с одним цистеином из GAF домена (Cys253), либо с двумя цистеинами: по одному из GAF (Cys253) и PAS (Cys20) доменов. Для оценки вероятности нуклеофильной атаки того или иного остатка цистеина на концевую двойную связь в биливердине проведено молекулярно-динамическое моделирование с КМ/ММ потенциалами PBE-D3/GTH-TZV2P-MOLOPT.

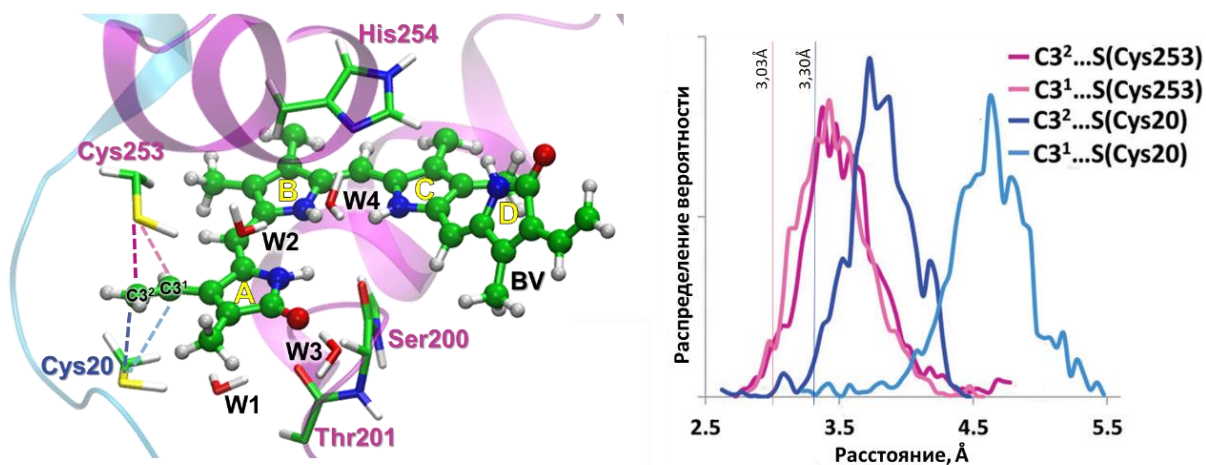


Рисунок 2. Слева КМ подсистема в КМ/ММ и КМ/ММ МД расчетах. Шаростержневой моделью представлен фрагмент биливердина, стержнями остальные фрагменты КМ части. Справа распределение расстояний между атомами углерода концевой двойной связи биливердина $C3^1$ и $C3^2$ и атомами серы Cys20 и Cys253. Вертикальными чертами обозначены границы реакционноспособных конформаций.

Анализ молекулярно-динамической траектории показал, что Cys253 домена GAF находится ближе к концевой двойной связи в биливердине, чем Cys20 домена PAS (Рис. 2). Расстояние от атома серы Cys253 (домен GAF) до атомов углерода активированной концевой двойной связи биливердина $C3^2$ и $C3^1$ составляет в $3,54 \pm 0,33$ Å и $3,47 \pm 0,27$ Å, в то время как расстояние от атома серы Cys20 (домен PAS) до $C3^2$ и $C3^1$ составляет в $3,79 \pm 0,26$ Å и $4,61 \pm 0,33$ Å, соответственно. Также было определено относительное количество реакционноспособных конформаций системы на протяжении МД траектории. Реакционная способность конформации определялась значениями исследуемых расстояний, превышающими не более чем на 0,1 Å равновесные значения (полученные в ходе КМ/ММ оптимизации) 3,03 Å для $C3^2 \cdots S(\text{Cys20})$ и 3,22 Å для $C3^2 \cdots S(\text{Cys253})$. Относительные количества реакционноспособных конформаций реализуемых в ходе траектории для Cys20 и Cys253 составили 2% и 23%, соответственно. Следовательно, нуклеофильная атака на биливердин остатка Cys253 более вероятна, чем остатка Cys20.

Моделирование стадий ковалентного связывания проведено в рамках комбинированного метода квантовой механики / молекулярной механики в варианте PBE0-D3/cc-pvdz / AMBER. На рисунке 3 представлены энергетические профили реакций ковалентного связывания биливердина с miRFP670.

