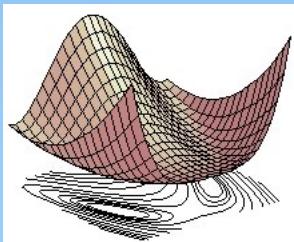


Study of the reaction mechanism in Mandelate Racemase enzyme: Reaction path and dynamical sampling approaches

Xavier Prat Resina

30 d'abril de 2004



Sumari:

- 0. Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa
- 1. Estudi del mecanisme (I): MEP
- 2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM
- 3. Disseny d'un optimitzador (II): Micro-iteratiu
- 4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure

Xavier Prat-Resina, Josep Maria Bofill, Angels González-Lafont, and José María Lluch.

Geometry optimization and transition state search in enzymes:

Xavier Prat-Resina, Josep Maria Bofill, Angels González-Lafont, and José María Lluch,
Different options in the micro-iterative method.

Optimization of the mandelat racemase reaction catalyzed by

enzyme. The reaction was simulated in a QM/MM potential energy surface.

XAVIER PRAT RESINA, ANGELS GONZALEZ-LAFONT, AND JOSE MARIA LLUCH.
Phys. Chem. Chem. Phys. 107347-113127002

How important is the refinement of transition state structures in enzymatic reactions?

J. Mol. Struct. (Theochem), 632:297-307, 2003.



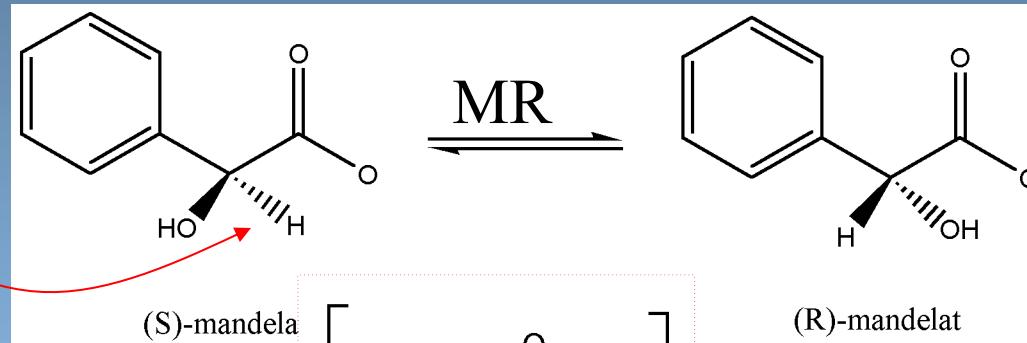
0.Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa

- 1.Estud del mecanisme (I): MEP
- 2.Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM
- 3.Disseny d'un optimitzador (II): Micro-iteració
- 4.Estud del mecanisme (II): Energia lliure

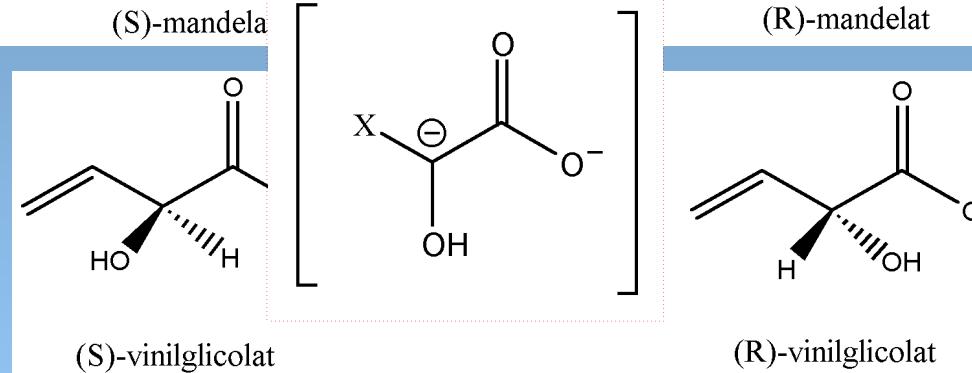
0. Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa

Reacció i substractes

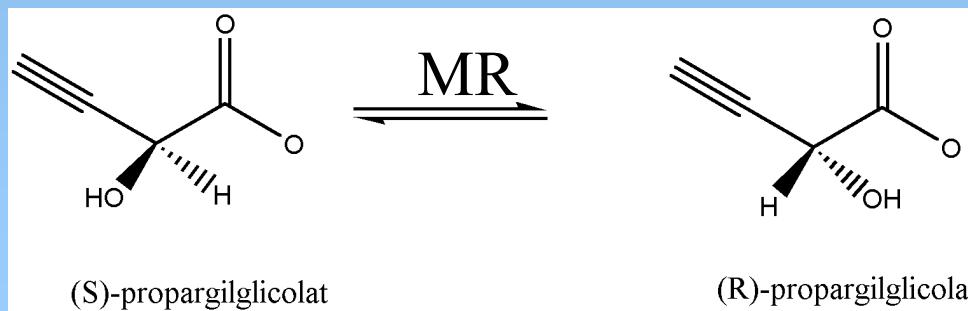
pKa \sim 29
aquós



ràpida



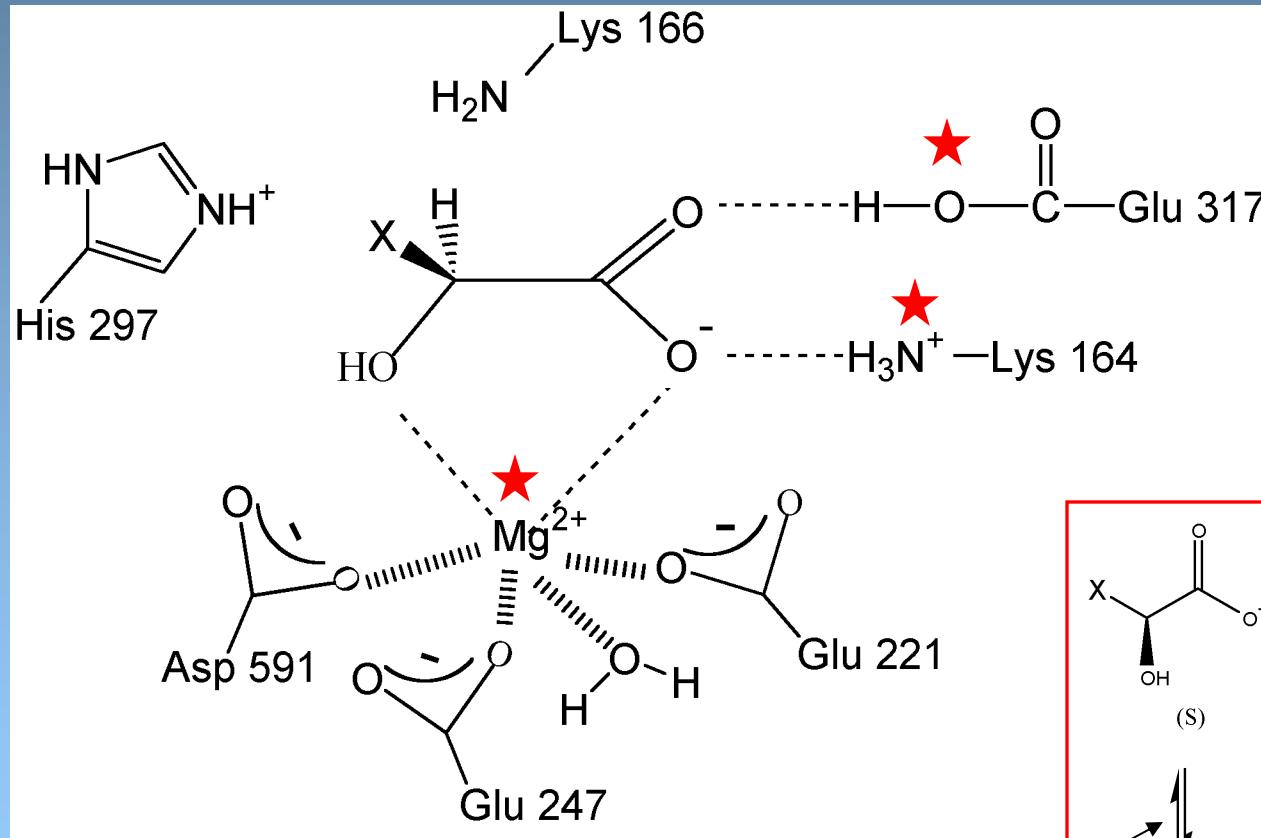
menys ràpida



lenta
;
inactivador

0. Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa

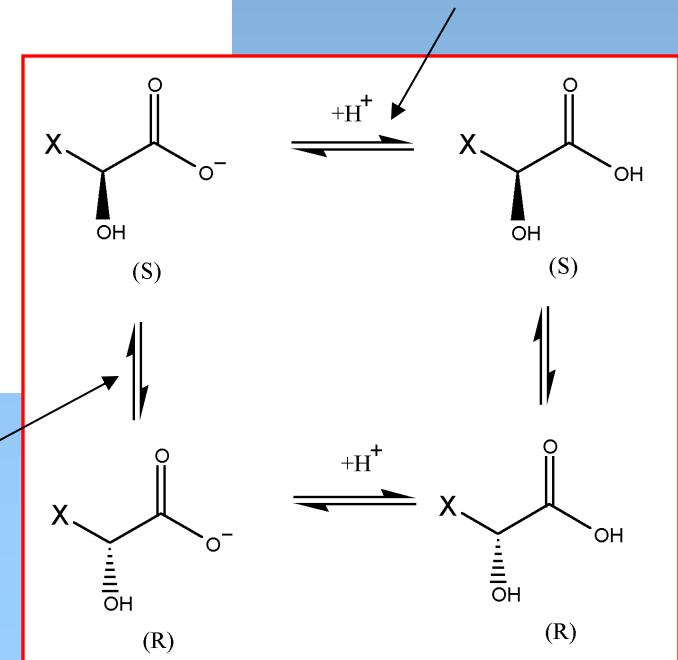
Centre actiu i estudis previs



2 mecanismes
indirectes

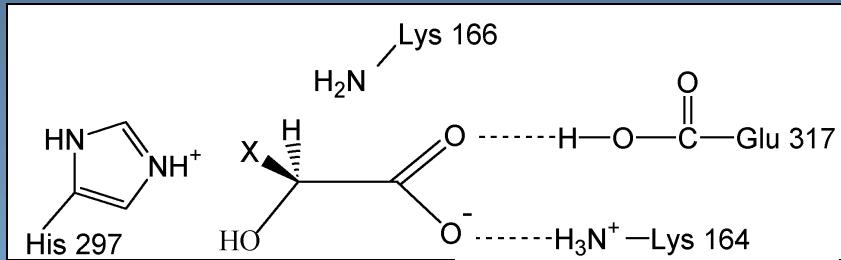
★ Elements d'estabilització
de l'intermedi aniónic

mecanisme
concertat



0. Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa

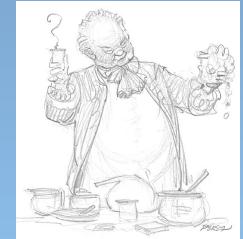
Alguns perquè



→ Per què els experimentals estudien les racemases?

Enzim pseudo-simmètric

Desprotonació d'un hidrogen no àcid



→ Per què s'estudia el mandelat?

Efecte catalític molt gran i és fàcil de treballar-hi

→ Per què l'escollim nosaltres per un estudi teòric?

Hi ha moltes dades experimentals

Transferències protòniques claus per la catalisi?

Com a camp de proves i guia
per a la metodologia





0. Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa

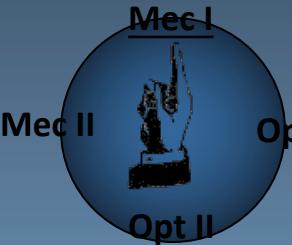
→ 1. Estudi del mecanisme (I):

Perfils d'energia potencial per l'enzim
Mandelat Racemasa

2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM

3. Disseny d'un optimitzador (II): Micro-iteració

4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure

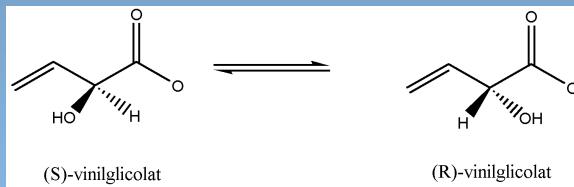


1. Estudi del Mecanisme (I): MEP

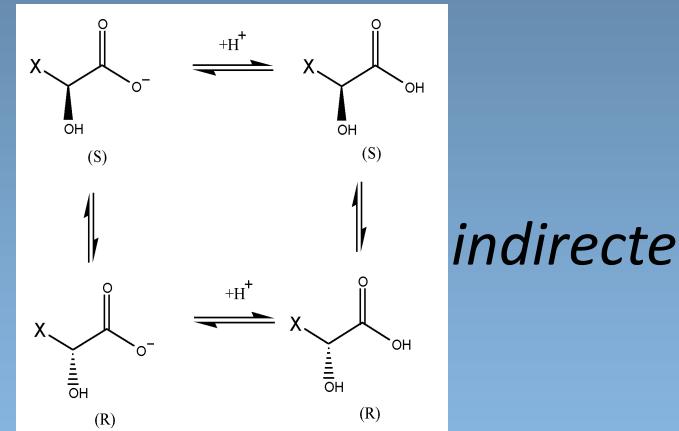
Propòsit

Partint de resultats en estudis previs

vinilglicolat



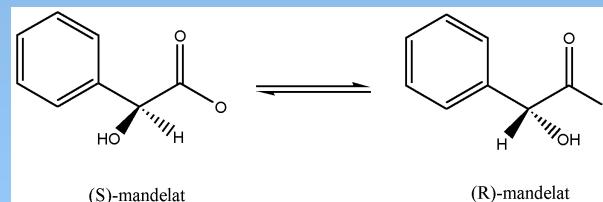
concertat



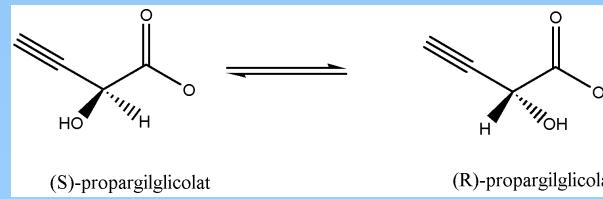
indirecte

Trobarem els mecanismes de reacció per dos substractes

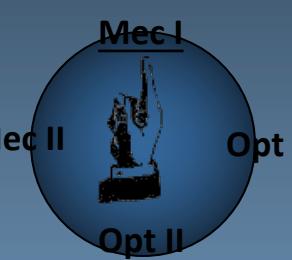
mandelat



propargilglicolat



+inactivació
de l'enzim

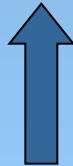


1. Estudi del Mecanisme (I): MEP Mètode emprat

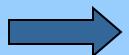
Camins de reacció: coordenada

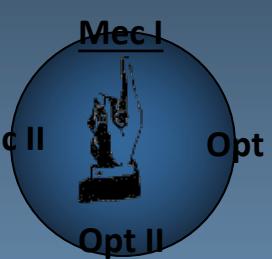


Superfície d'Energia Potencial: QM/MM



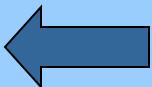
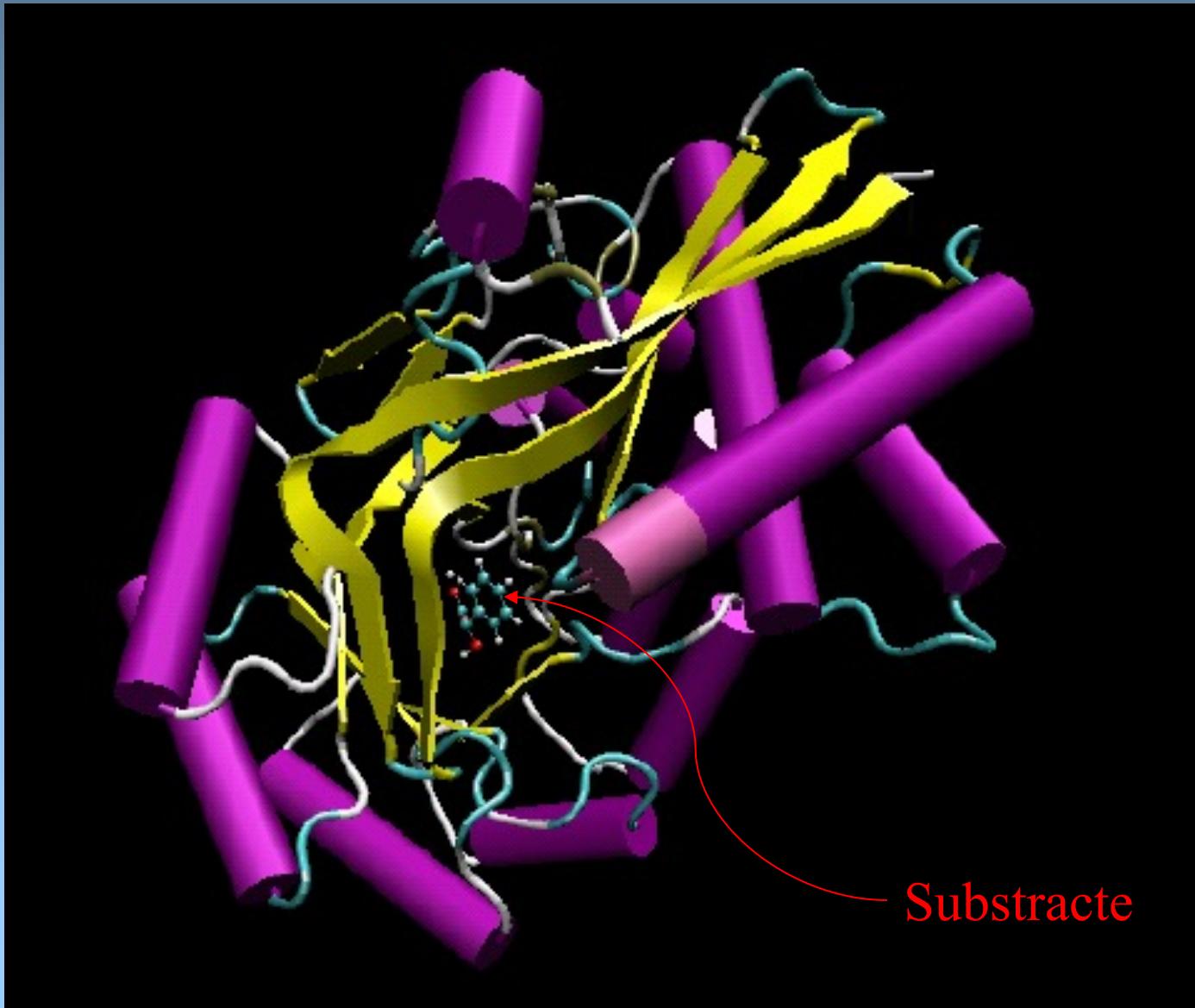
Estructura: PDB (1MNS)