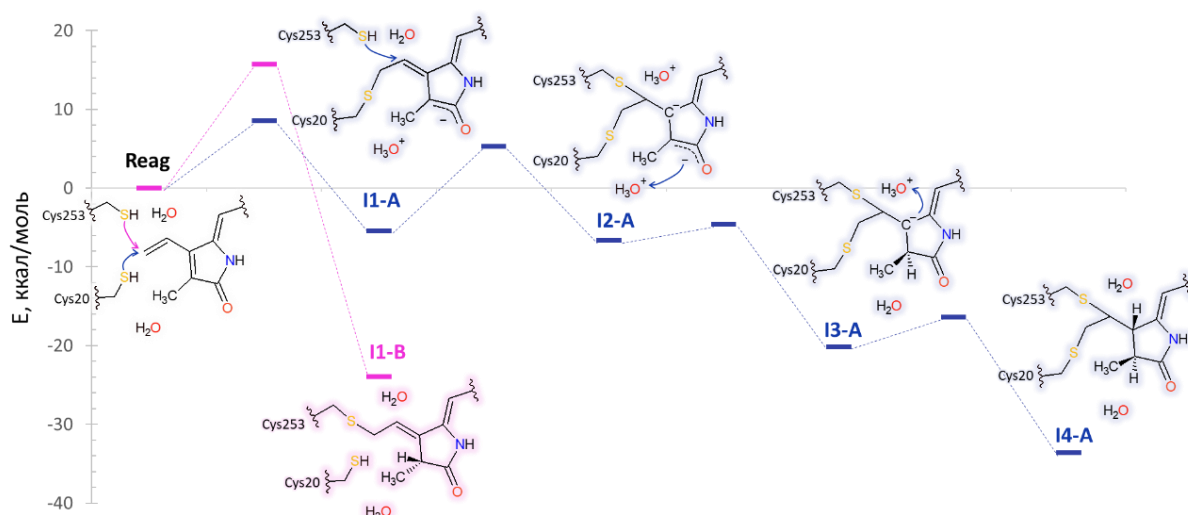


Рисунок 3. Энергетические профили путей А и В реакции ковалентного связывания биливердина в хромофорсвязывающем кармане белка *miRFP670*.

Путь А, обозначенный синим цветом, является многостадийным процессом и приводит к аддукту с двумя S-C связями. Данный механизм начинается с нуклеофильной атаки атомом серы Cys20 атома углерода C3² биливердина, в ходе которой происходит образование интермедиата I1-A с ковалентной связью S-C, а также перенос протона с Cys20 на молекулу воды W1. Энергетический барьер данной стадии составил 8,6 ккал/моль. На второй стадии реакции происходит нуклеофильная атака атомом серы Cys253 атома углерода C3¹ биливердина. Данная стадия протекает аналогично первой стадии и приводит к образованию S-C связи и переносу протона на молекулу воды W2. Энергетический барьер второй стадии составил 10,7 ккал/моль. На третьей и четвертой стадиях происходят переносы протонов с молекул W1 и W2 на карбанионы биливердина.

Путь В, обозначенный розовым цветом, является одностадийным процессом, который сразу приводит к аддукту с одной S-C связью. Данный процесс 1,2-присоединения включает с себя разрыв связи S(Cys253)-H, образование связи S-C3² и перенос протона с Cys253 на атом C3¹ через молекулу воды W2. Энергетический барьер данной реакции составляет 15,7 ккал/моль.

Ковалентные аддукты, получаемые в реакционных путях А и В, значительно стабилизированы относительно исходной структуры Reag, для I4-A эта величина составляет -32 ккал/моль, а для I2-B – -25 ккал/моль, что свидетельствует о кинетическом контроле реакции.

На основе энергетических профилей реакций, используя формулы теории переходного состояния, оценены константы скорости прямых и обратных реакций путей А и В: k_{1A} – k_{4A} , k_{-1A} – k_{-4A} , k_{1B} , k_{-1B} . Константа равновесия $K_{diss} = 6,4 \times 10^{-7}$ М оценена в классическом молекулярно-динамическом моделировании. Используя значения доли реакционноспособных конформеров

2% для Cys20 и 23% для Cys253, полученных в ходе молекулярно-динамического моделирования с КМ/ММ потенциалами, вычислены соответствующие константы равновесия K_A и K_B между реакционноспособной и нереакционноспособной конформациями для путей А и В, соответственно. Все константы относятся к температуре 300 К.

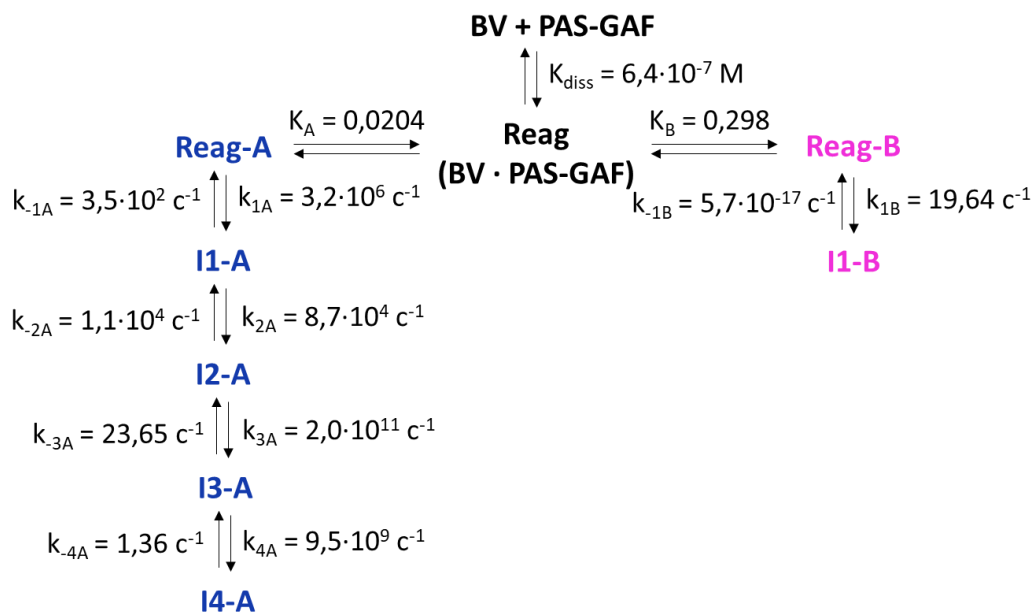


Рисунок 4. Кинетическая схема ковалентного связывания биливердина в хромофорсвязывающем кармане белка *miRFP670*.

Численное решение кинетических уравнений, соответствующих кинетической схеме на рисунке 4, позволяет получить соотношение двух продуктов реакции I4-A и I1-B. Ковалентный аддукт пути А с двумя связями С–S значительно преобладает над ковалентным аддуктом пути В $[I4-A]/[I1-B] = 10^4$, что согласуется с литературными экспериментальными данными.

Глава 4 посвящена изучению механизма ингибирования белка KRAS^{G12C} соединениями семейства ARS. Белки семейства RAS относятся к классу малых ГТФаз и участвуют в передаче клеточных сигналов, отвечающих за рост и деление клеток. Мутации в белках данного семейства могут приводить к неправильной работе белков и, как следствие, к неконтрольному росту клеток.

Соединения семейства ARS, разработанные специально для связывания в S-IIP кармане онкогенного белка KRAS^{G12C}, являются селективными, характеризуется величиной IC_{50} в микромолярном диапазоне и не влияют на клеточные сигналы в клетках без KRAS^{G12C}. Соединения данного семейства имеют активированную концевую углерод-углеродную двойную связь, которая способна вступать в реакцию Михаэля с тиолятом аминокислотного остатка Cys12, а также линкер, о-аминофенольный структурный мотив и заместители, специально разработанные для связывания в S-IIP кармане (Рис. 5).

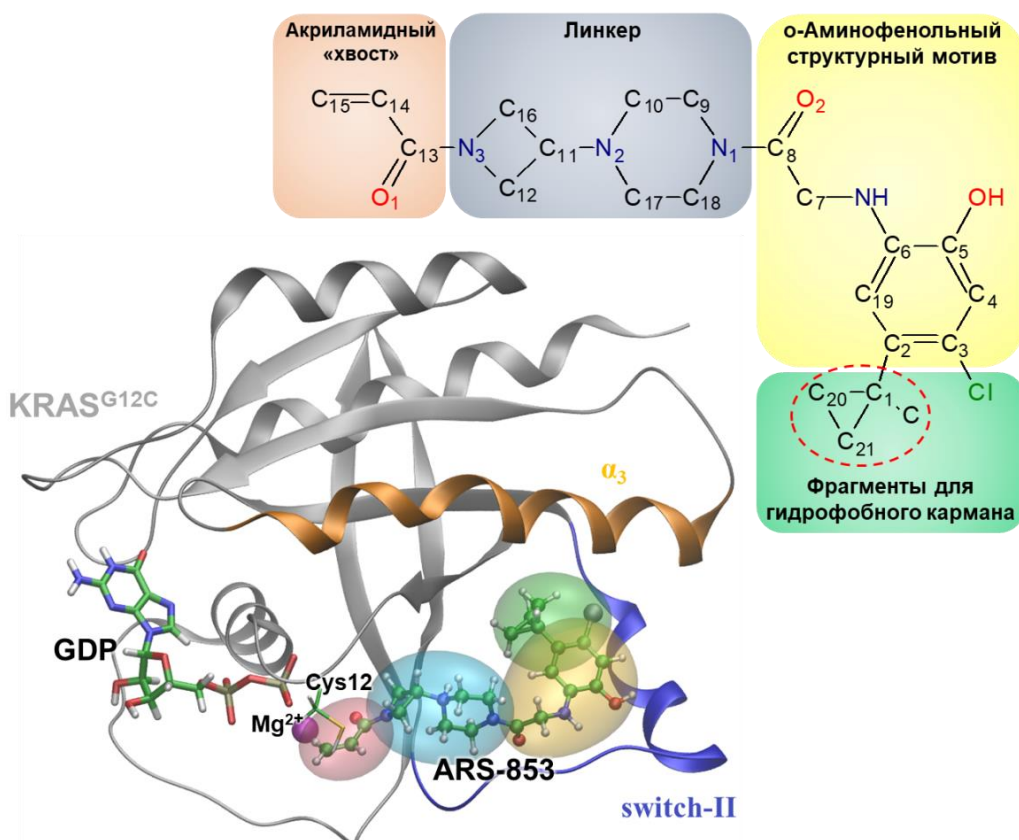


Рисунок 5. Структура комплекса KRAS^{G12C} с соединением ARS-853 (PDB ID 5F2E). На вставке структура соединения ARS-853. Красной штрихпунктирной линией выделена группа, различающаяся для соединений семейства ARS.