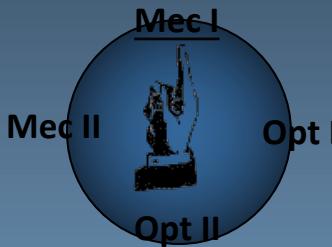




1. Estudi del Mecanisme (I): MEP

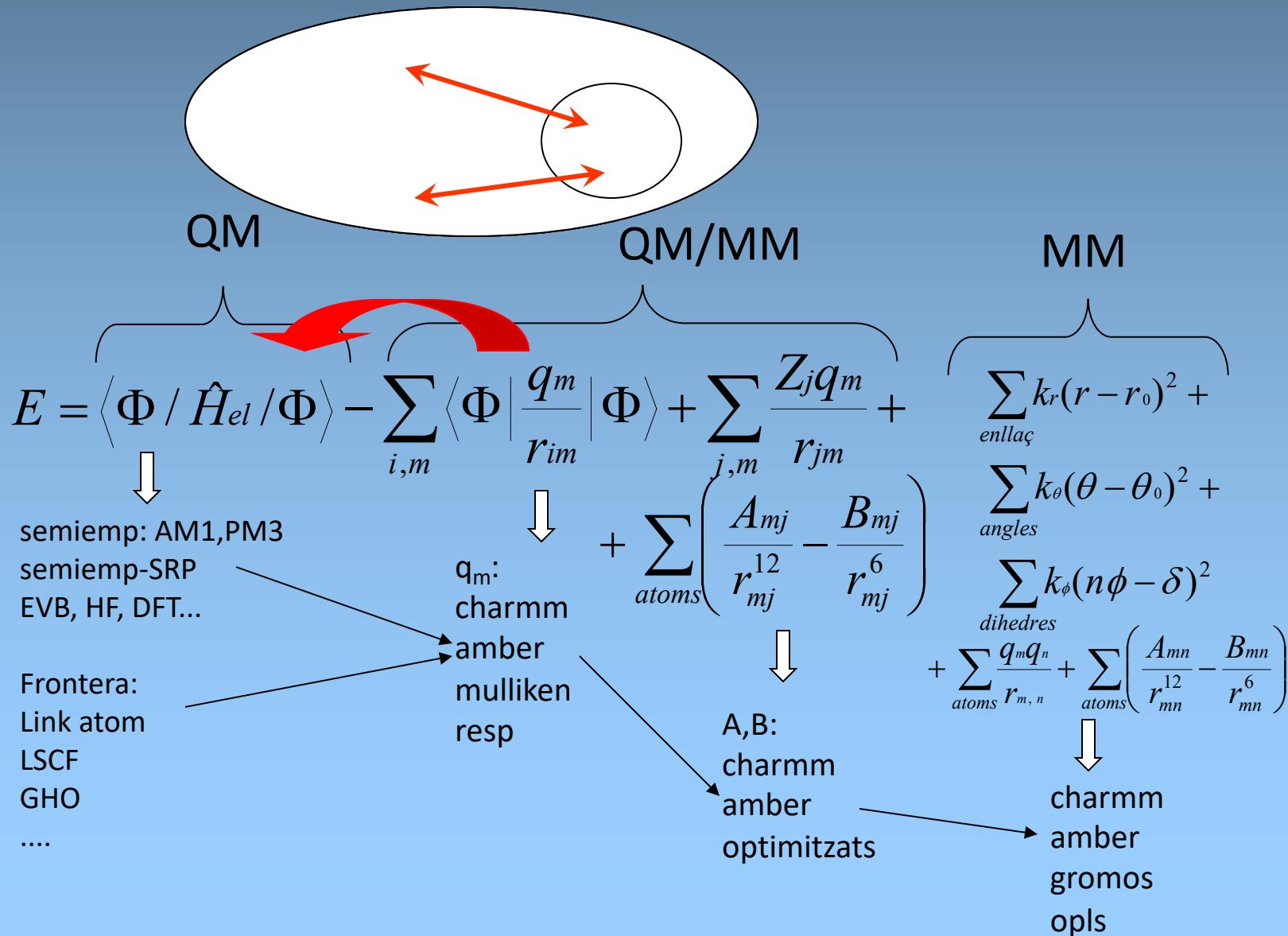
Mètode emprat PDB 1mns

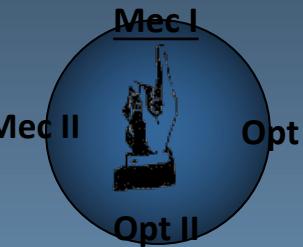




1. Estudi del Mecanisme (I): MEP

Mètode emprat QM/MM





1. Estudi del Mecanisme (I): MEP Mètode emprat QM/MM

Mandelat

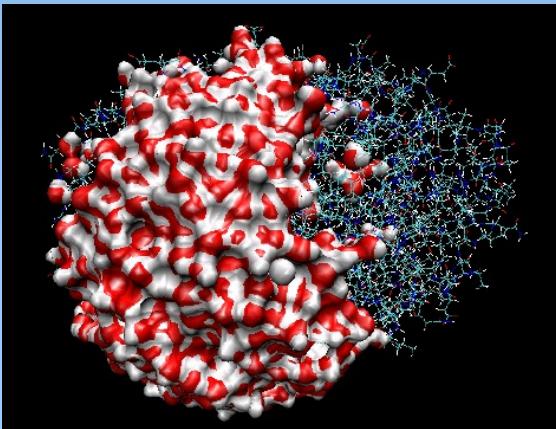
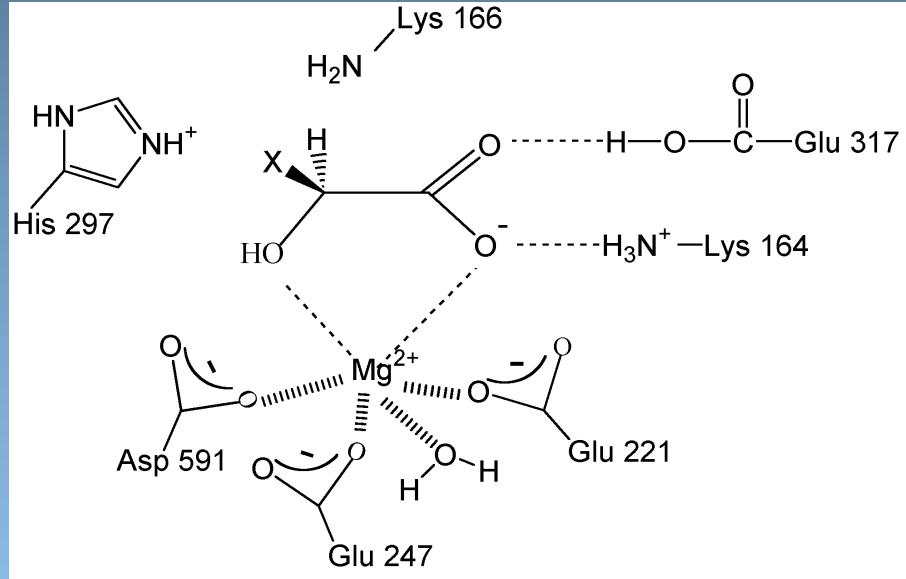
88 àtoms (7 link)

PM3 (SRP-Mg)/
3963 àtoms AMBER

Propargilglicolat

80 àtoms (7 link)

PM3 (SRP-Mg)/
3955 àtoms AMBER



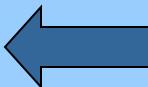
Solvatació:

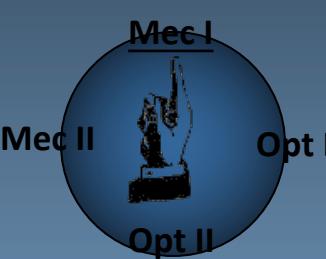
Esfera de 20 Å

Mobilitat:

15 Å de radi

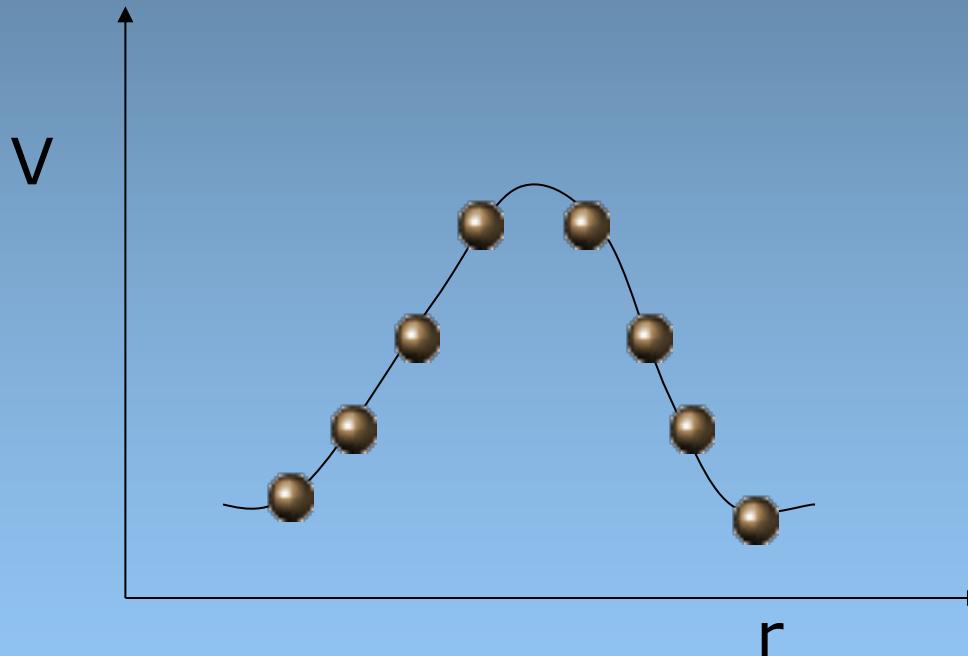
1299 àtoms mòbils





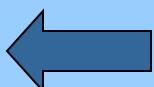
1. Estudi del Mecanisme (I): MEP

Mètode emprat. Coordenada de reacció



$$V = V_0 + k(r - r_0)^2$$

Minimització amb LBFGS
fins a RMS $|g| < 0.001 \text{ kcal}/(\text{mol}\text{\AA})$



Mec I

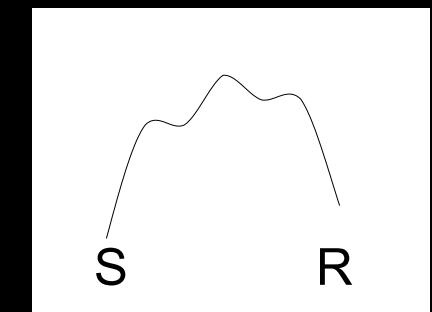
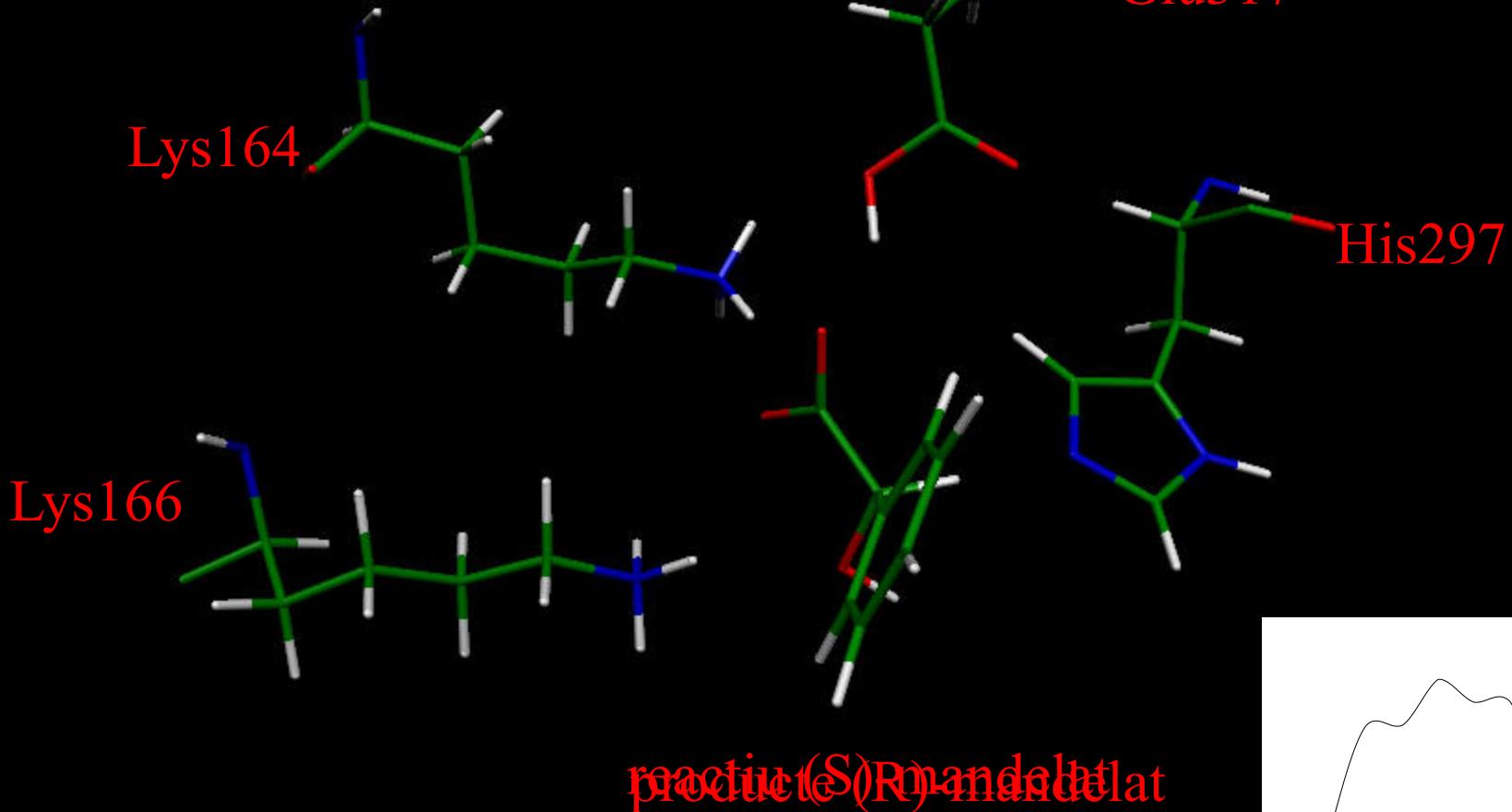