Взаимодействие соединений семейства ARS с белком KRAS^{G12C} происходит в два этапа: на первом происходит образование нековалентного комплекса, на втором происходит реакция Михаэля между активированной концевой двойной связью лиганда и аминокислотным остатком Cys12. Полный механизм изучен на примере соединения ARS-853.

Оценка энергии Гиббса нековалентного связывания ARS-853 с KRAS^{G12C} проводилась с использованием комбинации метода зонтичной выборки с методом перекрещивающихся распределений (H-REUS) в рамках классической молекулярной динамики. Значение рассчитанной $\Delta G^{\circ}_{\text{diss}}$ составило $7,5 \pm 0,1$ ккал/моль, что соответствует константе диссоциации $K_{\text{diss}} = 3,4 \times 10^{-6}$ М при 300 К (Рис. 6).

В работе проведен анализ изменений объема кармана S-IP, с которым связывается ARS-853, для чего использован веб-сервер CASTp. В качестве исследуемых конфигураций были выбраны структуры, соответствующие связанной форме комплекса, локальным минимумам вдоль пути диссоциации и полностью диссоциированному комплексу. Объем кармана в связанной структуре составляет $266 \text{ \AA}^3$. Затем объем увеличивается до $332 \text{ \AA}^3$ в первом локальном минимуме из-за возмущения кармана, вызванного диссоциацией. Последующие стадии диссоциации приводят к последовательному уменьшению

объема кармана до значения $23 \text{ \AA}^3$. Это объясняет отсутствие S-IIP кармана в кристаллических структурах белка KRAS^{G12C}, не содержащих ингибитор.

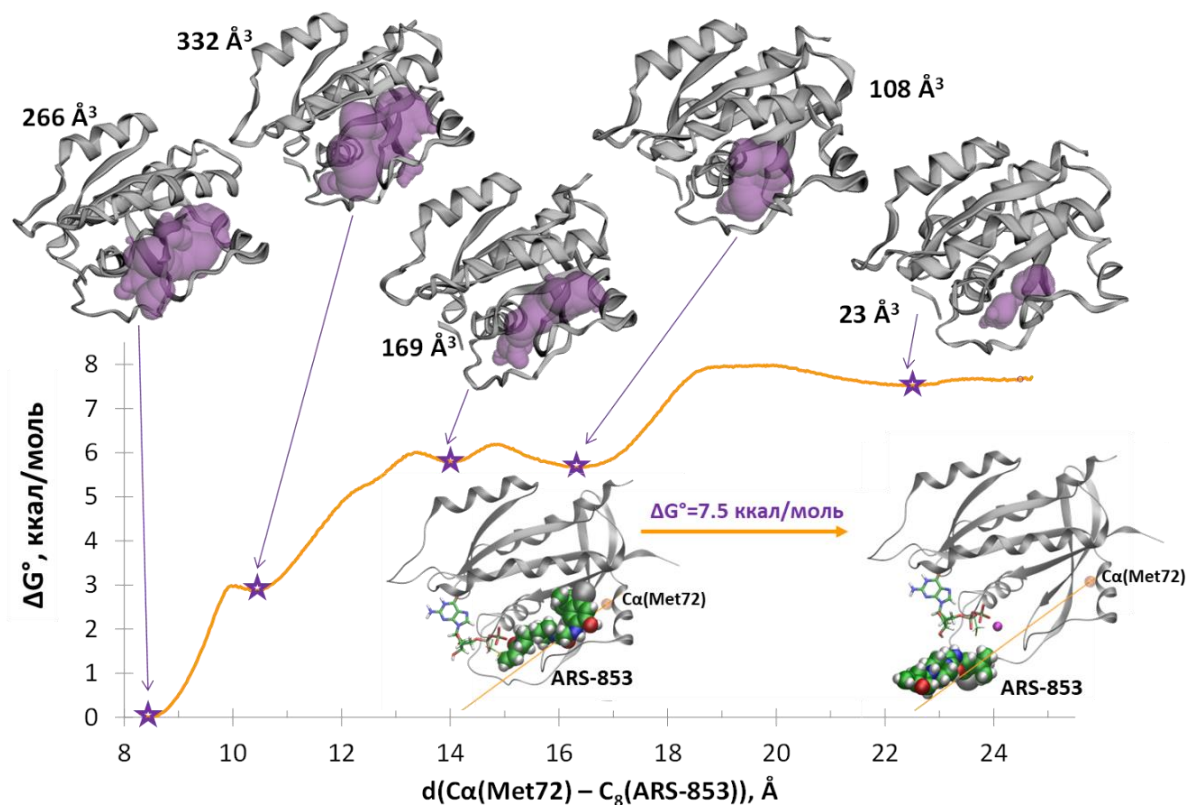


Рисунок 6. Профиль стандартной энергии Гиббса диссоциации комплекса KRAS^{G12C}·GDP·ARS-853. В верхней части рисунка показано изменение объема кармана S-IIP. В нижней части рисунка изображены структуры связанного и диссоциированного комплексов, в которых стержневой моделью изображен GDP, шаровой моделью – ARS-853. Оранжевой стрелкой показан вектор выхода лиганда в раствор.

Механизм химической реакции образования ковалентного комплекса KRAS^{G12C} с ARS-853 рассчитан с использованием комбинированного метода квантовой механики / молекулярной механики (KM/MM) в варианте PBE0-D3/cc-pvdz /AMBER. Изучаемая реакция образования ковалентного комплекса KRAS^{G12C}·GDP·ARS-853, энергетический профиль которой представлен на рисунке 7, происходит в несколько стадий. На первой стадии начинается реакция Михаэля присоединения тиолята к активированной двойной связи. Нуклеофильная атака концевго атома углерода акриламидного фрагмента ARS-853 происходит с низким барьером 4,3 ккал/моль и образованием интермедиата I2 (-2,2 ккал/моль). Данная стадия активируется за счет образования водородных связей между карбонильным кислородом субстрата в качестве акцептора водородной связи и протонированной аминогруппой боковой цепи Lys16 и молекулой воды из координационной сферы Mg²⁺ в качестве доноров водородной связи.

Вторая стадия реакции ковалентного связывания ARS-853 с Cys12 KRAS^{G12C} соответствует переносу протона от молекулы воды из

координационной сферы магния на атом углерода ARS-853. Молекула воды, от которой переносится протон, образует водородную связь не с атомом C₁₄ на который необходимо перенести протон, а с атомом O₁. По этой причине расстояние между переносимым атомом водорода и атомом C₁₄ составляет 3,28 Å, что приводит к относительно высокому энергетическому барьеру данной стадии (16 ккал/моль). Продукт второй стадии I3 стабилизирован на 1,7 ккал/моль по сравнению с I1.

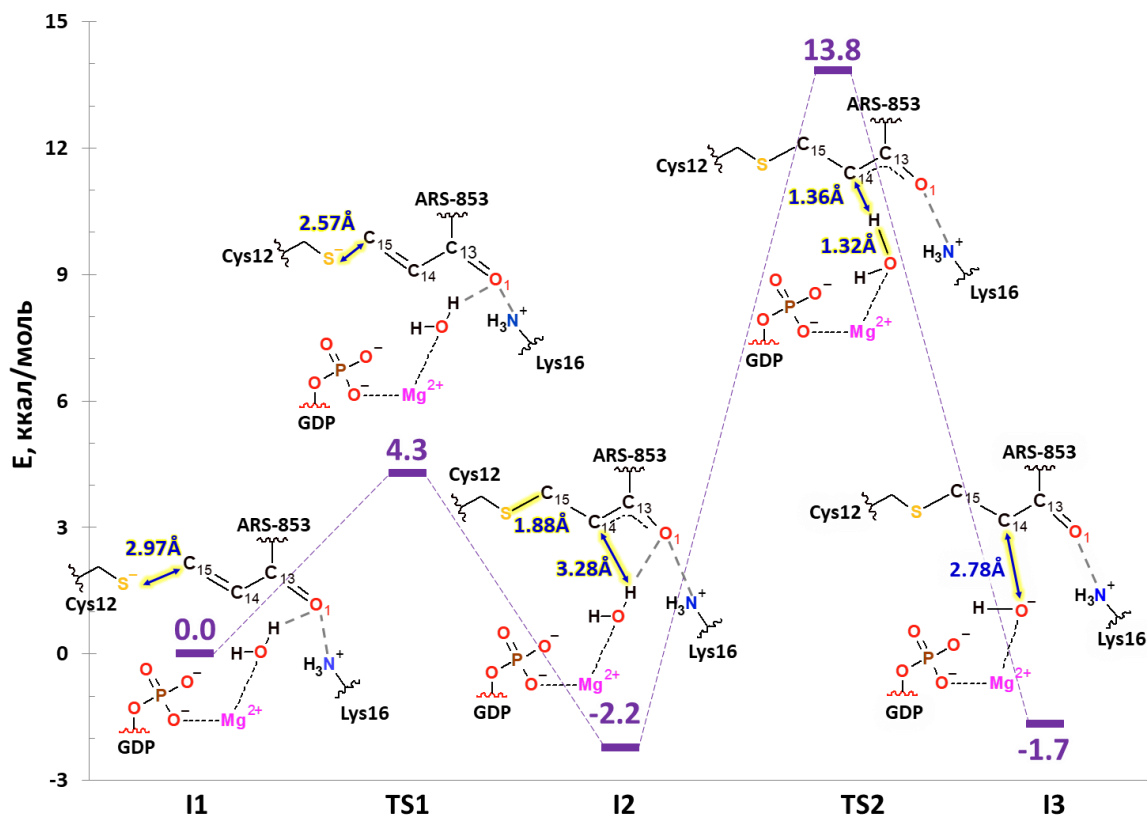


Рисунок 7. Профиль потенциальной энергии реакции ковалентного связывания ARS-853 с белком KRAS^{G12C}. Ключевые расстояния подсвечены желтым.