Mec II

Opt I

Opt II

1. Estudi del Mecanisme (I): MEP Mecanisme concertat



Mec I

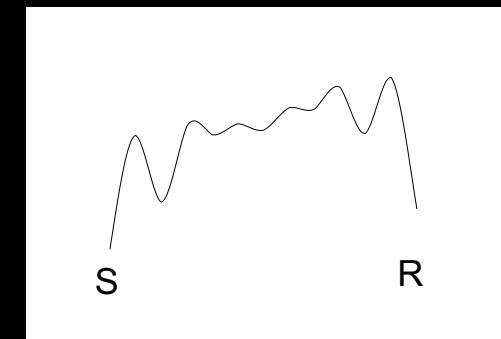
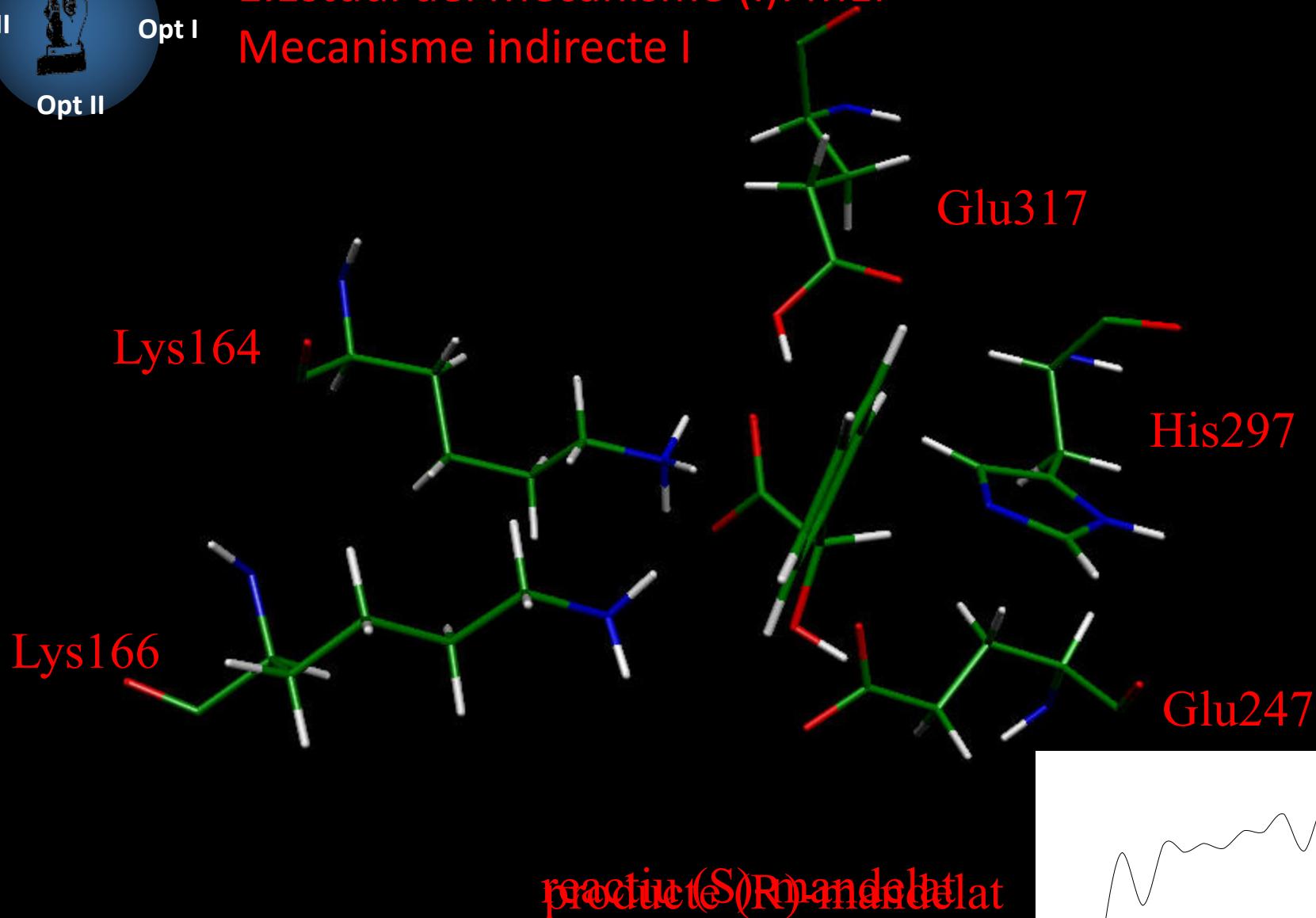


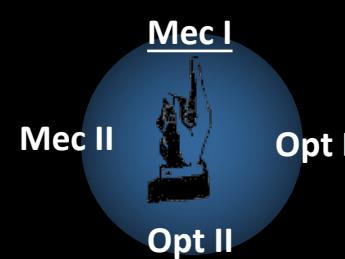
Mec II

Opt I

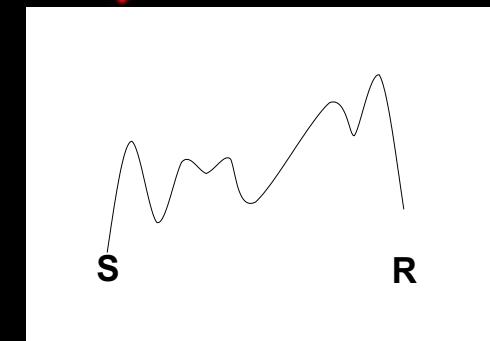
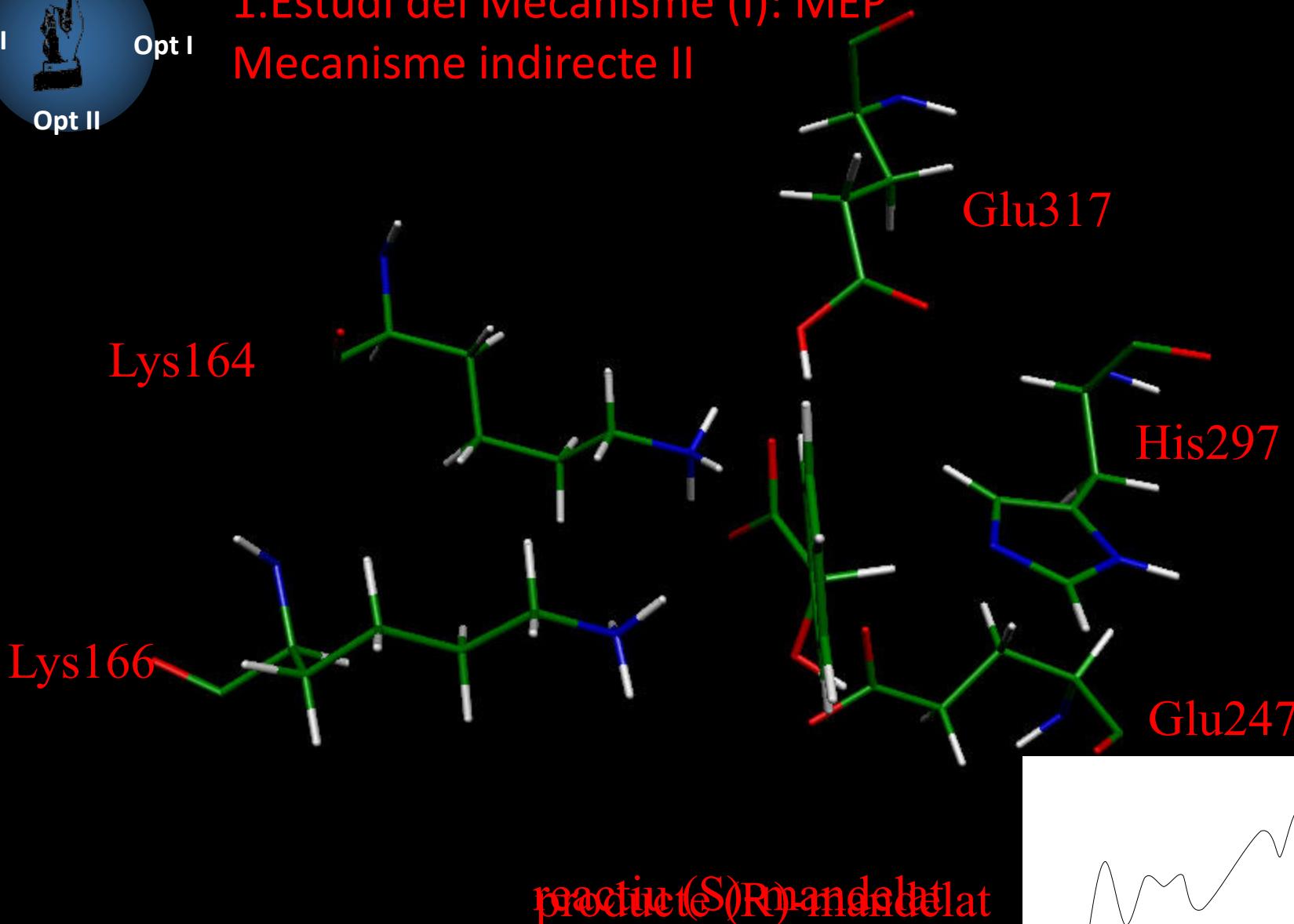
Opt II

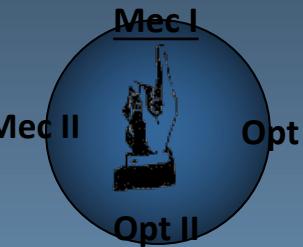
1. Estudi del Mecanisme (I): MEP Mecanisme indirecte I





1. Estudi del Mecanisme (I): MEP Mecanisme indirecte II



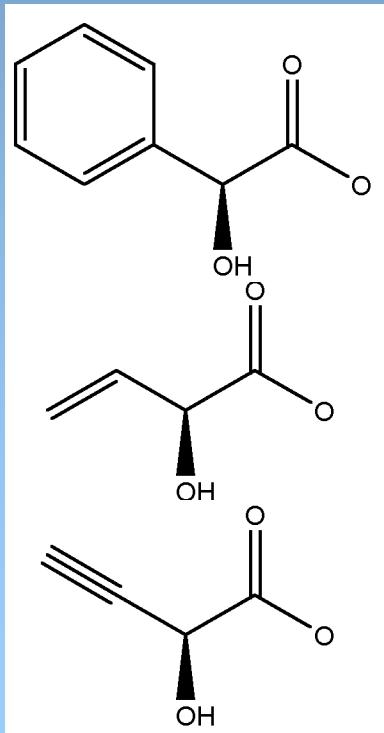


1. Estudi del Mecanisme (I): MEP

Modulació de l'activitat del substrat

Resultats

El **mecanisme concertat** és el de barrera energètica més baixa per tots els substractes

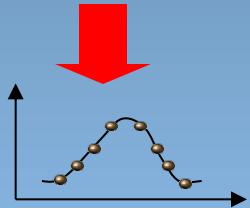
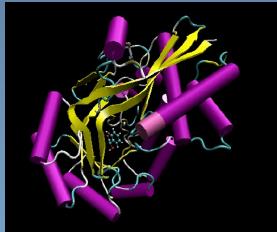


	ΔE (kcal/mol)	
mandelat	18.6	ràpida
vinilglicolat (estudi previ)	20.3	menys ràpida
propargilglicolat	21.9	lenta



1. Estudi del Mecanisme (I): MEP

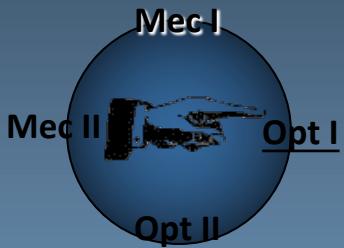
Motivació per seguir



resultats experimentals
reacció aparentment simple

Coordenada de reacció

- ✓ Deduim els mecanismes sobre el MEP
- ✗ Necessitem trobar les barreres de reacció més acuradament
- ✗ Cal incorporar els efectes de temperatura



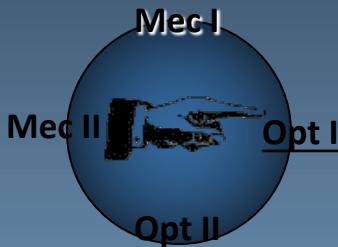
0.Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa

1.Estud del mecanisme (I): MEP

→ 2.Disseny d'un optimitzador (I):
Cerca de punts estacionaris amb RFO en QM/MM

3.Disseny d'un optimitzador (II): Micro-iteratiu

4.Estud del mecanisme (II): Energia lliure



2.Disseny d'un optimitzador (I):RFO en QM/MM Repàs de mètodes d'optimització de 2n ordre

Newton-Raphson

$$\Delta q_k = -B_k^{-1} g_k$$

$-B_k$: Matriu Hessiana

g_k : Vector Gradient iteració k

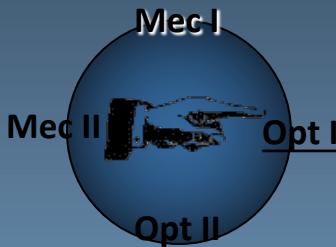
Rational Function Optimization (RFO)

Augmented Hessian:
dimensió (n+1)

$$\begin{pmatrix} 0 & \mathbf{g}_k^T \\ \mathbf{g}_k & \mathbf{B}_k \end{pmatrix}$$

$$\Delta q_k = \frac{1}{V_{1,v}^{(k)}} \mathbf{v}_v^{(k)} \quad \left\{ \begin{array}{l} v=1 \text{ per mínims} \\ v=2 \text{ per estats de transició} \end{array} \right\}$$

$$\mathbf{v}_v^{(k)} = (v_{2,v}^{(k)}, \dots, v_{n+1,v}^{(k)})$$



2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM

Problemes quan optimitzem sistemes grans

I. Cal moure molts àtoms

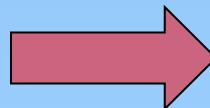
- Les interaccions substrat-enzim són de llarg abast

II. Trigarem molts steps

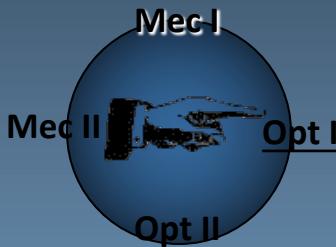
- Treballar amb coordenades cartesianes allarga molt el procés

III. Treballar amb la Hessiana

- càcul inicial B_0 $O(N)$ CPU
- emmagatzemar-la $O(N^2)$ memòria
- diagonalitzar-la $O(N^3)$ CPU

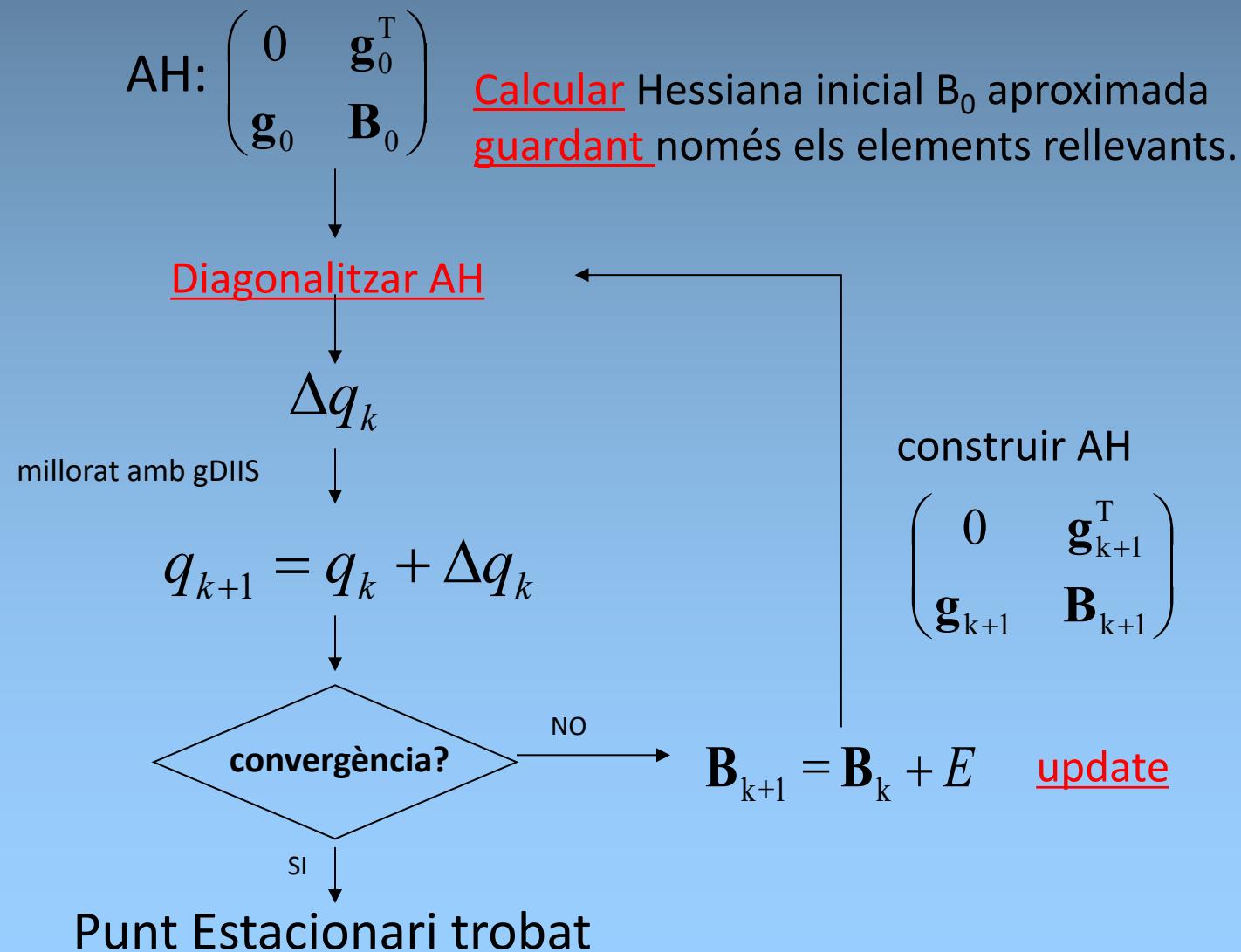


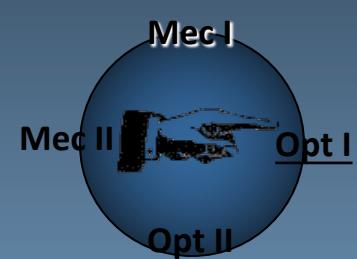
Necessitem optimitzadors eficients però que escalin linealment amb N



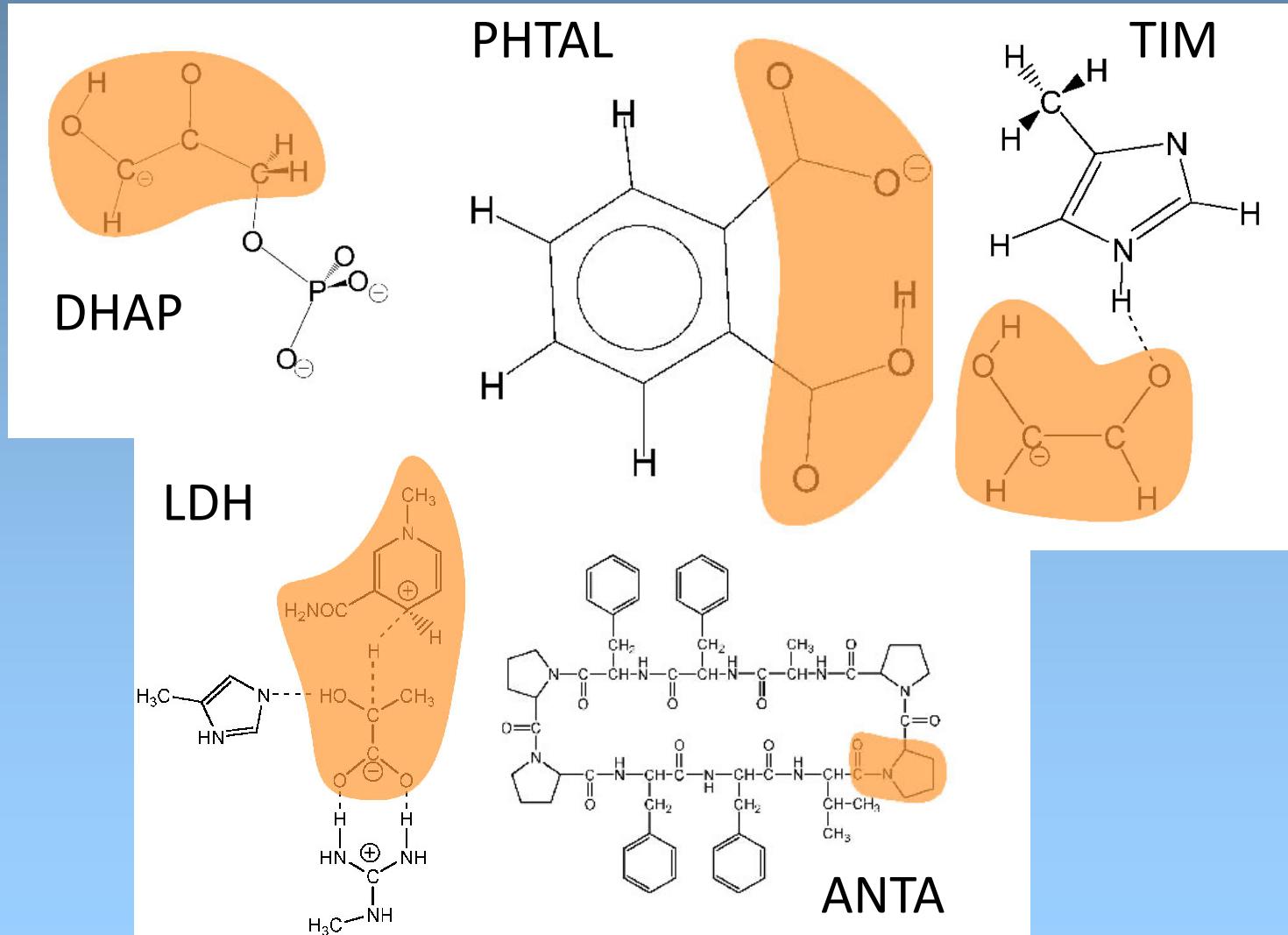
2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM

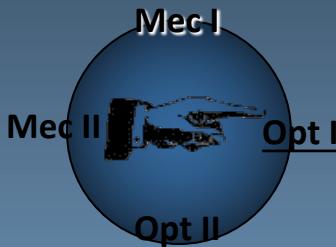
Esquema general pel RFO: implementació en ROAR





2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM Testejant el mètode

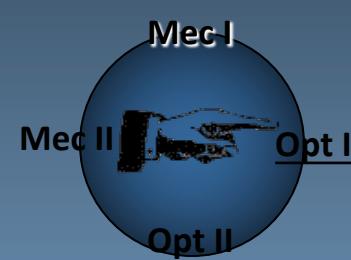




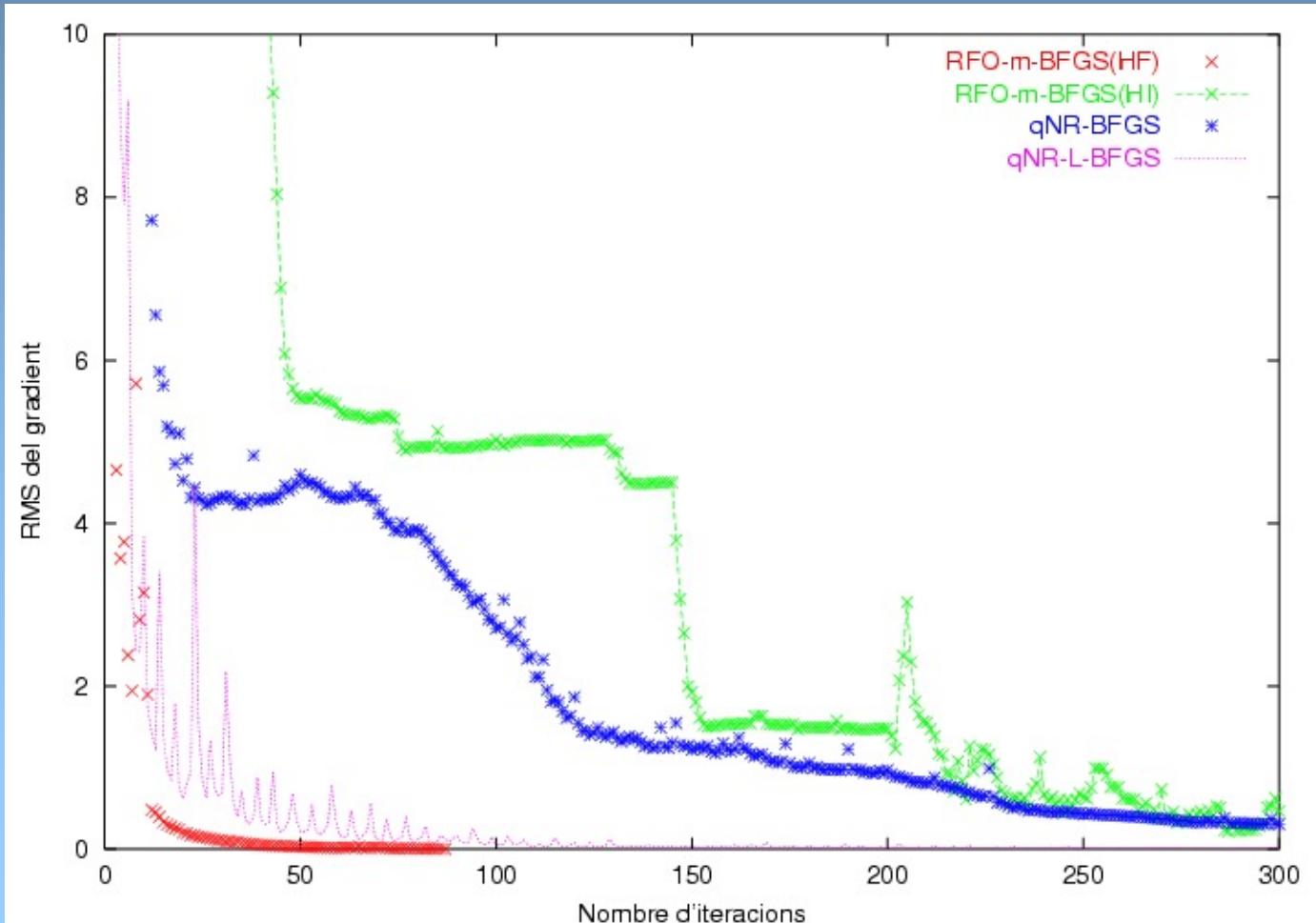
2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM Cerca d'estats de transició

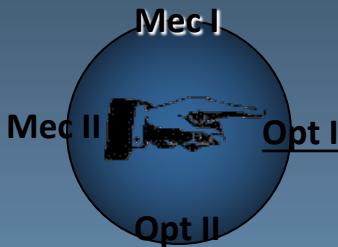
	Nombre de coordenades QM + MM	Norma de gradient inicial	ΔE (kcal/mol)	RFO-Powell(HF)
DHAP	30+15	6.86	22.82	56/59
PHTAL	27+30	1.18	4.03	39/54
TIM	21+36	11.17	3.70	65/88
LDH	165+0	6.78	4.19	614/636
LDH	36+129	3.24	0.87	316/392
ANTA	0+270	8.04	7.78	291/315
ANTA	48+249	2.10	1.25	421/598

Steps/Evaluacions d'energia



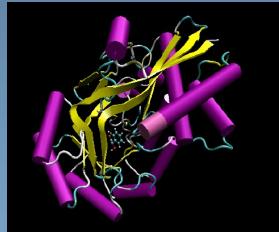
2.Disseny d'un optimitzador (I):RFO en QM/MM Comparació amb altres minimitzadors





2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM

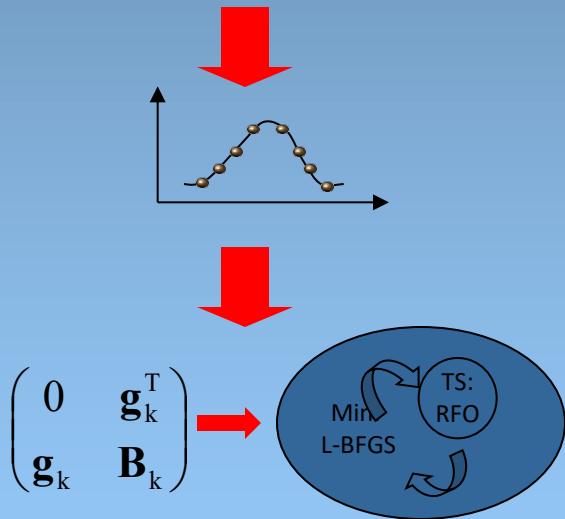
Motivació per seguir



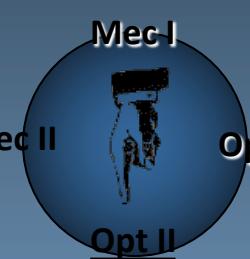
resultats experimentals
reacció aparentment simple

Coordenada de reacció

- ✓ Deduim els mecanismes sobre el MEP
- ✗ Necessitem trobar les barreres de reacció més acuradament



- ✗ Les equacions RFO no es poden resoldre per sistemes grans
- ✓ Les acoblem a un mètode micro-iteratiu



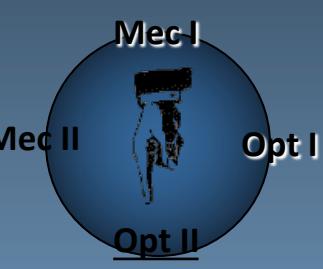
0. Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa

1. Estudi del mecanisme (I): MEP

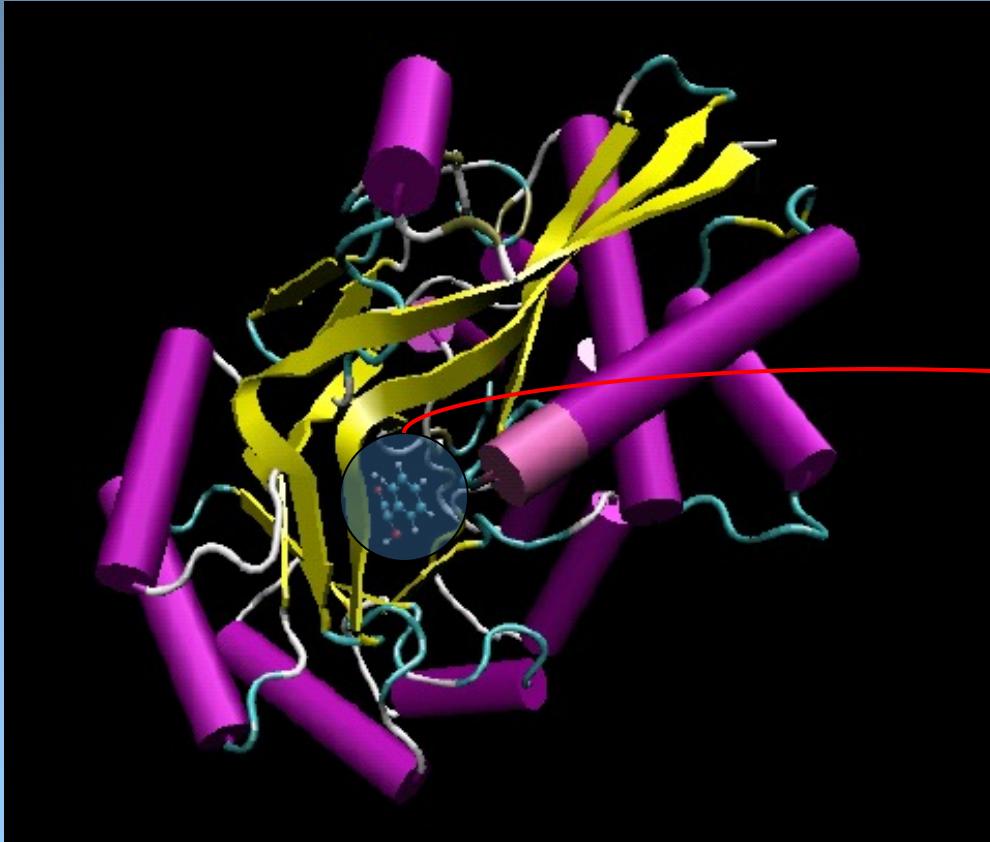
2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM

→ 3. Disseny d'un optimitzador (II):
Desenvolupament d'un mètode micro-iteratiu

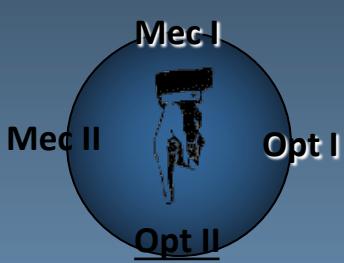
4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure



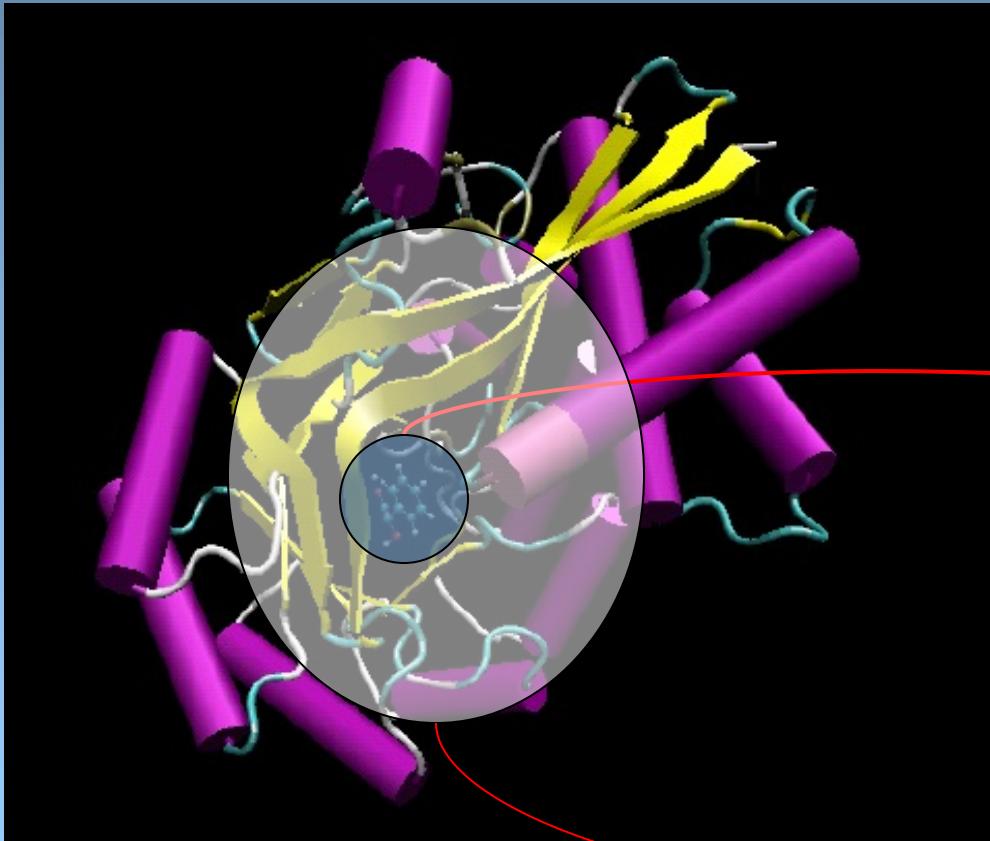
3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu Esquema general



$$\Delta q_{cor} = -B_{cor}^{-1} g_{cor}$$

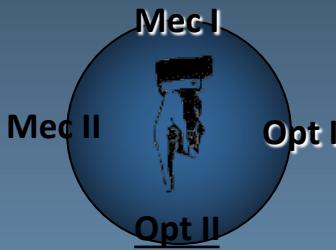


3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu Esquema general

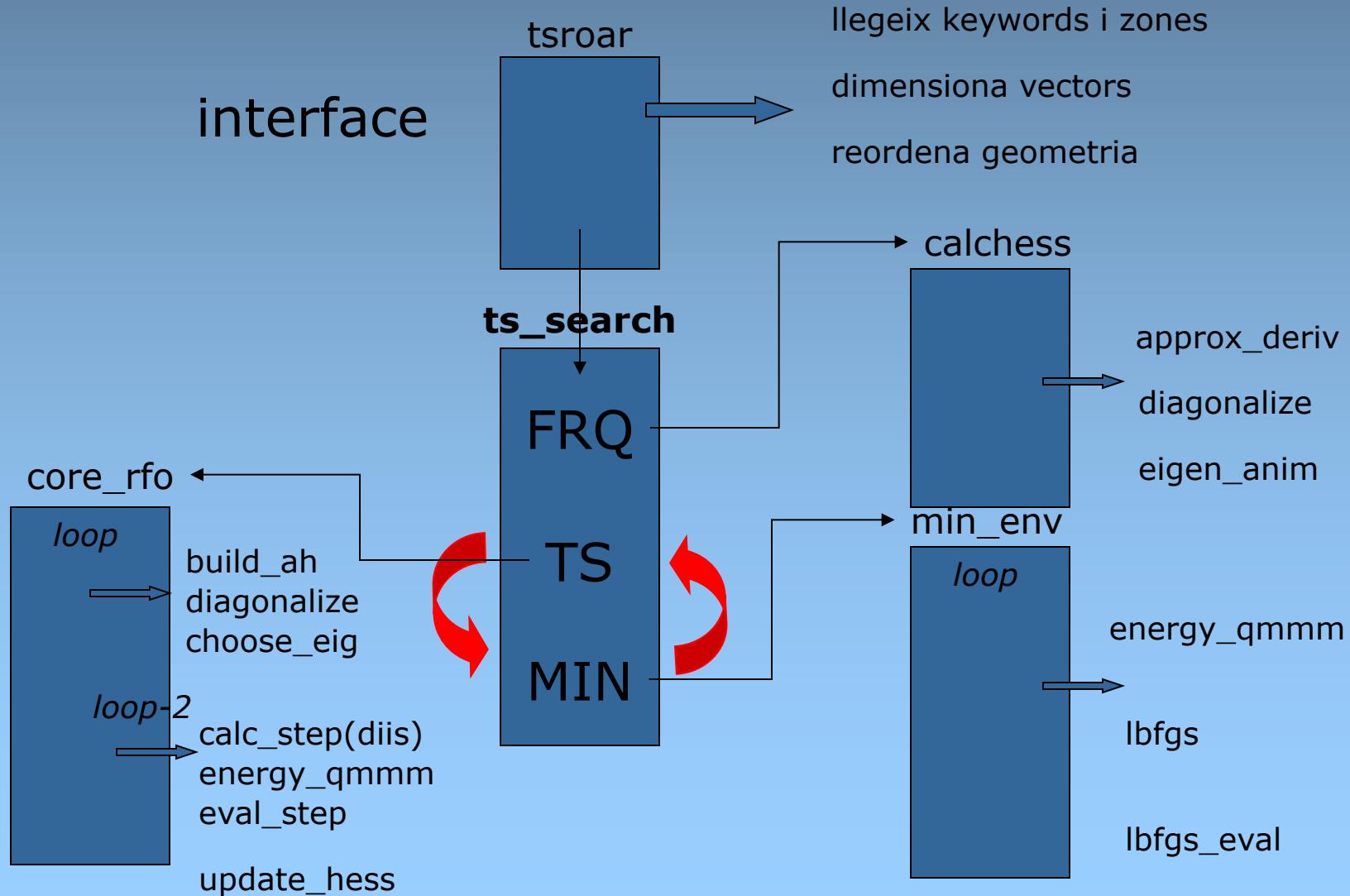


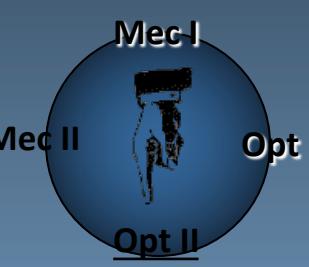
$$\Delta q_{cor} = -B_{cor}^{-1} g_{cor}$$

$$\Delta q_{entorn} = \alpha \frac{-g_{entorn}}{|g_{entorn}|}$$

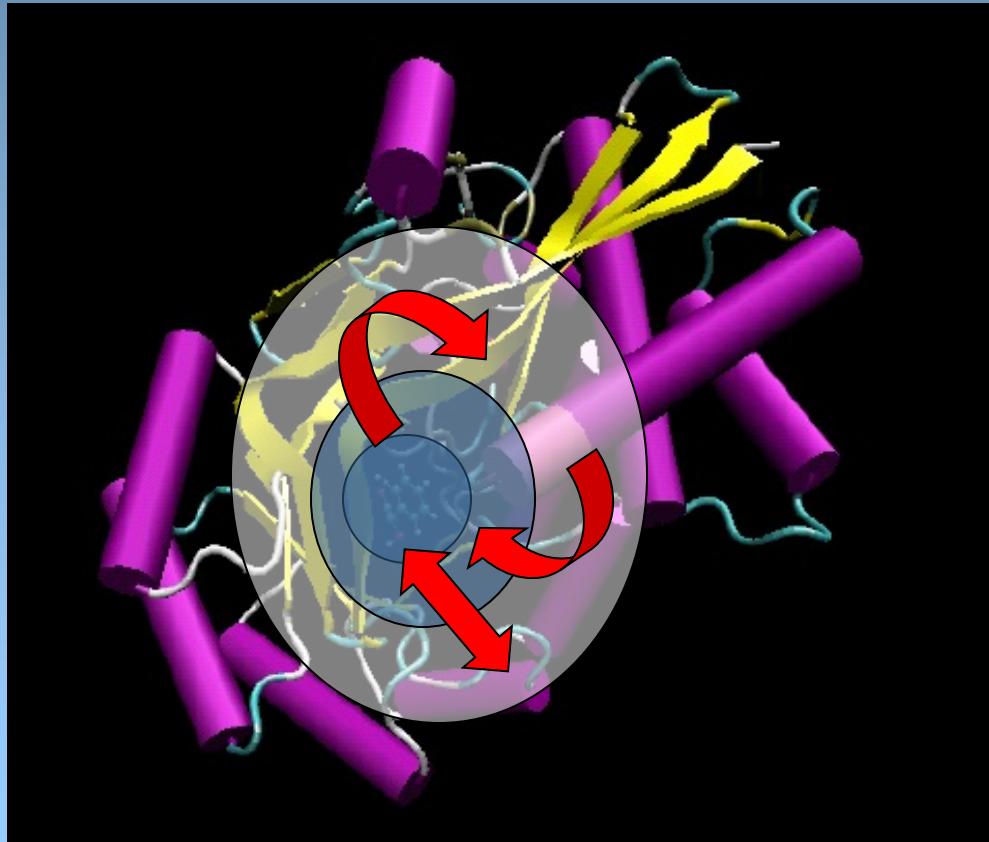



3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteració Implementació

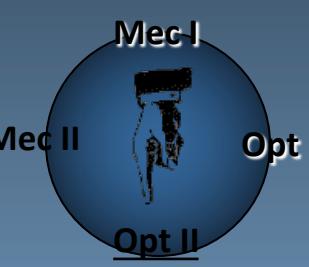




3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu Opcions

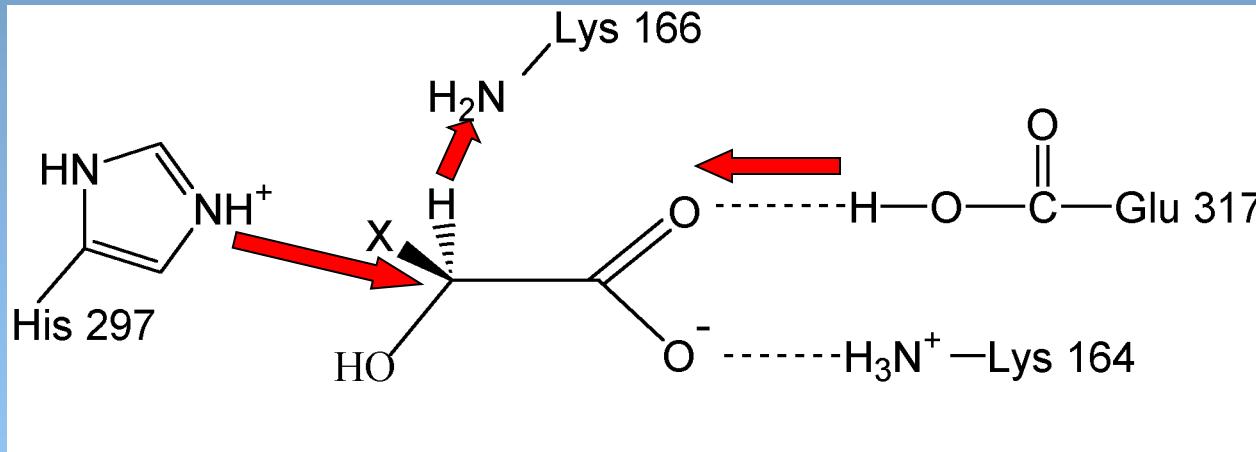


1. Grandària del cor
2. Freqüència de les micro-iteracions
3. Interacció cor/entorn



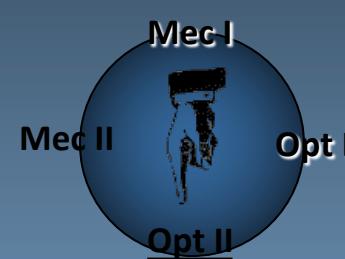
3. Disseny d'un optimitzador (II): Micro-iteració Testejant les opcions en dues reaccions tipus del Mandelat Racemasa

Propargil glicolat



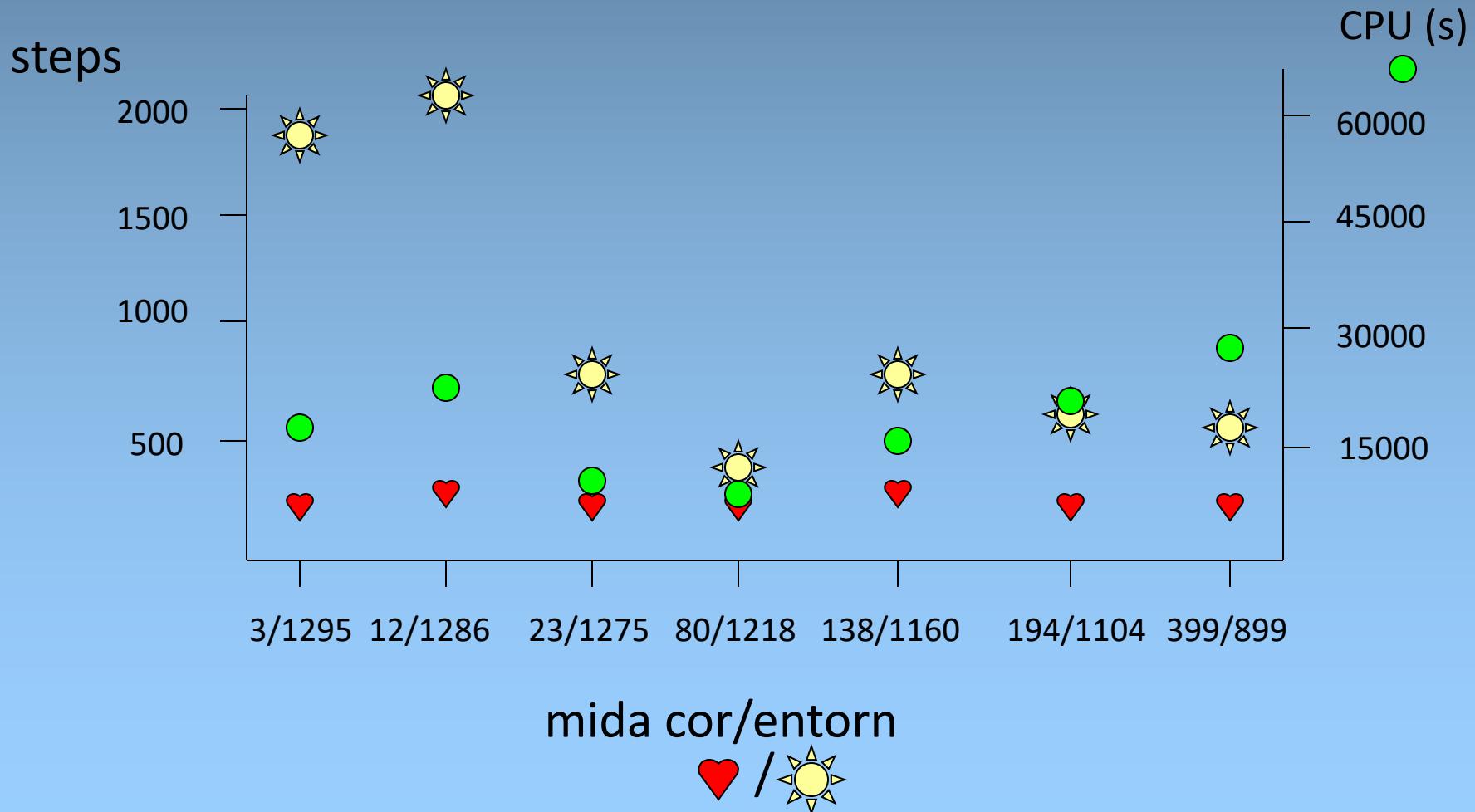
transferència protònica: pocs àtoms implicats

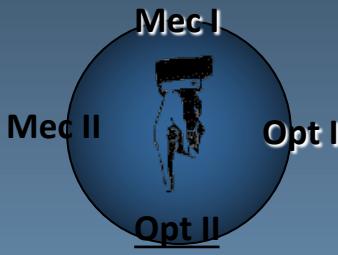
inversió de configuració: molts àtoms implicats



3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu Influència de la mida del cor