Для получения полного профиля энергии Гиббса химической реакции, помимо добавления энтропийного и энтальпийного вкладов к потенциальной энергии полученных стационарных точек, необходимо также учесть стадии депротонирования Cys12 и протонирования гидроксид-аниона. Данный этап моделирования был проведен с использованием термодинамического цикла, который вначале был откалиброван на небольших модельных системах - этантиол и молекула воды, с целью определения значения аддитивного члена при сравнении рассчитанных и экспериментальных значений рK_a. Оценка ΔG° реакций протонирования / депротонирования полной системы показала дестабилизацию системы на 7,3 ккал/моль при депротонировании Cys12 и стабилизацию системы на 22 ккал/моль при протонировании гидроксид-аниона. Общий профиль стандартной энергии Гиббса представлен на рис. 8.

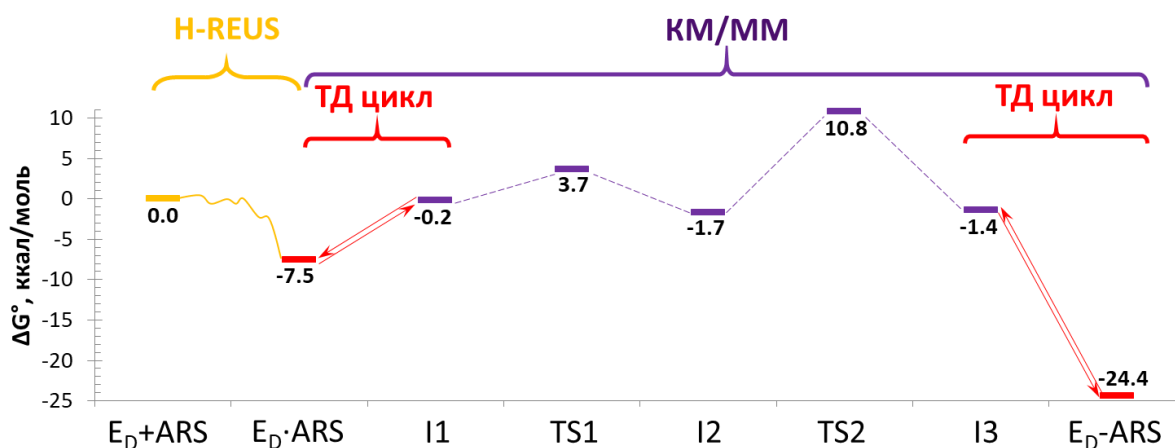


Рисунок 8. Профиль стандартной энергии Гиббса процесса образования ковалентного комплекса $KRAS^{G12C} \cdot GDP \cdot ARS-853$ (E_D-ARS) из комплекса $KRAS^{G12C} \cdot GDP$ (E_D) и $ARS-853$ (ARS). Значения, полученные разными методами, показаны разными цветами и отмечены соответствующими аббревиатурами.

По результатам моделирования с использованием теории переходного состояния рассчитаны константы скорости всех элементарных стадий реакции (Рис. 9). Исключение составила константа скорости бимолекулярной реакции k_0 , которая была оценена как типичное значение константы скорости процессов, контролируемых диффузией для молекул такого размера.

Согласно экспериментальным исследованиям, наблюдаемая константа скорости образования ковалентного комплекса $KRAS^{G12C} \cdot GDP \cdot ARS-853$ (k_{obs}) описывается следующим соотношением:

$$k_{obs} = k_{inact} \frac{[ARS]_0}{[ARS]_0 + K_i}, \quad (1)$$

где k_{inact} - константа скорости химической стадии взаимодействия белка с ингибитором, K_i - константа равновесия обратимого связывания, а $[ARS]_0$ - начальная концентрация ингибитора.

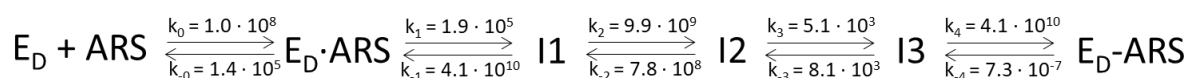


Рисунок 9. Кинетическая схема образования ковалентного комплекса $KRAS^{G12C} \cdot GDP \cdot ARS-853$. Все константы скорости элементарных стадий представлены в s^{-1} , константа k_0 измеряется в $л/(моль \cdot с)$.

На основе вычисленных значений констант скоростей для каждой элементарной стадии реакции была составлена и численно решена система дифференциальных кинетических уравнений. Начальная концентрация $KRAS^{G12C} \cdot GDP$ (E_D), была взята аналогично эксперименту и равнялась 1 мкМ, а начальная концентрация ингибитора $[ARS]_0$ варьировалась от 10^{-5} М до 10^{-1} М.

На рисунке 10 представлены кривые накопления ковалентного комплекса $\text{KRAS}^{\text{G12C}}\cdot\text{GDP}\cdot\text{ARS-853}$ ($\text{E}_\text{D}\text{-ARS}$). Все рассчитанные кривые описываются кинетикой первого порядка

$$[\text{E}_\text{D} - \text{ARS}] = [\text{E}_\text{D}]_0 \times (1 - e^{-k_{\text{obs}}t}), \quad (2)$$

где $[\text{E}_\text{D}]_0$ - начальная концентрация $\text{KRAS}^{\text{G12C}}\cdot\text{GDP}$ (E_D), а k_{obs} - наблюдаемая константа скорости. Все значения k_{obs} полученные при разных концентрациях ингибитора $[\text{ARS}]_0$ представлены на рисунке 10. Набор рассчитанных точек описывается кривой уравнения (1) со значением $R^2 = 0,99998$.

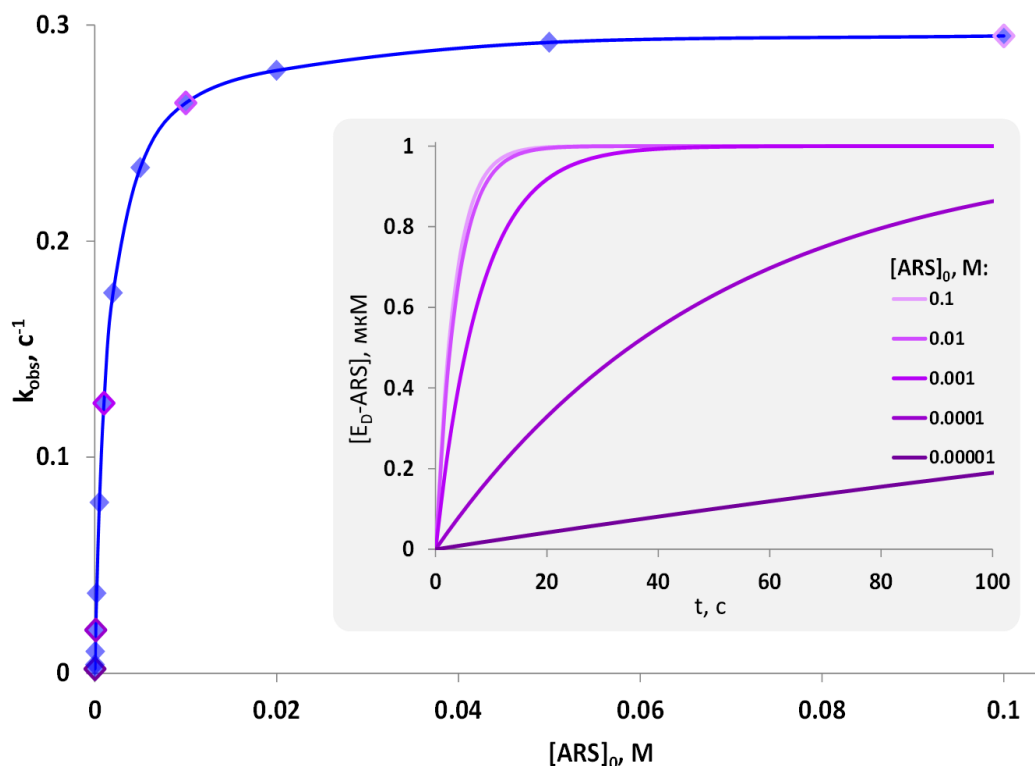


Рисунок 10. Зависимость наблюдаемой константы k_{obs} от начальной концентрации ARS-853 $[\text{ARS}]_0$. На вставке представлены кривые накопления $\text{KRAS}^{\text{G12C}}\cdot\text{GDP}\cdot\text{ARS-853}$ $[\text{E}_\text{D}\text{-ARS}]$ для разных значений $[\text{ARS}]_0$, полученные при численном решении дифференциальных уравнений.

Рассчитанные значения $k_{\text{inact}} = 0,3 \text{ c}^{-1}$ и $K_i = 1,4 \times 10^{-3} \text{ M}$, согласуются с экспериментальными величинами $0,050 \pm 0,023 \text{ c}^{-1}$ и $0,20 \times 10^{-3} \pm 0,09 \times 10^{-3} \text{ M}$. Рассчитанное значение $k_{\text{inact}} / K_i = 213 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ воспроизводит экспериментальное значение $250 \pm 30 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.

С помощью метода молекулярного докинга оценены константы диссоциации нековалентных комплексов $\text{KRAS}^{\text{G12C}}$ с соединениями семейства ARS. Обнаружена монотонная зависимость между экспериментальными литературными данными по IC_{50} и рассчитанными значениями констант диссоциации K_{diss} . На основе данной зависимости оценены ингибирующие свойства аналогов соединений ARS с различными углеродными скелетами варьируемой функциональной группы. Более перспективными оказались

соединения с метилциклопропильным (MeсPr), метилциклобутильным (MeсBu) и *трет*-бутильным (*t*Bu) фрагментами. Также в данных фрагментах была проведена последовательная замена атомов водорода во всех положениях на атомы галогена, включая F, Cl, Br и I, амино-, спиртовую и тиоловую группы; замещение атомов водорода на большие галогены (Br, I) способствует лучшему связыванию.