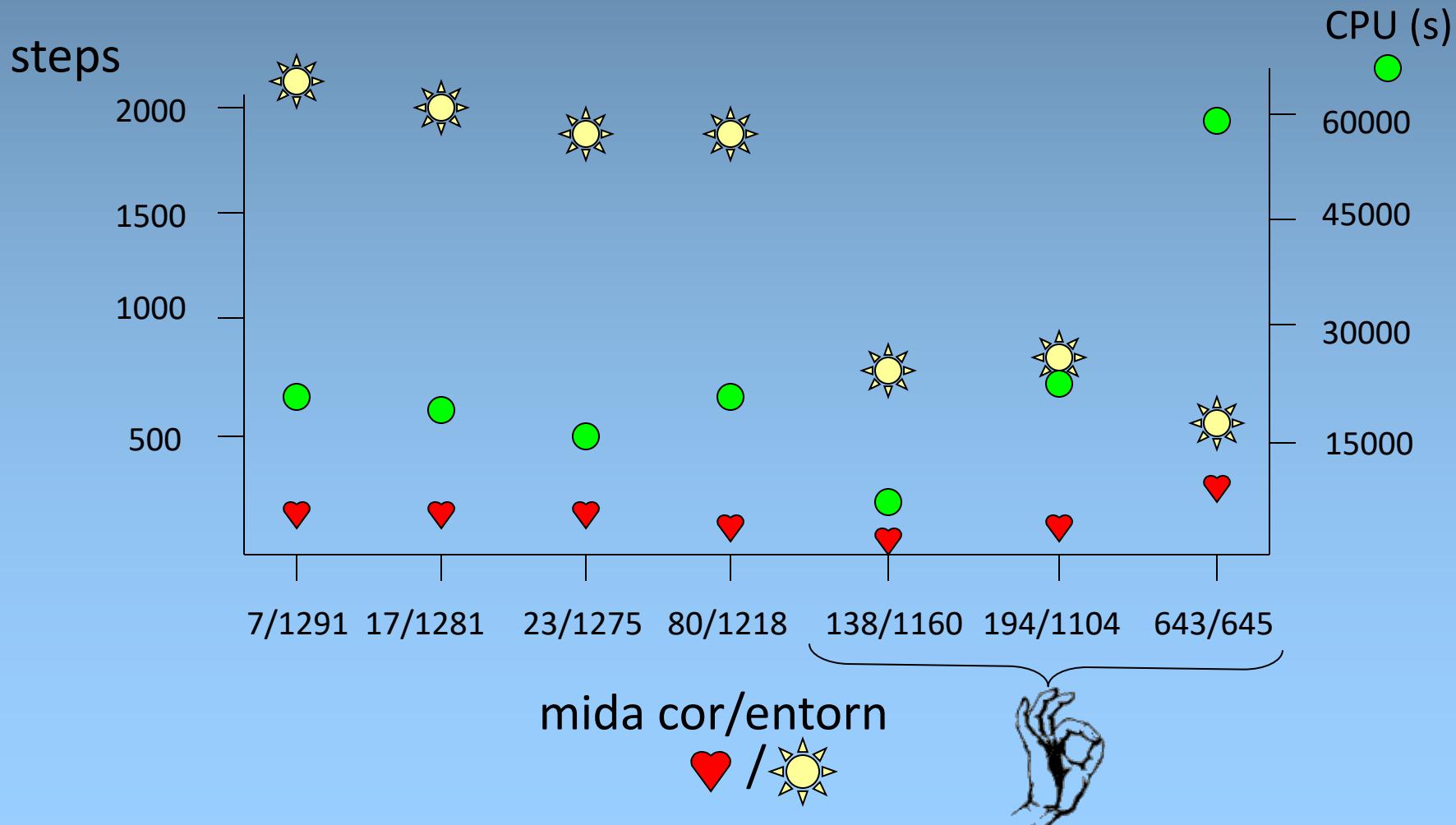
transferència protònica

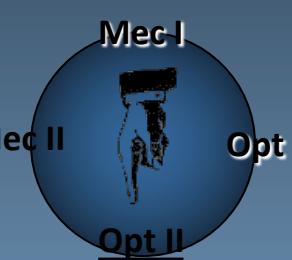




3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteració Influència de la mida del cor

Inversió de configuració

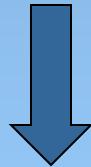




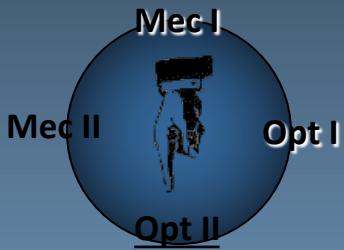
3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu Influència de la freqüència d'iteracions

(1) Minimitzar l'entorn a cada pas de la cerca del TS

(2) Minimitzar l'entorn cada final de cerca del TS

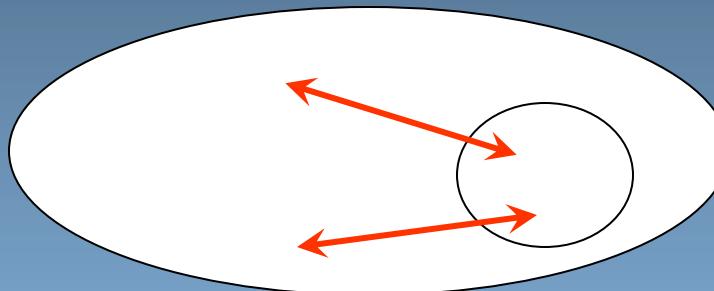


S'obtenen resultats semblants però es recomana
l'opció (2)



3. Disseny d'un optimitzador (II): Micro-iteració

Influència de la interacció entre cor i entorn



QM \leq cor

$$\begin{aligned}
 E = & \cancel{\left\langle \Phi / H_{el} / \Phi \right\rangle} - \sum_{i,m} \left\langle \Phi \left| \frac{q_m}{r_{im}} \right| \Phi \right\rangle + \sum_{j,m} \frac{Z_j q_m}{r_{jm}} + \\
 & + \sum_{atoms} \left(\frac{A_{mj}}{r_{mj}^{12}} - \frac{B_{mj}}{r_{mj}^6} \right) \\
 & \sum_{enllaç} k_r (r - r_0)^2 + \\
 & \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \\
 & \sum_{dihedres} k_\phi (n\phi - \delta)^2 \\
 & + \sum_{atoms} \frac{q_m q_n}{r_{m,n}} + \sum_{atoms} \left(\frac{A_{mn}}{r_{mn}^{12}} - \frac{B_{mn}}{r_{mn}^6} \right)
 \end{aligned}$$

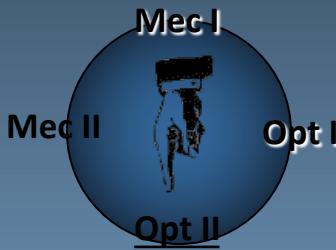
ESP/MM

QM

QM/MM

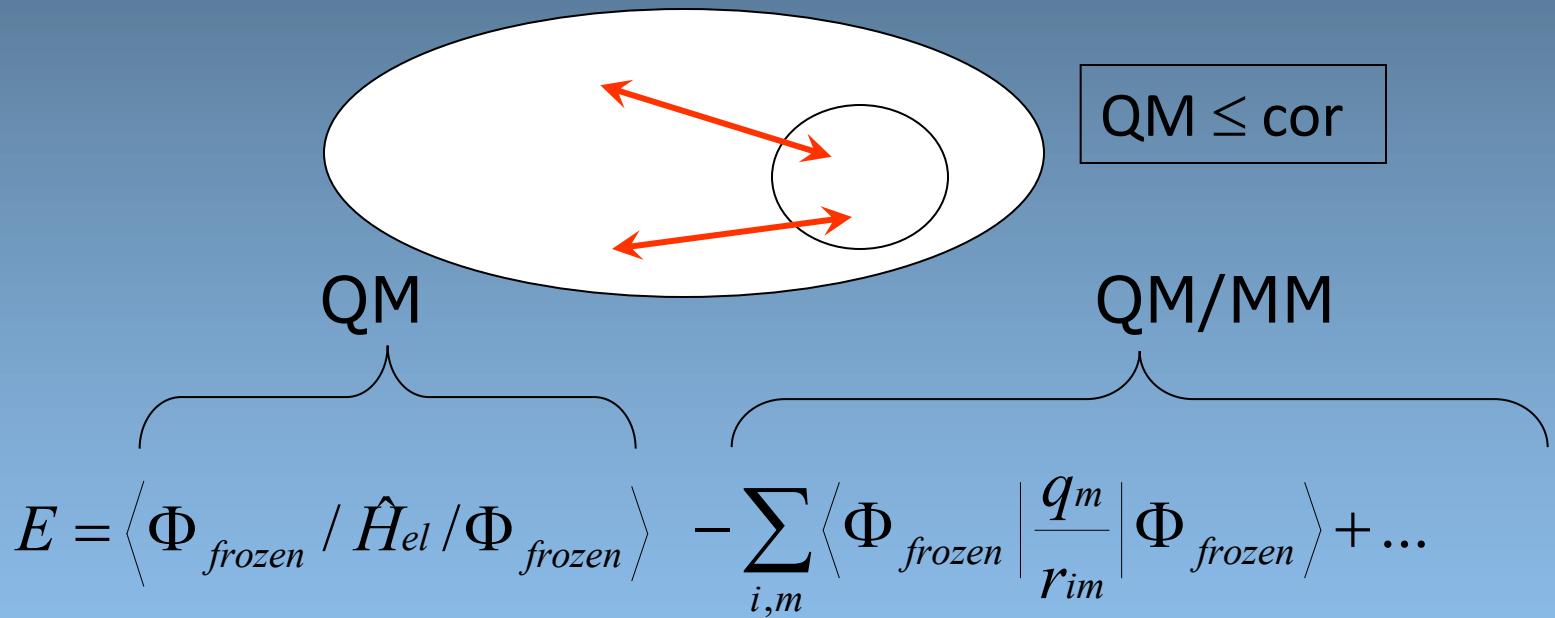
MM

ESP/MM



3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu

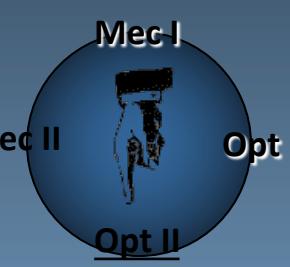
Influència de la interacció entre cor i entorn



Guardem la funció d'ona prèviament convergida suposant que la nova configuració de q_m no la perturbarà diferentment

Totes les integrals es guarden ja que només cal actualitzar una part del terme monoelectrònic

QM(1SCF)/MM

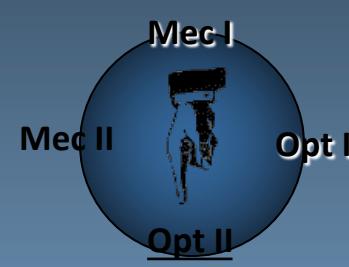


3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu Influència de la interacció entre cor i entorn

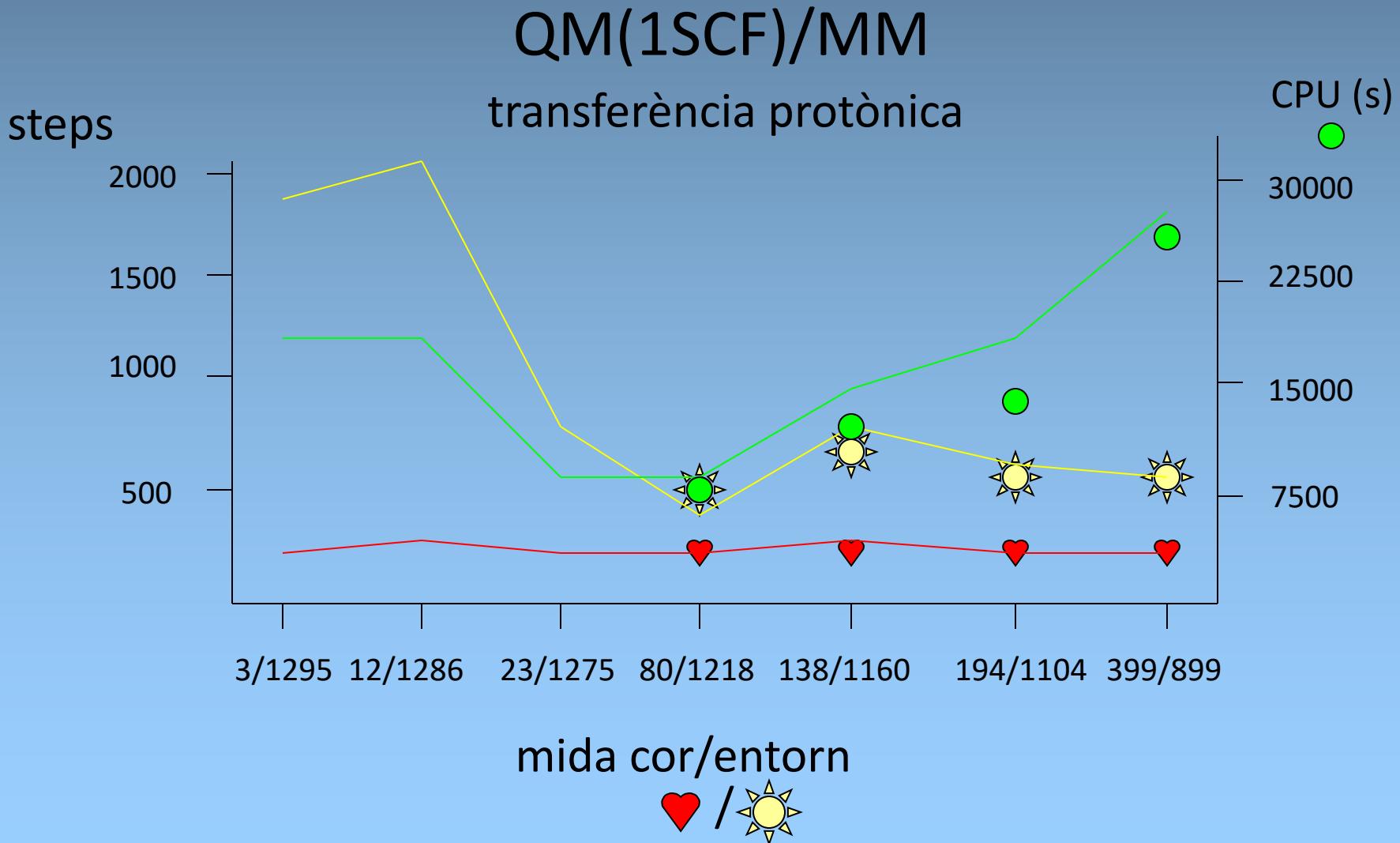
ESP/MM

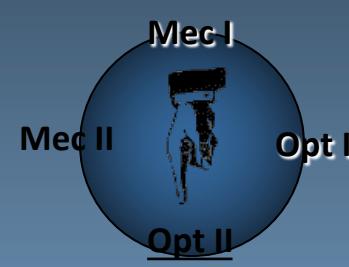


Les optimitzacions
no convergien

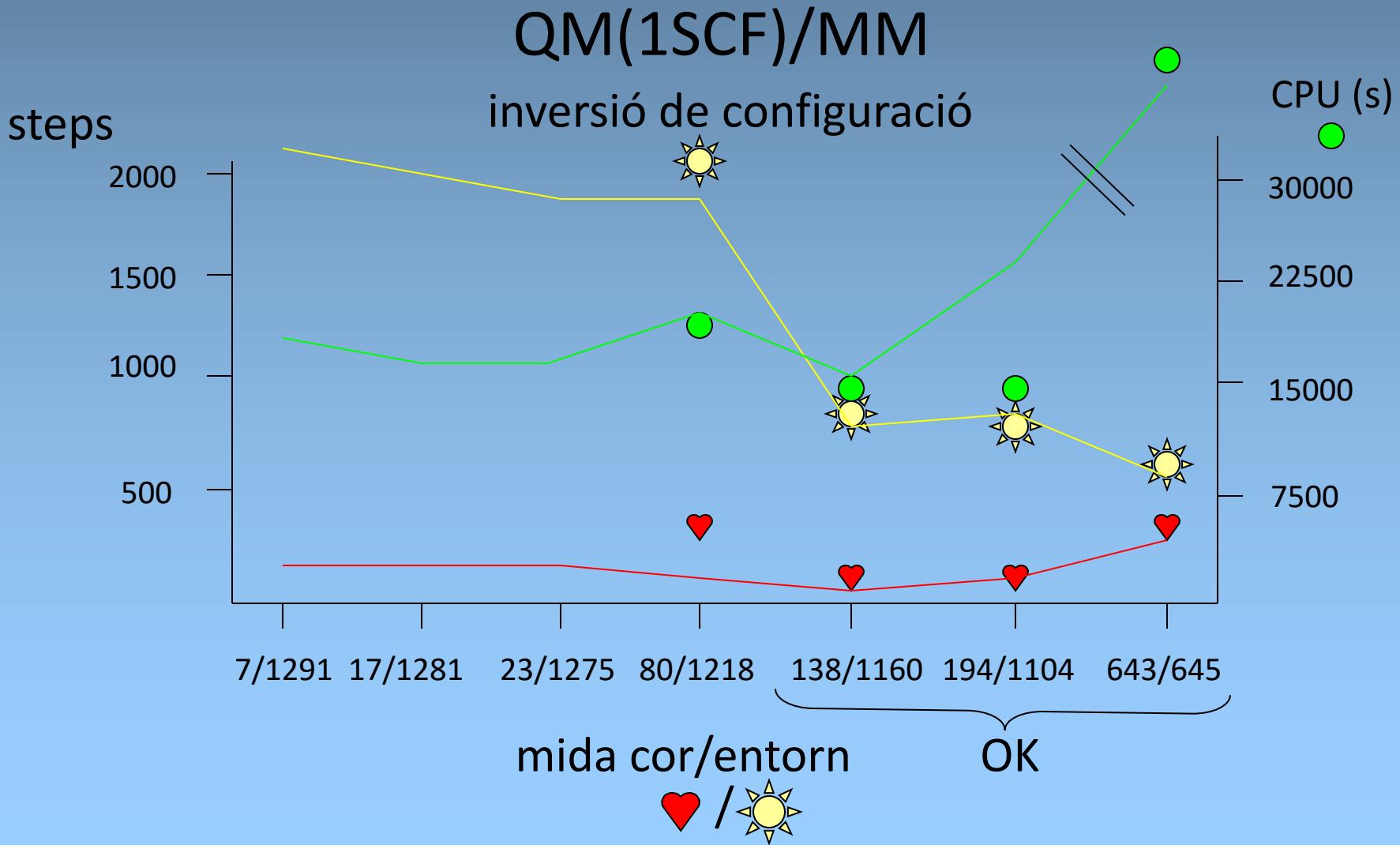


3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteració Influència de la interacció entre cor i entorn



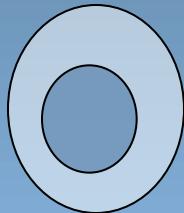


3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteració Influència de la interacció entre cor i entorn