Выводы

1. Применение метода КМ/ММ с описанием КМ подсистемы методом функционала электронной плотности с гибридными функционалами позволяет количественно описывать структуры и свойства белковых систем; для качественной оценки возможно использование менее затратного варианта метода в приближении сильной связи DFTB.
2. В результате кинетического контроля реакции присоединения остатка цистеина апо-формы белка miRFP670 к молекуле биливердина основным является ковалентный аддукт с двумя S-C связями.
3. Наблюдаемая зависимость эффективной константы скорости образования ковалентного аддукта соединения ARS-853 с белком KRAS^{G12C} от концентрации соединения обусловлена слабым связыванием и последующей быстрой химической стадией реакции в результате активации двойной связи белком.
4. Для корректного сопоставления результатов молекулярного моделирования с макроскопическими наблюдаемыми параметрами исследуемых систем построены полные кинетические схемы и проведено последующее численное решение систем кинетических уравнений.

Список публикаций по теме работы.

Список публикаций в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

1. Khrenova M., **Kulakova A.**, Nemukhin A. Competition between two cysteines in covalent binding of biliverdin to phytochrome domains // Organic and Biomolecular Chemistry. — 2018. — V. 16. — P. 7518–7529. [Импакт-фактор WoS: 3,49]
2. **Kulakova A. M.**, Lushchekina S. V., Grigorenko B. L., Nemukhin A. V. Modeling reactivation of the phosphorylated human butyrylcholinesterase by QM(DFTB)/MM calculations // Journal of Theoretical and Computational Chemistry. — 2015. — V. 14. — P. 1550051. [Импакт-фактор WoS: 0,68]
3. **Кулакова А. М.**, Хренова М. Г., Немухин А. В. Моделирование спектров мутантных форм красных флуоресцентных белков // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. — 2018. — Т. 59, № 5. — С. 332–336. [Импакт- фактор РИНЦ: 0,66]
4. Немухин А. В., **Кулакова А. М.**, Луцкекина С. В., Ермилов А. Ю., Варфоломеев С. Д. Моделирование химических превращений в активных центрах холинэстераз методами квантовой теории // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. — 2015. — Т. 56, № 6. — С. 343–347. [Импакт- фактор РИНЦ: 0,66]

Список публикаций в сборниках материалов и тезисов конференций:

1. **Кулакова А. М.**, Григоренко Б. Л., Миронов В. А., Хренова М. Г. Молекулярное моделирование ковалентного связывания биливердина в белке miRFP670 / Книга тезисов "1ая Конференция с международным участием "Физическая химия в России и за рубежом: от квантовой химии до эксперимента"". — Москва, 2019. — С. 24–25.
2. **Кулакова А. М.** Молекулярное моделирование взаимодействия фермента KRAS^{G12C} с соединением ARS-853 / Материалы XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2019, секция Химия. — Электронный ресурс. — Москва, 2019. — С. 806.
3. **Кулакова А. М.**, Хренова М. Г., Немухин А. В. Молекулярное моделирование кинетики ковалентного связывания ARS-853 с ферментом KRAS^{G12C} / XXXVI Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике. Сборник трудов. Под редакцией Мельникова М.Я., Верной О.И. — Москва, 2019. — С. 55.
4. **Кулакова А. М.**, Хренова М. Г., Немухин А. В. Молекулярное моделирование механизма взаимодействия белка KRAS^{G12C} с

- соединениями ARS-853 и ARS-1620 / 26 Международная Конференция "Математика. Компьютер. Образование.". — Ижевск, 2019. — С. 46.
5. **Кулакова А. М.**, Хренова М. Г., Немухин А. В. Использование метода DFTB для исследования структуры красных флуоресцентных белков mKeima и eqFP670 / Компьютерное моделирование структуры и динамики биомолекул. Тезисы выступлений участников Второй Школы молодых ученых MolMod-2018 (Новосибирск, 28–30 апреля 2018 г.). — ИПЦ НГУ Новосибирск, 2018. — С. 28–29.
 6. **Кулакова А. М.**, Хренова М. Г., Немухин А. В. Ковалентные ингибиторы белка RAS / Компьютерное моделирование структуры и динамики биомолекул. Тезисы выступлений участников Второй Школы молодых ученых MolMod-2018 (Новосибирск, 28–30 апреля 2018 г.). — ИПЦ НГУ Новосибирск, 2018. — С. 26–27.
 7. **Кулакова А. М.**, Хренова М. Г., Немухин А. В. Молекулярное моделирование механизма ингибирования белка K-Ras-G12C прототипным соединением ARS-853 / МАТЕМАТИКА. КОМПЬЮТЕР. ОБРАЗОВАНИЕ. Тезисы XXV международной конференции. —Москва, Ижевск, 2018. — С. 71.