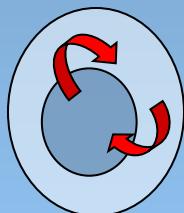


3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu Resum d'opcions



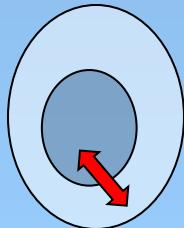
Mida del cor:

Hi ha una mida intermitja que té poc acoblament i una Hessiana tractable



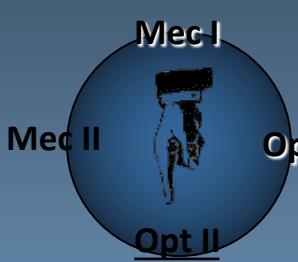
Alternança entre processos

Es recomana minimitzar a cada final de cerca de TS



Interacció:

L'aproximació QM(1SCF)/MM permet obtenir el mateix resultat amb un temps computacional menor

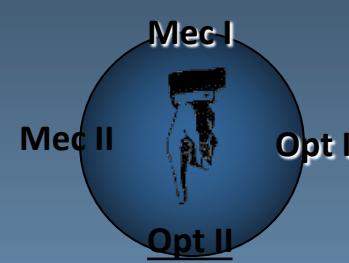


3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu És important la localització? Estudi comparatiu

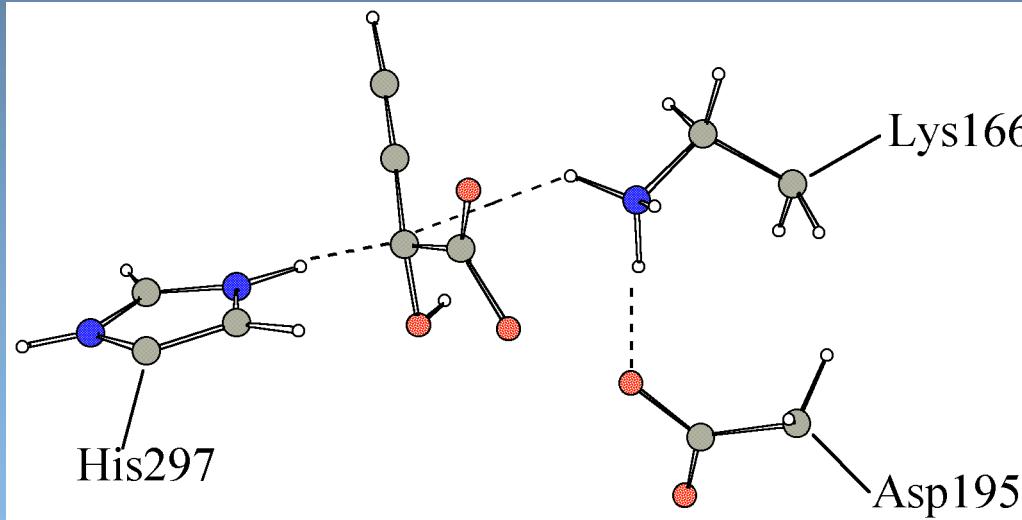
Coordenada vs TSsearch

substracte mandelat				substracte propargil		
Estruct	Indirecte I	Indirecte II	Concertat	Indirecte I	Indirecte II	Concertat
S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TS1	17.77 (18.24)	17.69 (17.78)		15.90 (19.66)	11.83 (11.24)	
TS2	19.52 (19.65)	14.77 (14.46)		19.88 (19.92)	15.33 (15.32)	
TS3	20.04 (20.06)	14.55 (14.95)		22.18 (22.20)	16.96 (16.99)	
TS4	22.54 (22.56)		20.19 (19.50)	30.12 (22.20)	28.11 (20.68)	22.05 (21.98)
TS5	25.15 (25.75)	23.57 (23.83)		23.16 (22.60)	19.23 (20.08)	
TS6	27.22 (27.28)	28.14 (28.18)		23.89 (24.35)	26.45 (24.59)	
R	6.74	6.74	4.63	3.34	3.34	3.34

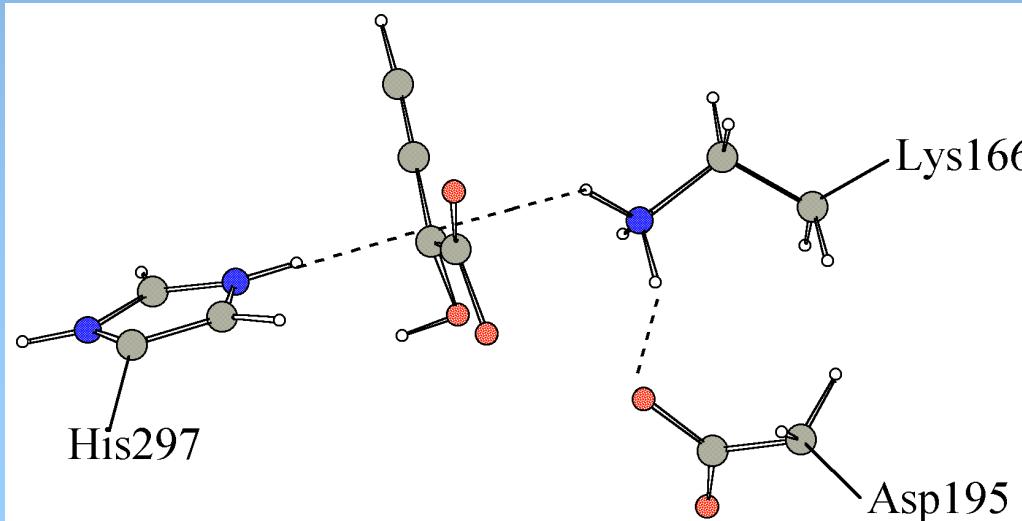
Entre parèntesi es dona l'energia de les estructures refinades



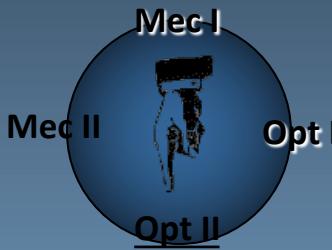
3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteració És important la localització? Estudi comparatiu



Coordenada

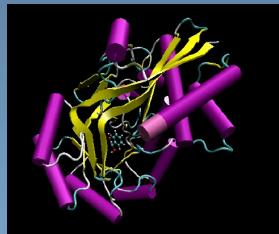


TSsearch



3.Disseny d'un optimitzador (II):Micro-iteratiu

Motivació per seguir



resultats experimentals
reacció aparentment simple

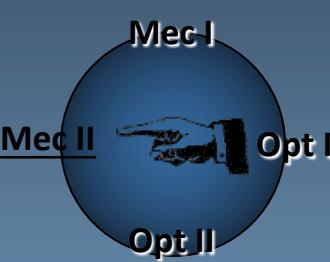
Coordenada de reacció

- ✓ Deduim els mecanismes sobre el MEP
- ✗ Necessitem trobar les barreres de reacció més acuradament

$$\begin{pmatrix} 0 & \mathbf{g}_k^T \\ \mathbf{g}_k & \mathbf{B}_k \end{pmatrix}$$

Desenvolupament i aplicació del TSsearch

- ✓ Trobem el camí de reacció correctament
- ✗ Cal incorporar els efectes de temperatura



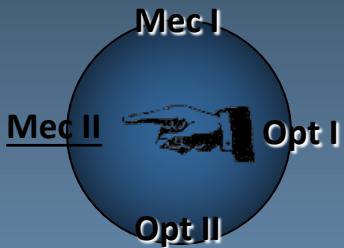
0. Introducció: l'enzim Mandelat Racemasa

1. Estudi del mecanisme (I): MEP

2. Disseny d'un optimitzador (I): RFO en QM/MM

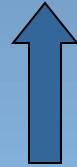
3. Disseny d'un optimitzador (II): Micro-iteració

→ 4. Estudi del mecanisme (II):
Càlculs d'energia lliure de la reacció catalitzada
pel Mandelat Racemasa



4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Mètode emprat

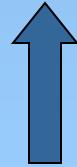
Càlculs d'energia lliure: umbrella sampling



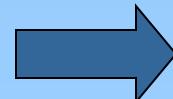
Dinàmica Molecular: SBMD

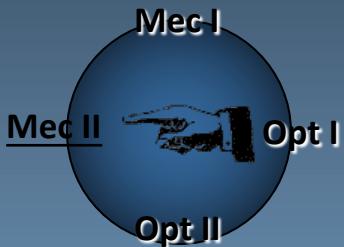


Superfície d'Energia Potencial: QM/MM

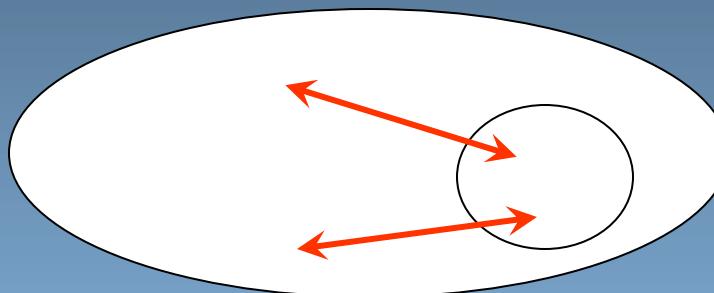


Estructura: PDB





4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Mètode emprat: QM/MM



QM

QM/MM

MM

$$E = \left\langle \Phi / \hat{H}_{el} / \Phi \right\rangle - \sum_{i,m} \left\langle \Phi \left| \frac{q_m}{r_{im}} \right| \Phi \right\rangle + \sum_{j,m} \frac{Z_j q_m}{r_{jm}} + \sum_{atoms} \left(\frac{A_{mj}}{r_{mj}^{12}} - \frac{B_{mj}}{r_{mj}^6} \right)$$

semiemp: AM1,PM3
semiemp-SRP
EVB, HF, DFT...

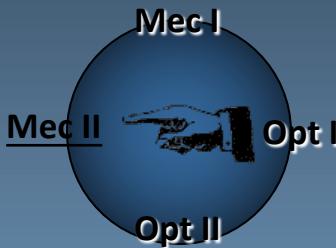
Frontera:
Link atom
LSCF
GHO
...

q_m : charmm
amber
mulliken
resp

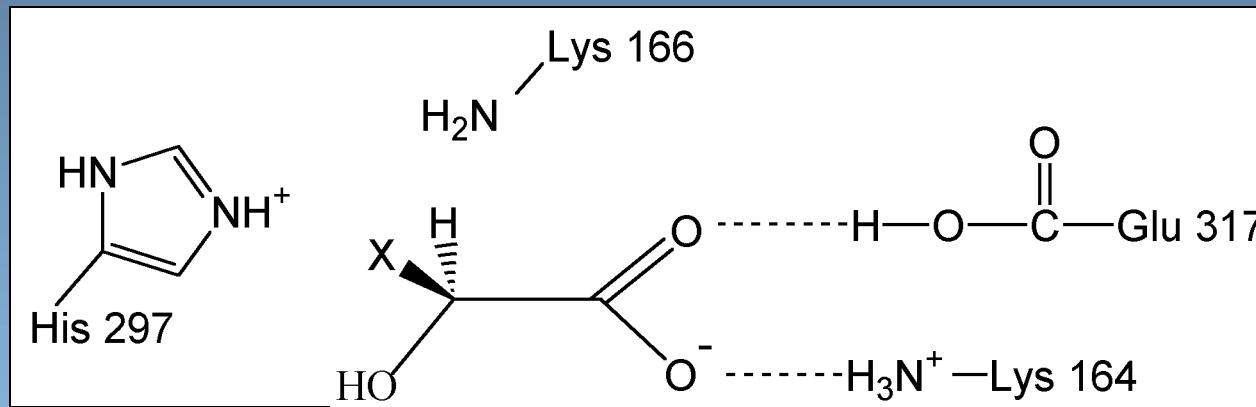
A,B: charmm
amber
optimitzats

$$\sum_{enllaç} k_r(r - r_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedres} k_\phi(n\phi - \delta)^2 + \sum_{atoms} \frac{q_m q_n}{r_{m,n}} + \sum_{atoms} \left(\frac{A_{mn}}{r_{mn}^{12}} - \frac{B_{mn}}{r_{mn}^6} \right)$$

charmm
amber
gromos
opls



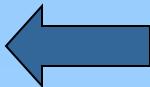
4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Mètode emprat: QM/MM

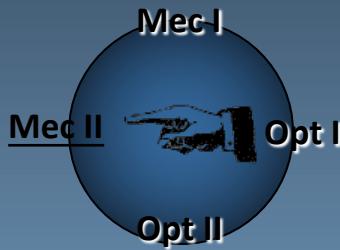


X: mandelat

63 àtoms PM3-GHO / 8208 CHARMM

Estudi del mecanisme concertat

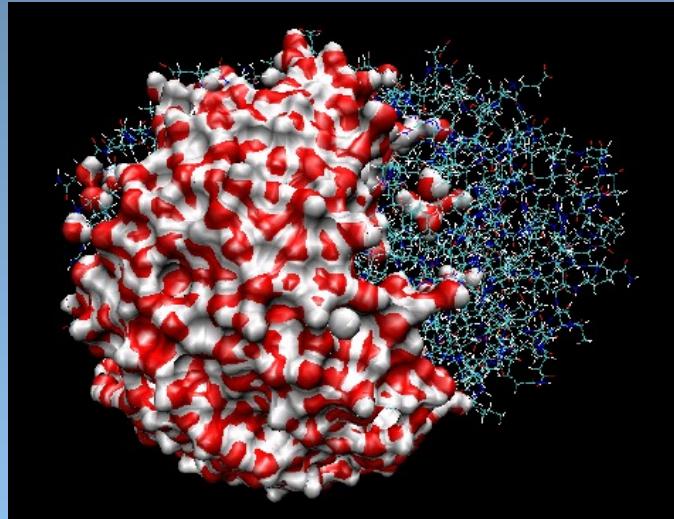




4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure

Mètode emprat: Dinàmica molecular SBMD

Stochastic Boundary MD Esfera d'aigües de 24 Å



0-20: zona de Newton MD

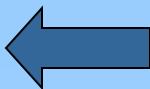
20-24: zona de Langevin MD

restricció harmònica+fricció + estocàstic

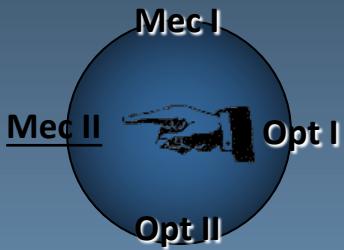
$$m_i \ddot{q}_i(t) = F_i - m_i \Omega_i^2 [q_i(t) - q_i^{ref}] - m_i \beta_i \dot{q}_i(t) + f_i(t)$$

24-...: zona fixada

cada finestra: 15ps eq / 50ps sampling



1ps = 1000 energy & gradient



4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Mètode emprat: Umbrella sampling

Escombrem R_c
amb increments
de 0.2 Å (finestres)

$$V_{\text{tot}} = V_{\text{QM/MM}} + k(R_c - R_{c_0})^2 + P_x(R_c)$$

Dinàmica molecular



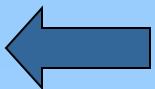
$$\langle \rho(R_{c_0}) \rangle = \frac{\int \delta(R_c(r) - R_{c_0}) \exp[-V_{\text{tot}}(r)/K_B T] dr}{\int \exp[-V_{\text{tot}}(r)/K_B T] dr}$$

*Tractament estadístic
(WHAM)*

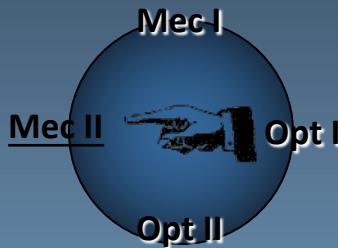


$$\text{PMF} = f(R_c) !!!$$

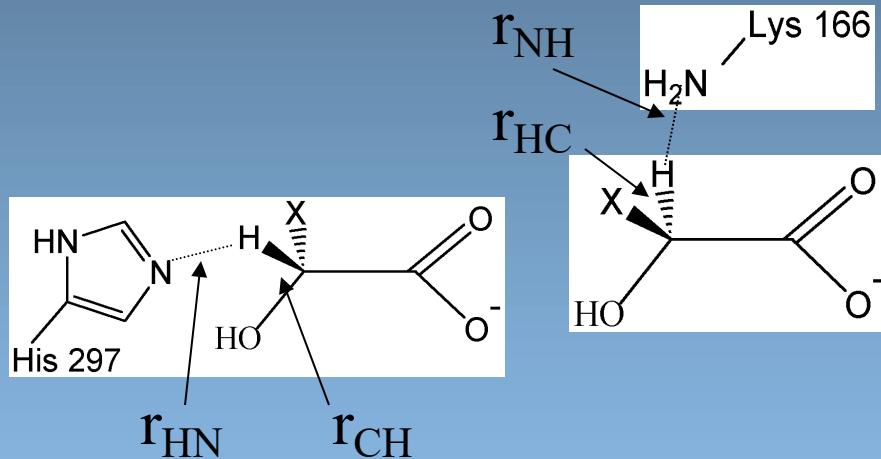
$$W(R_c) = -RT \ln \rho(R_c) + C$$



32 finestres \times 30 hores de CPU \longrightarrow 960 hores

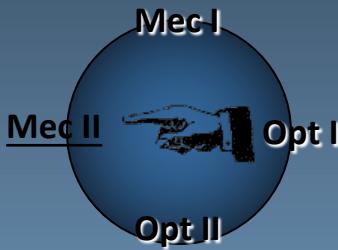


4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Elecció d'una coordenada de reacció

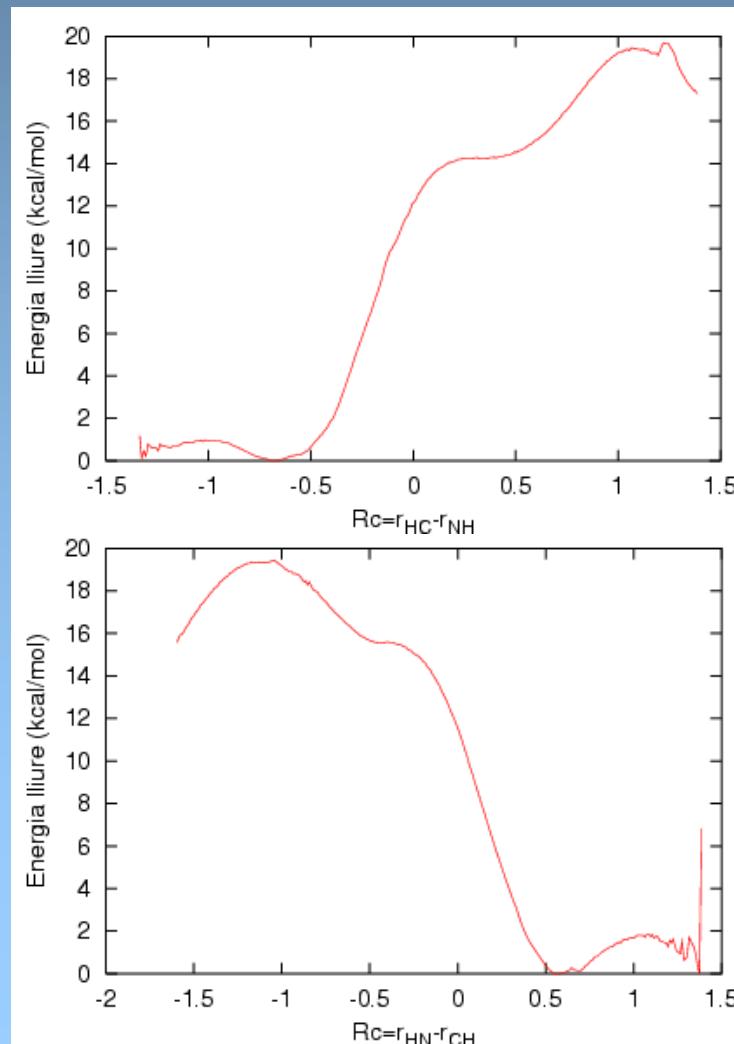
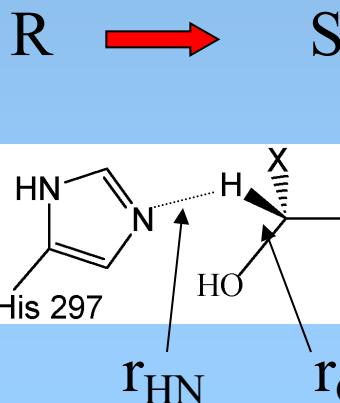
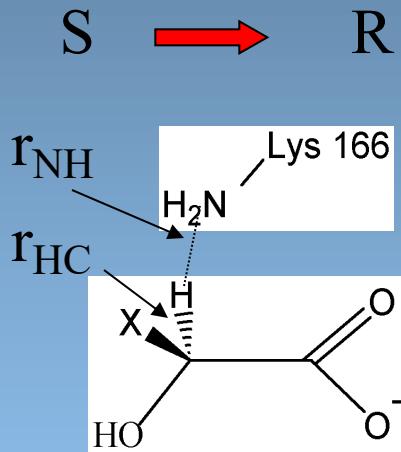


	Dades del TSsearch			
	r_{NH}	r_{HC}	r_{CH}	r_{HN}
S	1.804	1.158	2.927	0.995
Sts	1.194	1.522	2.865	0.996
Is	1.151	1.570	2.845	0.995
TS	1.011	2.258	2.093	1.013
Ir	1.055	2.612	1.607	1.117
Rts	1.004	2.736	1.509	1.200
R	1.004	2.868	1.165	1.772

R_c	$r_{HC}-r_{NH}$	$r_{HN}-r_{CH}$	$r_{HC}-r_{CH}$	$r_{HC}-r_{NH}$ $+r_{HN}-r_{CH}$	$r_{NC}-r_{CN}$	Improper Θ	ΔE
S	-0.646	-1.932	-1.769	-2.578	-0.043	0.421	0.0
Sts	-0.328	-1.869	-1.343	-1.541	-0.220	0.412	13.81
Is	0.419	-1.850	-1.275	-1.431	-0.201	0.398	13.79
TS	1.247	-1.080	0.165	0.167	0.992	-0.058	19.47
Ir	1.607	-0.490	1.005	1.117	1.828	-0.306	16.46
Rts	1.732	-0.309	1.227	1.423	2.057	-0.312	16.75
R	1.864	-0.607	1.703	2.471	2.543	-0.350	4.61

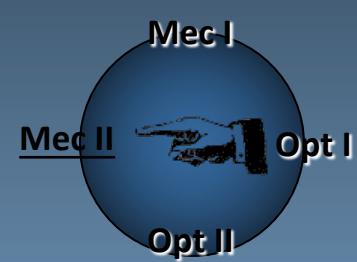


4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Coordenades de reacció: dues distàncies

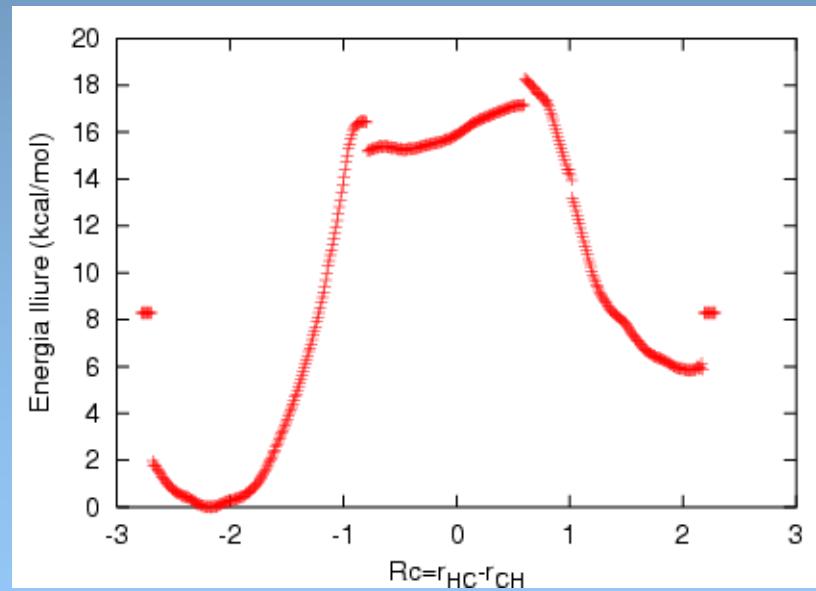
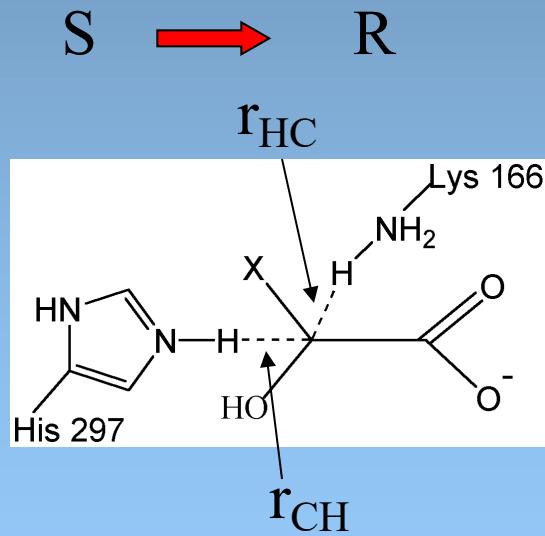


$$Rc = r_{HC} - r_{NH}$$

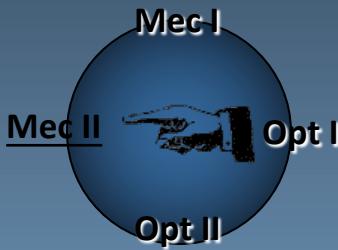
$$Rc = r_{CH} - r_{HN}$$



4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Coordenades de reacció: dues distàncies

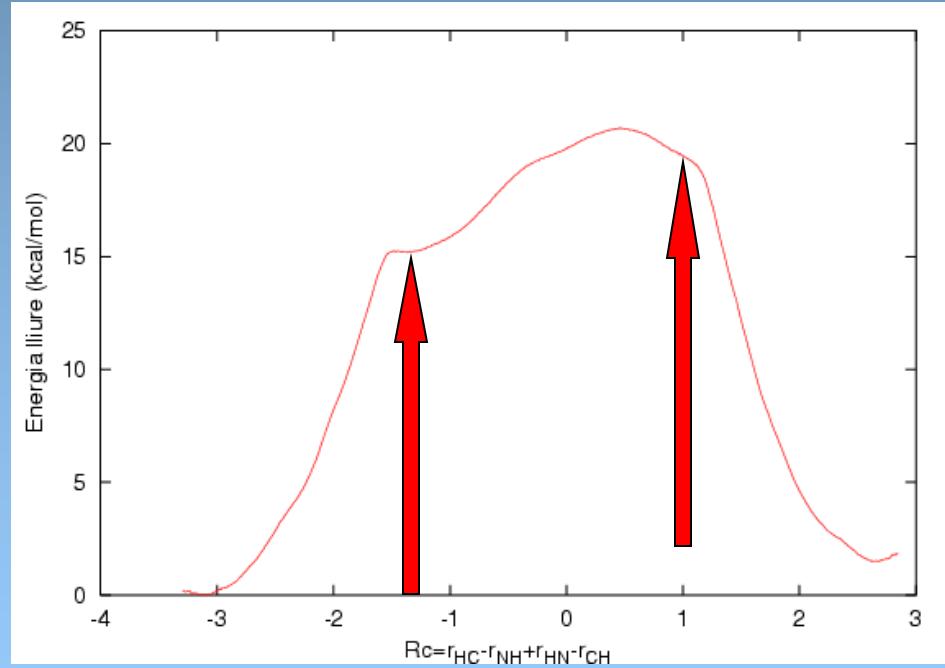
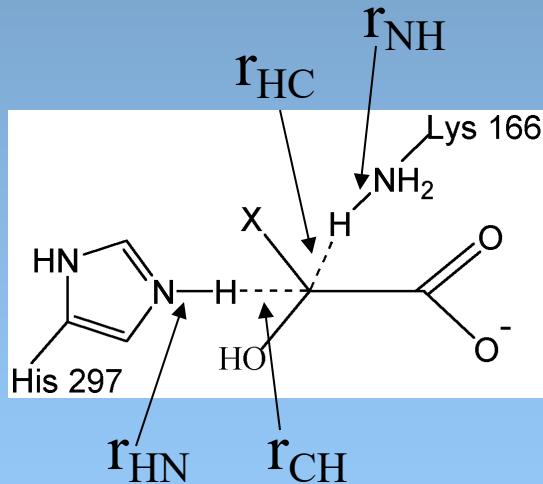


$$Rc = r_{HC} - r_{CH}$$

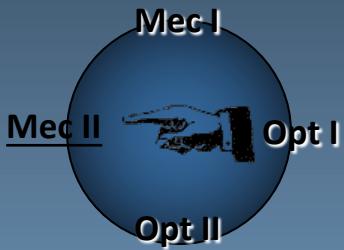


4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Coordenades de reacció: quatre distàncies

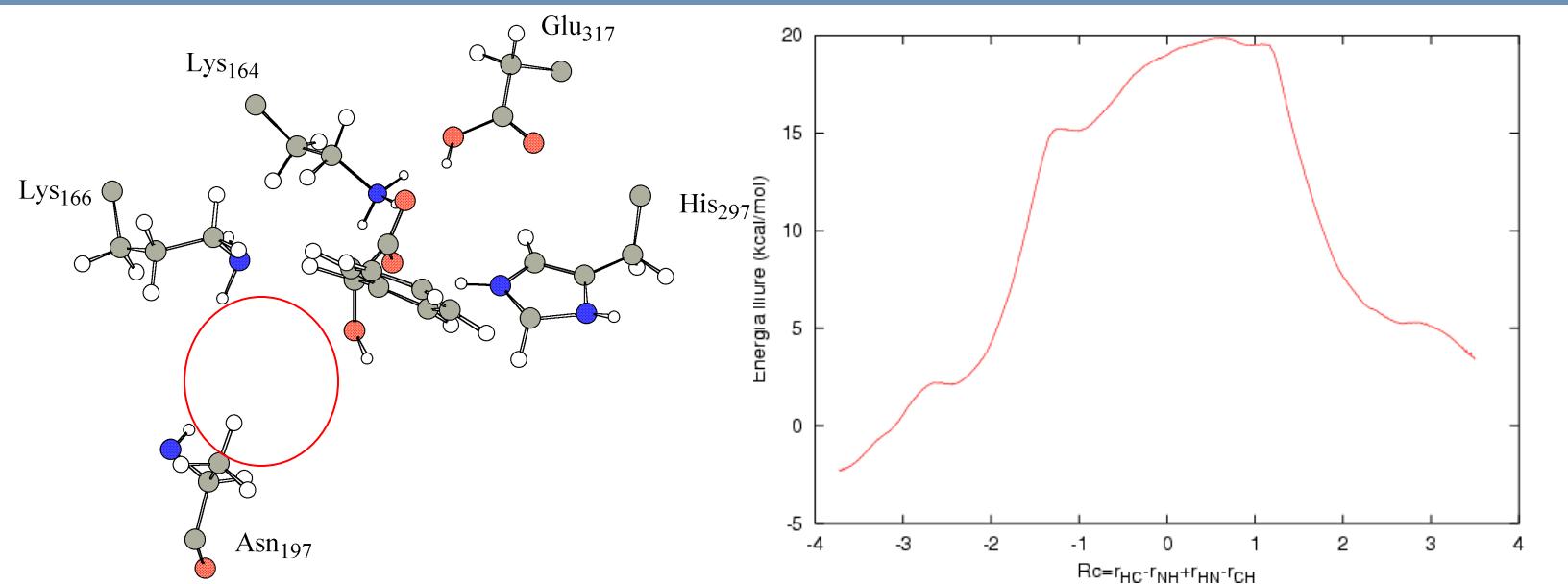
$$R_c = r_{HC} - r_{NH} + r_{CH} - r_{HN}$$



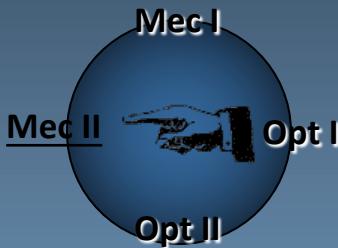
Amb una coordenada de quatre distàncies conseguim dibuixar tot el perfil d'energia lliure



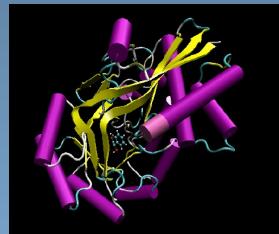
4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Mutació N197A



$$R_C = r_{HC} - r_{NH} + r_{HN} - r_{CH}$$



4. Estudi del mecanisme (II): Energia lliure Perspectiva

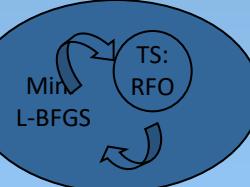


resultats experimentals
reacció aparentment simple

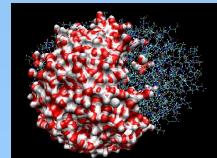
Coordinada de reacció

- ✓ Deduim els mecanismes sobre el MEP
- ✗ Necessitem trobar les barreres de reacció més acuradament

$$\begin{pmatrix} 0 & \mathbf{g}_k^T \\ \mathbf{g}_k & \mathbf{B}_k \end{pmatrix}$$



$$W(R_c) = -RT \ln \rho(R_c)$$



Desenvolupament i aplicació del TSsearch

- ✓ Trobem el camí de reacció correctament
- ✗ Cal incorporar els efectes de temperatura

Càlcul d'energia lliure

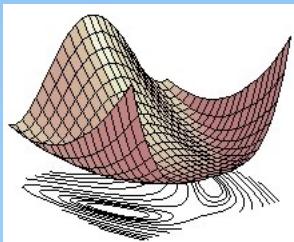
- ✓ Amb els TS com a guia (R_c) calculem els perfils d'energia lliure de la reacció

Conclusions

Study of the reaction mechanism in Mandelate Racemase enzyme: Reaction path and dynamical sampling approaches

Xavier Prat Resina

30 d'abril de 2004



Agraïments

